



HAL
open science

Réponses des communautés microbiennes aux pesticides organiques et inorganiques en milieu lotique

Stéphane Pesce

► **To cite this version:**

Stéphane Pesce. Réponses des communautés microbiennes aux pesticides organiques et inorganiques en milieu lotique. Sciences de l'environnement. HDR en Ecotoxicologie Microbienne, Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand, 2013. tel-02598998

HAL Id: tel-02598998

<https://hal.inrae.fr/tel-02598998>

Submitted on 16 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.

HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Présentée à l'Université Blaise Pascal



Réponses des communautés microbiennes aux pesticides organiques et inorganiques en milieu lotique

Stéphane PESCE



Irstea – Centre de Lyon Villeurbanne
UR Milieux Aquatiques, Ecologie et Pollutions
5 rue de la Doua, CS 70077
69626 VILLEURBANNE Cedex

soutenu le 12 novembre 2013 devant le jury composé de :

AMBLARD Christian, Directeur de recherche CNRS, Clermont-Ferrand II	Rapporteur
BEHRA Renata, Chercheur Senior, EAWAG, Dübendorf, Suisse	Rapporteur
GONZALEZ Patrice, Chargé de recherche HDR CNRS, Bordeaux I	Rapporteur
BOHATIER Jacques, Professeur, Université d'Auvergne, Clermont I	Examineur
GUASCH Helena, Professeur, Université de Girona, Espagne	Examineur
MARTIN-LAURENT Fabrice, Directeur de recherche, INRA, Dijon	Examineur
MONTUELLE Bernard, Directeur de recherche, INRA, Thonon-les-bains	Examineur

Remerciements

Si la rédaction d'un mémoire d'HDR est l'occasion de décrire l'évolution de sa propre recherche, elle ne doit pas occulter le fait que celle-ci s'inscrit dans une démarche fortement collective et qu'elle s'appuie toujours sur des rencontres et des collaborations, qu'elles soient quotidiennes au laboratoire ou plus ponctuelles en fonction des opportunités et des projets concernés. Dans ce sens, il me semble ainsi évident et nécessaire de débiter ce manuscrit en remerciant l'ensemble des personnes qui ont joué un rôle dans mon cheminement depuis mes premiers pas dans la recherche.

Pas de soutenance d'HDR sans jury. Je remercie donc vivement tous les membres du jury d'avoir consacré une part de leur temps (un bien rare et précieux dans notre activité...) à l'appréciation de mon travail. J'adresse une mention particulière à Renata Behra et Helena Guasch pour avoir accepté d'évaluer un manuscrit rédigé en français. Je remercie également Soizic Morin, Noémie Pascault, et Marc Neyra d'avoir aussi pris de leur temps pour relire le manuscrit avant son évaluation par le jury.

Il était important pour moi de « revenir à la source » en présentant ma soutenance à Clermont-Ferrand. Je remercie donc Jacques Bohatier de m'avoir encouragé dans cette entreprise et de s'être porté Garant de ma candidature HDR auprès de l'UBP. Puisque tout a commencé au LMGE (ou plus exactement au « Laboratoire de Biologie des Protistes », appellation de l'époque !), je tiens à remercier mes Ami(e)s clermontois(es) qui m'ont mis sur les rails de la recherche. Je ne ferai pas ici le remake de mes remerciements de thèse et ne me risquerai pas à dresser une liste nominative mais mon attachement pour « mon ancien labo » n'est un secret pour personne (avec une pensée spéciale pour toutes les rescapées de l'ancienne équipe d'écotoxicologie microbienne, toujours présentes pour me soutenir...en témoigne par exemple l'aide précieuse d'Isabelle et Frédérique lors de mes démarches administratives auprès de l'Ecole Doctorale !).

A priori, aucun mémoire d'HDR n'aurait vu le jour sans un appel de Bernard Montuelle, quelques jours après ma soutenance de thèse, pour me proposer un post-doctorat. Même si notre cohabitation lyonnaise n'aura été malheureusement que de trop courte durée, je dois beaucoup à Bernard, qui m'a ouvert les portes de son large réseau et a grandement favorisé mon passage au statut de chercheur.

Fabrice Martin-Laurent a également joué un rôle moteur dans mon évolution et celle de ma réflexion scientifique grâce à des échanges toujours très riches et constructifs. On a souvent besoin de modèles pour avancer et progresser, l'un des miens se trouve en terre dijonnaise... Ce constat est d'autant plus plaisant que mes nombreux déplacements à Dijon représentent toujours des moments très agréables tant sur le plan professionnel, grâce à la compétence sans faille de l'ensemble des membres de l'équipe EMFI, que d'un point de vue relationnel, du fait d'un accueil toujours très chaleureux dans ce laboratoire. Je remercie donc très sincèrement Nadine, Marion, David, Jérémie, Aymé, Laurent, Marie-Christine et tous les collègues (joueurs de foot compris !) croisés lors de mes visites régulières. Et bien évidemment, j'ajoute un grand merci, qui dépasse très largement le cadre professionnel, à mes « logeurs », Noémie et Nicolas (Méline dirait les « Noéco »...), toujours là pour moi.

En parlant des équipes avec lesquelles il fait bon travailler, que dire de mes collègues du centre Irstea de Bordeaux... Je commencerai par souligner la chance que j'ai de pouvoir avancer en étroite collaboration avec Soizic Morin. Notre complicité scientifique et amicale est très stimulante, même si je suis toujours à la recherche du secret qui lui permet d'être aussi efficace ! Un adjectif qui s'applique aussi à Nicolas Mazzella, un autre modèle à suivre à mes yeux, tant il gère de main de maître son laboratoire de chimie des eaux. Mes séjours en Gironde sont toujours synonymes de plaisir grâce au dynamisme et à la gentillesse de toutes les personnes qui participent de près ou de loin à nos nombreux travaux communs. La liste étant un peu longue, je ne citerai pas de nom, mais je remercie très chaleureusement tout le personnel de CARMA (y compris les jeunes retraitées). Avec toutefois un petit clin d'œil à Brigitte, devenue spécialiste des échanges de glacières entre Lyon et Bordeaux.

Pour rester dans le monde du biofilm et des diatomistes, je remercie également les collègues de Thonon (autre lieu où il fait bon aller, surtout si on peut choisir sa saison) où je suis toujours très bien accueilli. De manière très générale, j'adresse mes remerciements à tous les collègues avec qui j'ai collaboré au cours des différents projets auxquels j'ai participé.

J'ai gardé les « remerciements locaux » pour la fin. J'adresse tout d'abord un grand merci à l'ensemble des personnes impliquées dans notre centre dans les missions d'appui à la recherche. J'ai bien conscience d'évoluer dans un environnement particulièrement privilégié à ce niveau et ce soutien administratif et logistique est source d'un gain de temps et d'énergie très appréciable. Concernant les aspects scientifiques, le cadre pluridisciplinaire local engendre des échanges riches et nombreux. Ils s'expriment surtout avec le LAMA et l'équipe Pollutions Diffuses. Je remercie ainsi particulièrement Christelle Margoum, Marina Coquery, Aymeric Dabrin, Véronique Gouy et Paul le Pimpec. J'adresse également des remerciements appuyés aux collègues impliqués dans les analyses de nos échantillons, et notamment à Josiane Gahou, Céline Guillemain et Hélène Sanejouand, très souvent sollicitées dans le cadre de nos études. Je n'oublie pas non plus le soutien apporté par les personnes qui se rendent régulièrement sur le site de la Morcille, en particulier Lucie Liger et Josselin Panay.

Je termine par les membres de l'équipe EMHA, avec lesquels il fait vraiment bon vivre au quotidien. J'associe à ce paragraphe toutes les personnes, toujours présentes ou non, permanentes ou de passage, qui contribuent ou ont contribué à maintenir une dynamique scientifique admirable au regard de la taille de l'équipe. Sans l'investissement de tous, ce manuscrit ne serait pas épais... J'adresse des remerciements spéciaux à Joan et Arnaud, qui ont apporté une réelle plus-value scientifique lors de leur passage en post-doc. Notre équipe actuelle représente un biotope très riche, tant nous sommes différents, mais elle se compose de personnalités très attachantes que je retrouve avec un réel plaisir tous les matins. Merci donc (par ordre d'ancienneté) à Bernadette Volat, Bernard Motte, Christophe Rosy, Marc Neyra, Arnaud Foulquier et Anne-Sophie Lambert. Un grand MERCI vraiment... pour votre implication quotidienne, dans une bonne ambiance permanente (vive le comique de répétition !). J'ai bien conscience de mon niveau d'exigence élevé, de mes sollicitations régulières de dernière minute et de mon manque de patience... mais vous avez une façon admirable d'y faire face !!!

Organisation du manuscrit

Chapitre I	Aspects introductifs	1
<hr/>		
I.1. Présentation du candidat		2
I.2. Positionnement scientifique et contexte de la candidature à l'HDR		8
Chapitre II	Synthèse des travaux de recherche	11
<hr/>		
II.1. Contexte scientifique		12
II.2. Considérer l'«éco» dans l'écotoxicologie		12
II.2.1. Ecologue ou écotoxicologue ?		12
II.2.2. Préserver la dimension écologique des études écotoxicologiques		14
II.3. Effets des pesticides sur des communautés microbiennes de rivière		16
II.3.1. Approches et méthodologies utilisées		16
II.3.2. Principales conclusions de l'approche <i>in situ</i>		17
II.3.3. Effets du diuron sur les communautés phototrophes et hétérotrophes		18
II.3.4. Effets du glyphosate sur les communautés phototrophes et hétérotrophes		21
II.4. Adaptation des communautés microbiennes aux pesticides		22
II.4.1. Adaptation microbienne et écotoxicologie		22
II.4.2. Approche PICT		23
II.4.3. Adaptation à la biodégradation des pesticides		32
II.5. Potentiel de récupération des communautés microbiennes aquatiques		37
II.5.1. Conséquences écologiques de la restauration chimique		37
II.5.2. Potentiel de récupération des communautés périphytiques de la Morcille		37
II.5.3. Influence des migrations d'espèces dans les processus de récupération		39
II.5.4. Interdiction du diuron et conséquences écologiques dans la Morcille		42
Chapitre III	Perspectives	47
<hr/>		
III.1. De l'écotoxicologie à « l'écologie du stress multiple »		48
III.2. Evaluer les effets de stress multiples		49
III.2.1. Mélanges de toxiques		49
III.2.2. Influence des modifications climatiques		54

III.3. Etudier les mécanismes d'adaptation microbienne.....	59
III.3.1. Mécanismes impliqués dans la tolérance au cuivre.....	59
III.3.2. Mécanismes impliqués dans la biodégradation des pesticides organiques.....	60
III.4. Fédérer l'écotoxicologie microbienne à l'échelle nationale.....	61
III.5. M'impliquer activement dans le « réseau PICT » européen.....	64
III.6. Entre science appliquée et recherche opérationnelle	64

Chapitre IV Publications et communications scientifiques.....67

IV.1. Publications internationales.....	68
IV.2. Publications nationales et rapports d'études.....	70
IV.3. Congrès et colloques.....	71

Références bibliographiques.....77

Annexe..... 85

Aperçu des publications internationales

Chapitre I

Aspects introductifs

I.1. Présentation du candidat

Stéphane PESCE (34 ans)

Chargé de recherche 2^{ème} classe

Irstea – Centre de Lyon-Villeurbanne

UR « Milieux Aquatiques, Ecologie et Pollutions » (MAEP)

Equipe « Ecologie Microbienne des Hydrosystèmes Anthropisés » (EMHA)

5 rue de la Doua, CS 70077 69626 VILLEURBANNE Cedex

Tel./Fax : 04.72.20.87.95/04.78.47.78.75

E-mail : stephane.pesce@irstea.fr

Cursus universitaire

2006 Doctorat d'Université (spécialité Écologie Microbienne)

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

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

Thèse soutenue publiquement le : 05 décembre 2006

Mention : Très honorable avec les félicitations du jury

Composition du jury de thèse :

Président	AMBLARD Christian	DR CNRS, Clermont-Ferrand
Rapporteurs	MONTUELLE Bernard	DR Cemagref, Lyon
	DE LA BROISE Denis	MCF HDR, Quimper
Examineur	CAQUET Thierry	CR INRA, Rennes
Directeur de Thèse	BOHATIER Jacques	PR, Clermont-Ferrand I
Co-encadrante	FAJON Céline	MCF, Clermont-Ferrand II
Membres invités	ARZUL Geneviève	CR IFREMER, Plouzané
	BALIN Agnès	DRAF SRPV

2002 DEA – « Toxicologie de l'Environnement »

Université de METZ

Titre du stage : Etude des effets du diuron sur l'activité et la diversité des communautés phytoplanctoniques et bactériennes : approche expérimentale en microcosmes.

Lieu du stage : Laboratoire de Biologie des Protistes, UMR CNRS 6023. Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II.

Mention : Bien

1997-2001 1^{er} et 2^{ème} cycle universitaire

Université Blaise Pascal – Clermont-Ferrand II

2001 Maîtrise de Biologie des Populations et des Ecosystèmes – Mention Assez bien

2000 Licence de Biologie des Organismes – Mention Assez bien

1999 DEUG Sciences de la Vie

Parcours professionnel

Depuis Août 2009 : Chargé de recherche 2^{ème} Classe

Irstea, UR MAEP, Equipe EMHA, Lyon (69).

Septembre 2008-Juillet 2009: Chargé de recherche contractuel

Irstea, UR MAEP, Equipe EMHA, Lyon (69).

Mars 2007-Septembre 2008: Post-Doctorant

Irstea, UR MAEP, Equipe EMHA, Lyon (69).

Thématique de recherche

Évaluation de la réponse structurale et fonctionnelle des communautés microbiennes aquatiques (phototrophes et hétérotrophes) à des niveaux variables d'exposition à des toxiques organiques et inorganiques (seuls ou en mélange) dans un contexte de changement global

Domaines de compétences

Modèles biologiques:

- Biofilms de rivière sur substrats inertes (artificiels ou naturels) ou organiques (litières de feuilles)
- Communautés microbiennes sédimentaires

Approches:

- Suivis *in situ* en milieu lotique
- Expérimentations en microcosmes (aquariums et canaux artificiels)

Analyse des communautés microbiennes phototrophes et hétérotrophes:

- Analyses structurales: mesure de biomasse, dosage des pigments chlorophylliens (spectrophotométrie, fluorimétrie), dosage d'ergostérol (HPLC¹), dénombrements (microscopie en épifluorescence), approches moléculaires (clonage/séquençage, séquençage à haut-débit, ARISA², TTGE/DGGE³, T-RFLP⁴, FISH⁵), approches culturales (isolement de souches)
- Analyses fonctionnelles: photosynthèse (fluorimétrie), respiration (microResp®, µGC⁶), nitrification/dénitrification/méthanisation (µGC), activités enzymatiques (fluorimétrie), biodégradation (radiorespirométrie), potentiel génétique fonctionnel (qPCR⁷)
- Approches PICT⁸

Analyse de données:

- Analyses statistiques multivariées
- Analyses phylogénétiques (comparaison de séquences nucléotidiques, construction d'arbres phylogénétiques)

Activités d'enseignement

2003-2006: Enseignement Universitaire (vacations)

Université Blaise Pascal, Clermont II – 122 heures (équivalent TD) – niveau Licence 1
Matières enseignées: *Ecologie, Ecotoxicologie, Microbiologie.*

2002-2003: Enseignement Privé

EFESUP, Clermont-Ferrand (63) – 45 heures.
Formation et préparation aux concours de médecine et pharmacie PCEM1.
Matières enseignées: *Biologie Moléculaire, Biologie Cellulaire.*

Activités d'encadrement et de formation par la recherche

Post-Doctorants

- **Joan ARTIGAS** – Financement programme ANR CES SENDEFO ; Août 2010 à Février 2012 (18 mois) – (*recruté MCF Clermont-Ferrand II, sept. 2012*).
- **Arnaud FOULQUIER** – Financement programme ANR CEP WETCHANGE ; Décembre 2010 à Mai 2012 (18 mois).

¹ High-Performance Liquid Chromatography

² Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis

³ Temporal Temperature/Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

⁴ Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism

⁵ Fluorescent In Situ Hybridization

⁶ micro Gas Chromatography

⁷ quantitative real time Polymerase Chain Reaction

⁸ Pollution Induced Community Tolerance

Doctorante

- **Anne-Sophie LAMBERT**, depuis Décembre 2012 (co-encadrement avec Marina COQUERY, DR Irstea et Aymeric Dabrin, CR Irstea). Réponse de biofilms microbiens aux pollutions métalliques dans un contexte de changement global: Influence d'une hausse de température, Univ. Lyon 1. (Financement Irstea).

Master Recherche 2^{ème} année ou équivalent

- **Anne-Sophie LAMBERT**, 2011 (co-encadrement avec Soizic MORIN). Dynamique de récupération de biofilms suite à une diminution du niveau d'exposition au cuivre : Influence des migrations d'espèces, Master 2 de Sciences et Technologies, Univ. Paris 6.
- **Joy MAJERHOLC**, 2011 (co-encadrement avec Joan ARTIGAS). Impact du tébuconazole sur les communautés microbiennes aquatiques colonisant la litière de feuilles, Master 2 Toxicologie Professionnelle et Environnementale, Univ. Lille 2.
- **Cécile NASSIET**, 2010 (co-encadrement avec Soizic MORIN). Effets de pesticides seuls et en mixtures sur des biofilms, Master 2 eau-santé-environnement, Univ. Bordeaux 2.
- **Luc FIAT**, 2008. Etude *in situ* de la résilience de communautés microbiennes périphytiques dans une rivière soumise à des phytosanitaires, Ecole de Biologie Industrielle, Stage de fin d'étude du cycle ingénieur.

IUT

- **Chloé Desvignes**, 2013. Mise au point de tests de toxicité afin d'étudier l'impact de pesticides sur les communautés microbiennes aquatiques, Univ. D'Auvergne, IUT Génie Biologique

Responsabilités et expertises scientifiques

Responsable d'équipe (Ecologie Microbienne des Hydrosystèmes Anthropisés - EMHA)

septembre 2010 à février 2011 (intérim de 6 mois suite au départ de Bernard Montuelle).

Animation scientifique d'une équipe composée de 1CR, 2AI (dont 1CDD), 2TR, 1 post-doctorant et 1 doctorant

Examineur de Thèses :

- **Frédérique CHANGEY** "Etude de l'évolution du potentiel génétique dégradant de populations bactériennes dégradant l'atrazine", Université de Bourgogne, Dijon, 16 décembre 2011.
- **Sabir HUSSAIN** "Characterization of the isotopuron degrading community: From the field to the gene", Université de Bourgogne, Dijon, 14 septembre 2010.

Membre de comités de thèse :

- **Sandra KIM-TIAM** (UR REBX, Irstea Bordeaux), « Effets de mélanges de pesticides sur les biofilms périphytiques d'eau douce » ; 2010-2013.
- **Floriane LARRAS** (UMR CARTEL, INRA Thonon-les-bains), « Impact des pesticides sur les communautés microbiennes benthiques: évaluation écotoxicologique en zone côtière lacustre » ; 2010-2013.

Organisation de manifestations scientifiques :

- Organisateur du workshop Européen « Environmental biofilms: PICT approaches and ecological indication ». Lyon, programmé en 2014.
- Co-organisateur du séminaire « La place de l'écotoxicologie microbienne dans le paysage national : Bilan et perspectives ». Lyon, 20-22 mars 2013 (co-org Fabrice MARTIN LAURENT)
- Co-organisateur et animateur de la session « Ecologie microbienne : les biofilms aquatiques ». Colloque national d'écologie scientifique, Ecologie 2010, septembre 2010, Montpellier, France. (co-org Bernard MONTUELLE et Agnès BOUCHEZ)

Activités d'expertise nationale et internationale:

- Expert invité au groupe de travail européen « Biofilm Workshop: Field applications of pollution induced community tolerance measurements », Suisse, 19-20 avril 2012.
- Expert invité au groupe de travail international « Remediation to Chlordecone pollution in the French West Indies », Antilles, 17-22 Mai 2010 (Plan interministériel chlordécone).

- Evaluation de dossiers pour le département INRA EFPA (projets innovants, sujets de thèse).
- Evaluation de dossiers pour le comité « Évaluation - Orientation de la Coopération Scientifique (Argentine) » (ECOS-*Sud*)
- Membre du jury du prix ASTEE 2012 (Association Scientifique et Technique pour l'Eau et l'Environnement).

Evaluation d'articles scientifiques (35):

Aquatic Toxicology (14); Archives of Environmental Contamination and Toxicology (2); Chemosphere (2); Ecological Indicators (1); Ecotoxicology (1); Ecotoxicology and Environmental Safety (1); Environmental Monitoring and Assessment (2); Environmental Pollution (1); Environmental Science and Pollution Research (2); Environmental Toxicology and Chemistry (1); Hydrobiologia (1); Microbial Ecology (1); PloS ONE (2); Research in Microbiology (1); Sciences of the Total Environment (2).

Participation à des programmes de recherche

2013-2014 Programme Régional Zone Atelier Bassin du Rhône (ZABR)

« Pesticides et changements de pratiques en milieu viticole : freins, leviers et impacts » - coord. M. Neyra (UR MAEP, Irstea Lyon) et G. Armani (Maison du fleuve Rhône).

2012-2015 APR Pesticides – Ecophyto (MEDDTL)

« Développement d'indicateurs microbiens pour l'évaluation de l'impact des pesticides sur des fonctions écosystémiques terrestres et aquatiques (IMPEC) » - coord. F. Martin-Laurent (UMR Agroécologie, Dijon).

2012-2015 Programme ANR CESA

« Potentiel Toxique dans les Milieux Aquatiques Continentaux : échantillonnage passif des pesticides et relations exposition/impacts sur les biofilms (POTOMAC) » - coord. N. Mazzella (UR REBX, Irstea Bordeaux) – *Co-responsabilité du WP3.*

2012-2015 Programme ANR BIOADAPT

« Conséquences et mécanismes de l'adaptation à la contamination chimique en Seine (SequAdapt) » - coord. L. Fechner (UR HBAN, Irstea Antony).

2012-2013 Programme EC2CO-BIOHEFECT

« Interactions entre altérations hydrologique et thermique des cours d'eau de tête de bassin : implications trophiques et fonctionnelles des changements globaux pour l'écosystème (INTERHYM) » - coord. E. Chauvet (UMR 5245 CNRS-UPS-INPT, Toulouse).

2011-2013 Programme AIP INRA Chlordécone

« Recherche de la signature biologique de la dégradation de la chlordécone dans les sols des Antilles (BIODECHLORD) » - coord. F. Martin-Laurent (UMR INRA MSE, Dijon).

2011-2013 Convention EDF-INRA-Irstea

« Thermie et processus microbiens dans le Rhône (MICROTHERM) » - coord. B. Montuelle (UMR INRA CARRETEL, Thonon-les-bains).

2010-2013 Programme ANR CES

« Sensibilité des communautés bactériennes aquatiques au carbendazime et capacités à dégrader ce fongicide (SENDEFO) » - coord. J.F. Humbert (UMR BIOEMCO, Paris) – *Responsabilité du WPI.*

2010-2013 Programme ANR CEP

« Biodiversité et fonctions des zones humides en réponse aux étiages sévères induits par le changement global (WETCHANGE) » - coord. G. Bornette (UMR CNRS LEHNA, Lyon).

2010-2013 APR Pesticides du MEEDDM

« Prédire l'impact des herbicides en mélange sur les communautés algales planctoniques et benthiques lacustres (IMPALAC) » - coord. A. Bouchez (UMR INRA CARRETEL, Thonon-les-bains).

2010-2013 APR Pesticides du MEEDDM

« Mise au point de descripteurs du risque de contamination des eaux de surface par les phytosanitaires à l'échelle du bassin versant. Prise en compte des dimensions spatiales et temporelles. Appui à l'évaluation et à la gestion du risque (MIRIPHYQUE) » - coord. N. Carluer (UR MAEP, Irstea Lyon).

2008-2011 AO interne Pesticides Irstea

« Evaluation de la qualité chimique et biologique des cours d'eau : pertinence, atouts, limites et domaine de validité d'un panel de méthodes d'échantillonnage in situ (PESTEXPO) » - coord. N. Mazzella (UR REBX, Irstea Bordeaux) et C. Margoum (UR MAEP, Irstea Lyon).

2008- 2011 Convention Irstea-ONEMA

« Remédiation des effets de pesticides » - coord. V. Gouy (UR MAEP, Irstea Lyon).

2005-2008 Programme AIP INRA ECOGER

« Paysages Agricoles, flux de Polluants, Impact Ecologique en Rivière (PAPIER) » - coord. B. Montuelle (UR MAEP, Irstea Lyon).

Valorisation Scientifique (bilan synthétique)

Publications Internationales

23 articles publiés ou sous presse (voir tableau synthétique en page suivante)

4 articles soumis ou en révision et 3 articles en préparation

1 chapitre de livre

Publications nationales

4 articles publiés

1 chapitre de livre

Rapports d'études

4 rapports principaux

Communications en congrès et séminaires

2 conférences invitées

14 communications orales et 17 communications affichées en congrès internationaux

16 communications orales et 3 communications affichées en congrès nationaux

La liste détaillée des publications et communications est décrite dans le chapitre IV.

Les publications internationales et nationales sont respectivement numérotées de A1 à A30 et de AN1 à AN4, et les rapports d'études de RE1 à RE4, cette numérotation étant utilisée dans le manuscrit pour faire référence aux articles correspondants.

Tableau synthétique des articles internationaux publiés ou sous presse

Articles internationaux publiés ou sous presse				
N°	Revue	Année	Place auteur	FI₂₀₁₂ (Quartile)
A1	Aquatic Toxicology	2006	1 /6	3,73 (Q1 ⁹)
A2	Microbial Ecology	2007	2 /5	3,28 (Q1 ⁹)
A3	Aquatic Toxicology	2008	1 /6	3,73 (Q1 ⁹)
A4	Aquatic Sciences	2008	1 /6	2,60 (Q1 ¹⁰)
A5	Aquatic Microbial Ecology	2009	5 /8	2,04 (Q2 ⁹)
A6	Pest Management Science	2009	1 /4	2,59 (Q1 ¹¹)
A7	Ecotoxicology and Environmental Safety	2009	1 /7	2,20 (Q2 ¹²)
A8	Ecological Indicators	2010	2 /5	2,89 (Q1 ¹²)
A9	Water Research	2010	1 /3	4,66 (Q1 ¹²)
A10	Hydrobiologia	2010	8 /8	1,99 (Q2 ⁹)
A11	Journal of Soils and Sediments	2010	1 /5	1,97 (Q2 ¹³)
A12	Aquatic Toxicology	2010	1 /7	3,73 (Q1 ⁹)
A13	Environmental Pollution	2011	1 /5	3,73 (Q1 ¹²)
A14	Reviews of Environmental Contamination and Toxicology	2011	1 /3	4,13 (Q1 ¹²)
A15	Aquatic Toxicology	2012	7 /7	3,73 (Q1 ⁹)
A16	Ecotoxicology	2012	2 /6	2,77 (Q1 ¹²)
A17	Freshwater Biology	2012	5 /5	3,93 (Q1 ⁹)
A18	Aquatic Toxicology	2012	6 /6	3,73 (Q1 ⁹)
A19	Fresenius Environmental Bulletin	2012	2 /5	0,64 (Q4 ¹²)
A20	Journal of Phycology	2012	5 /5	2,24 (Q2 ⁹)
A21	Ecological Indicators	2013	1 /5	2,89 (Q1 ¹²)
A22	Applied Microbiology and Biotechnology	2013	1 /5	3,69 (Q1 ¹⁴)
A23	Environmental Science and Pollution Research	Sous presse	11/20	2,62 (Q2 ¹²)

⁹ MARINE & FRESHWATER BIOLOGY

¹⁰ LIMNOLOGY

¹¹ AGRONOMY

¹² ENVIRONMENTAL SCIENCES

¹³ SOIL SCIENCE

¹⁴ BIOTECHNOLOGY & APPLIED MICROBIOLOGY

I.2. Positionnement scientifique et contexte de la candidature à l'HDR

Ce bilan de mes activités scientifiques intervient après quatre années de recherche doctorale (2003-2006) dans l'équipe « Ecotoxicologie Microbienne » du laboratoire LMGE¹⁵ (UMR CNRS 6023, Clermont-Ferrand) et six années de recherche post-doctorale dans l'équipe « Ecologie Microbienne des Hydrosystèmes Anthropisés » (EMHA) du centre Irstea de Lyon (UR MAEP¹⁶), d'abord comme Post-Doctorant (18 mois), puis comme Chargé de Recherche (Fig. 1).

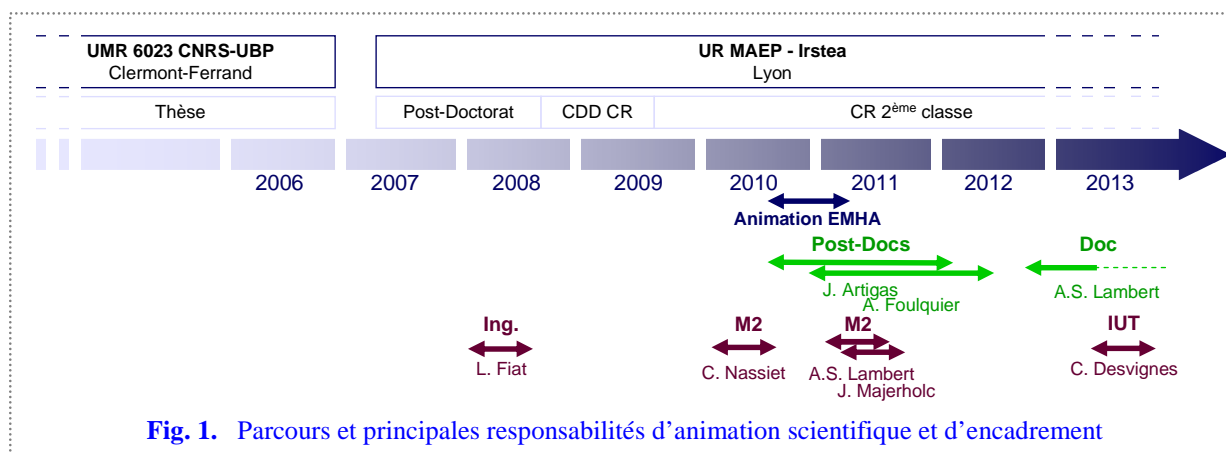


Fig. 1. Parcours et principales responsabilités d'animation scientifique et d'encadrement

Durant ces dix années, mes travaux ont visé à contribuer à une meilleure compréhension de la réponse des communautés microbiennes aquatiques à une exposition aux pesticides organiques et inorganiques. Dans un premier temps, mes recherches doctorales m'ont permis de me familiariser avec de nombreux concepts d'écologie microbienne aquatique et d'écotoxicologie et d'acquérir une bonne connaissance des approches utilisées dans ces disciplines, en développant en parallèle un suivi *in situ* et des études expérimentales en microcosmes de laboratoire. Après cette première expérience, réalisée dans une UMR composée uniquement d'équipes travaillant dans le domaine de la microbiologie, j'ai intégré l'UR MAEP qui regroupe sept équipes de recherche représentant différentes disciplines ayant trait à l'étude des milieux aquatiques (chimie, hydrologie, hydroécologie, écotoxicologie, écologie microbienne, épuration...; Fig. 2). Cette appartenance à l'UR MAEP, qui délimite le cadre scientifique et administratif à l'échelle locale, est également complétée à l'échelle nationale par un rattachement scientifique au Thème de Recherche (TR) « Ecotoxicologie et Bioindication des Milieux Aquatiques » (BELCA), animé par Jeanne Garric. Les TRs (au nombre total de 12) représentent en effet l'entité structurant les recherches à l'échelle de l'établissement Irstea, en définissant notamment le cadre d'évaluation par l'AERES¹⁷. Le TR BELCA regroupe cinq équipes travaillant dans les domaines de l'écotoxicologie, de l'écologie microbienne, de la bioindication et de la chimie (Fig. 2). Ces équipes sont réparties sur trois sites géographiques (Lyon, Antony et Bordeaux).

¹⁵ Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement (ex Laboratoire de Biologie des Protistes)

¹⁶ Milieux Aquatiques, Ecologie et Pollutions

¹⁷ Agence d'évaluation de la recherche et de l'enseignement supérieur

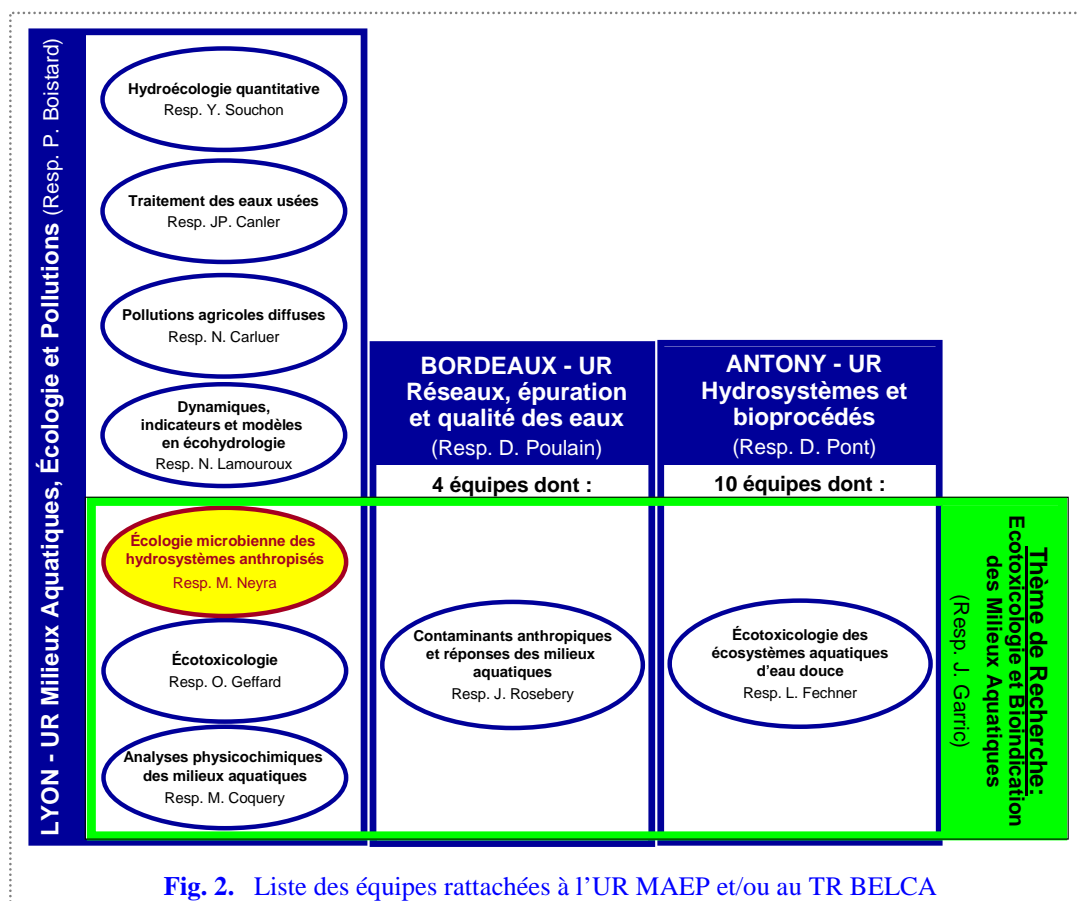


Fig. 2. Liste des équipes rattachées à l'UR MAEP et/ou au TR BELCA

Ce cadre pluridisciplinaire, tant à l'échelle locale (UR) que nationale (TR), constitue donc un environnement scientifique particulièrement adapté à ma thématique de recherche, qui mêle écotoxicologie et écologie microbienne¹⁸. Il m'offre ainsi la possibilité de faire aisément appel à de nombreuses compétences, notamment dans le domaine de la chimie et de l'hydrologie, afin de mieux appréhender l'exposition des communautés aux toxiques, ou de la taxonomie diatomique, afin de mieux caractériser la composante phototrophe des biofilms microbiens.

Il me paraît également approprié de mentionner ici l'ensemble des remaniements intervenus au sein de l'équipe EMHA depuis mon recrutement comme CR. En effet, ces modifications, particulièrement importantes du fait de la petite taille de cette équipe, ont joué un rôle moteur sur le déroulement de mes activités.

Lors de mon arrivée, en 2007, l'équipe était composée de deux chercheurs (1 DR¹⁹ et 1 IR²⁰) et de trois collaborateurs techniques (1 AI²¹ et 2 TR²²), mon recrutement comme CR venant compléter cet effectif de personnels permanents.

¹⁸ ce point sera abordé plus spécifiquement ultérieurement dans différentes parties du manuscrit...

¹⁹ Directeur de Recherche

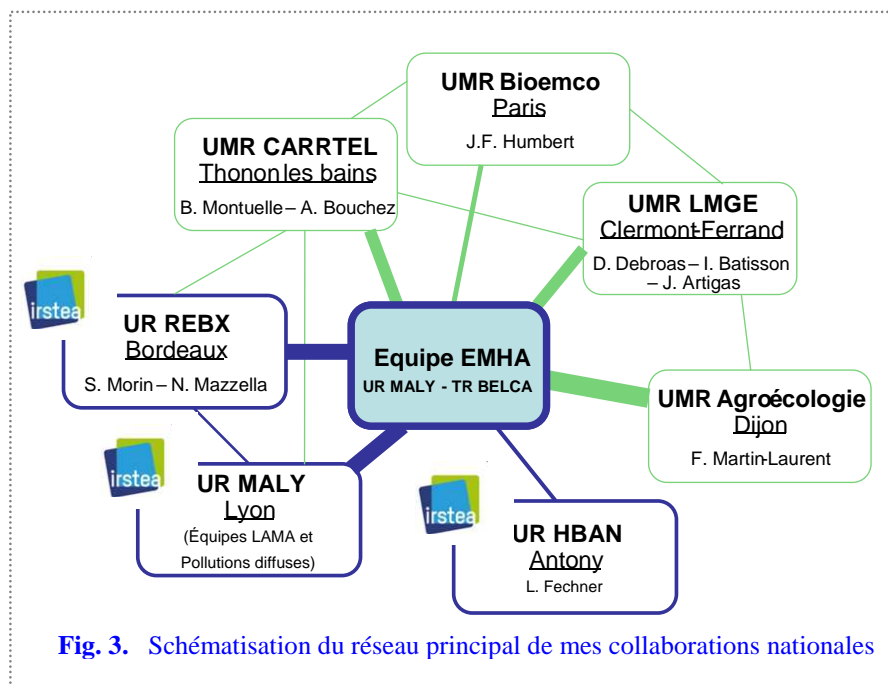
²⁰ Ingénieur de Recherche

²¹ Assistant Ingénieur

²² Technicien de Recherche

Suite au départ, en septembre 2010, de Bernard Montuelle (DR, détachement INRA), alors responsable de l'équipe, et de Jean-Louis Roulier (IR, départ en retraite), je me suis retrouvé seul chercheur dans ce collectif complété alors par un CDD AI, un post-doctorant et un doctorant. J'ai donc été amené à gérer et diriger l'équipe durant 6 mois, jusqu'au recrutement en mars 2011 de Marc Neyra, CR détaché de l'IRD. Ce contexte a donc favorisé une prise rapide de responsabilités et d'autonomie, tant scientifiques qu'administratives.

Aujourd'hui, l'état d'avancement de mes travaux de recherche, qui s'appuient principalement sur un réseau national de collaborations (Fig. 3), me semble propice à la réalisation d'un bilan et à une mise en perspective de mes activités scientifiques. La volonté de réaliser cet exercice, déjà initié à l'occasion de l'évaluation récente du TR BELCA par le comité de l'AERES (janvier 2012) et de l'évaluation de mes activités scientifiques par les rapporteurs externes désignés par Irstea (avril 2013), a donc fortement motivé le choix de rédiger ce manuscrit, en vue de l'obtention de l'HDR.



Chapitre II

Synthèse des travaux de recherche

II.1. Contexte scientifique

La préservation des eaux de surface représente une préoccupation socio-économique majeure, symbolisée entre autres par la mise en œuvre en 2000 de la Directive Cadre Européenne sur l'Eau (DCE, 2000), qui impose le retour au « bon état » chimique et écologique des masses d'eau d'ici à 2015. Cette contrainte législative a engendré (et engendre toujours) des besoins de recherche nombreux, notamment pour améliorer les procédures d'évaluation des risques écotoxicologiques des substances chimiques dans les masses d'eau, définir des mesures correctives visant à améliorer la qualité chimique des eaux, et développer des outils permettant de réellement mesurer le gain écologique découlant de ces améliorations. Plus récemment, le Grenelle de l'Environnement a confirmé au niveau national cette forte prise de conscience sociétale, en particulier avec l'élaboration du plan Ecophyto 2018 visant à réduire l'usage des produits phytosanitaires en agriculture.

L'ensemble de mes recherches, débutées en 2003 dans le cadre de mon Doctorat, s'inscrit dans cette problématique finalisée de gestion des eaux. Elles concernent principalement les petits cours d'eau de tête de bassins versants, très sensibles aux diverses pressions anthropiques et notamment aux contaminations par les polluants chimiques organiques ou inorganiques. Dans ces milieux lotiques, la majorité de l'activité microbienne est assurée par les communautés benthiques, à savoir les biofilms se développant sur des substrats inertes (artificiels ou naturels) ou organiques (litières de feuilles) et les communautés sédimentaires. Ces communautés microbiennes interviennent ainsi dans des processus écologiques majeurs tels que la régulation des cycles biogéochimiques ou l'auto-épuration de zones contaminées (Battin et al., 2003). Elles interagissent précocement avec les substances dissoutes, et notamment les toxiques, et présentent une forte capacité à répondre rapidement aux changements environnementaux et à s'y adapter de manière transitoire ou irréversible (Sabater et al., 2007). En outre, ce sont des assemblages complexes, composés de microorganismes autotrophes et hétérotrophes qui présentent des sensibilités différentes selon le mode d'action des toxiques rencontrés. De par ces différentes caractéristiques, ils offrent donc un potentiel important pour évaluer l'impact écologique des toxiques dans les cours d'eau.

Dans ce contexte, mes recherches ont pour cadre très général l'évaluation de la réponse structurale et fonctionnelle des communautés microbiennes aquatiques benthiques à des niveaux variables d'exposition à des pesticides organiques et inorganiques.

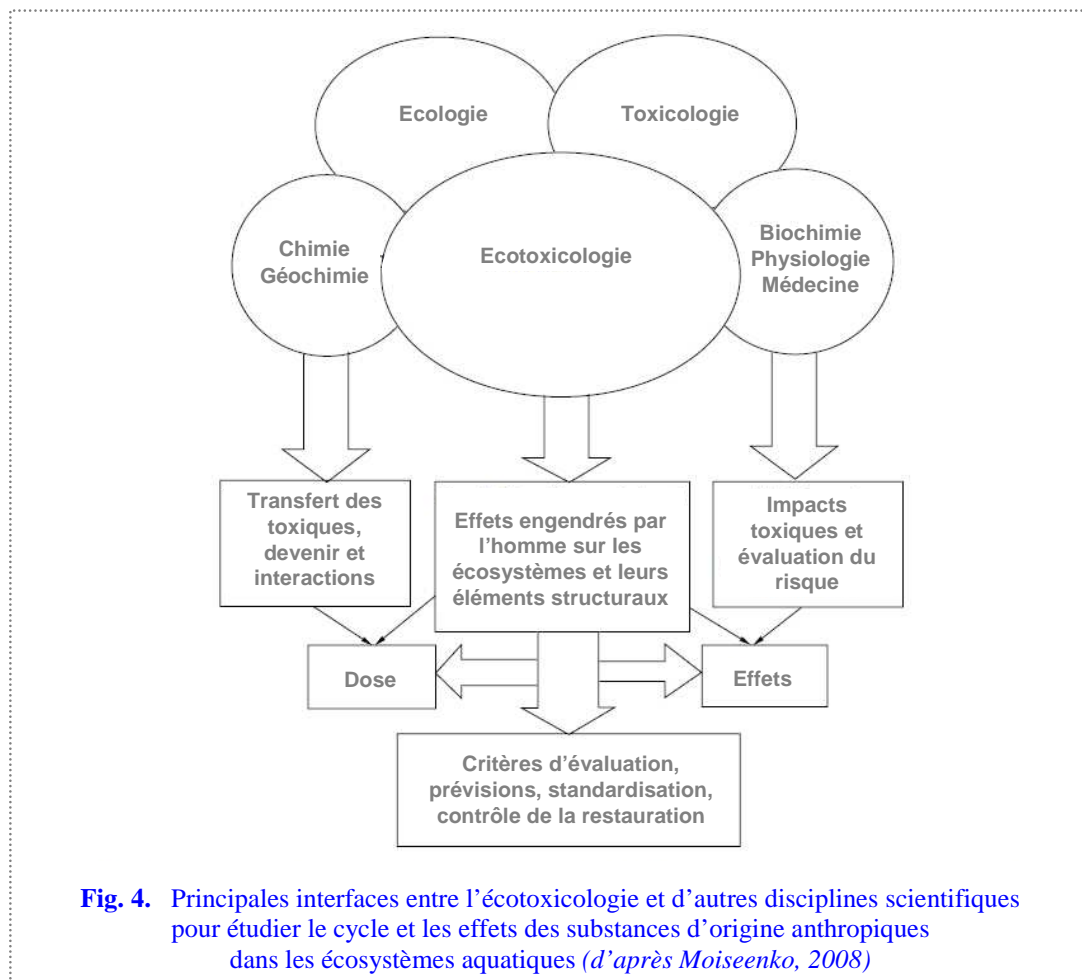
II.2. Considérer l'«éco» dans l'écotoxicologie

II.2.1. Ecologie ou écotoxicologie ?

Une des questions récurrentes à laquelle je suis fréquemment confronté depuis mes premiers pas dans la recherche concerne la définition de mon champ disciplinaire. Dois-je, ou doit-on, me considérer comme un « écologue » ou un « écotoxicologue » microbien ? A cette question, j'ai tendance à répondre « les deux », mais les questions ne sont pas toujours à choix multiples...

La réponse n'est sans doute pas définitive, et nous y reviendrons dans la partie traitant des perspectives, mais jusqu'à présent, je finis généralement par concéder que je suis principalement un écotoxicologue microbien, ce qui est discutable mais semble être le plus cohérent si je me réfère au cadre général de mes recherches, tel que je l'ai présenté dans le chapitre précédent.

Je ne reviendrai pas ici sur l'évolution au cours des dernières décennies de la définition de l'écotoxicologie²³ ni sur le débat qui agite parfois la communauté scientifique quant à la légitimité de cette discipline, qui n'en est (ou n'en était) pas une aux yeux de certains auteurs (Steinberg et Ade, 2005). Je me contenterai de donner ma vision des choses, qui consiste à considérer l'écotoxicologie comme une discipline à part entière, qui n'a cependant lieu d'être que si elle s'intègre dans une démarche inter-disciplinaire. Parmi les nombreux schémas disponibles dans la littérature, je m'appuierai donc sur celui proposé par Moiseenko (2008) pour illustrer ce propos (Fig. 4). En effet, cette représentation place clairement l'écotoxicologie à l'interface de plusieurs disciplines qui doivent être conjuguées pour réussir à relier exposition chimique et effets biologiques afin d'évaluer, à terme, les conséquences qui en découlent à l'échelle des écosystèmes aquatiques.

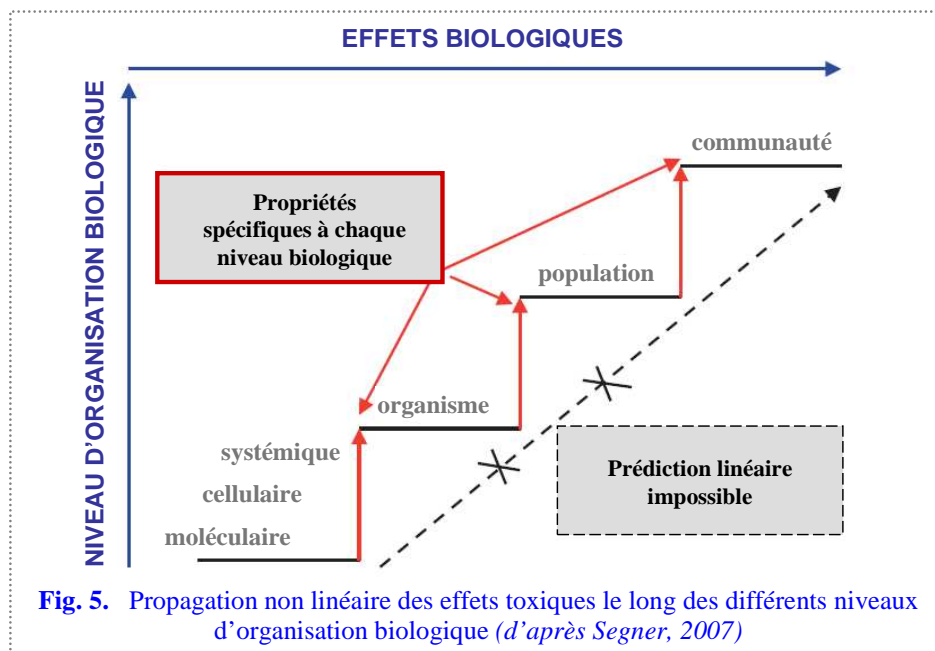


²³ Un rappel synthétique, basé sur les principaux ouvrages publiés dans la discipline depuis Ramade (1977), est disponible dans Van Straalen (2003)

De manière très basique, il est commun d'affirmer que l'écotoxicologie se doit de découler d'un couplage entre l'écologie et la toxicologie. Si à ma connaissance, peu d'écologues se disent écotoxicologues²⁴, nombre d'études, dites d'écotoxicologie, relèvent à mon sens parfois plus de la toxicologie. Je n'aurai pas la prétention de pousser plus loin ce raisonnement car il est difficile de définir la limite entre ces trois disciplines mais je m'inscris bien volontiers dans le courant apparu au cours de la dernière décennie et qui vise à souligner l'importance de renforcer la dimension écologique des études écotoxicologiques, ou, en d'autres termes, à mettre « plus d'éco » dans l'écotoxicologie (ex. Chapman, 2002; Relyea et Hoverman, 2006; Filser, 2008; Schmitt-Jansen et al., 2008).

II.2.2. Préserver la dimension écologique des études écotoxicologiques

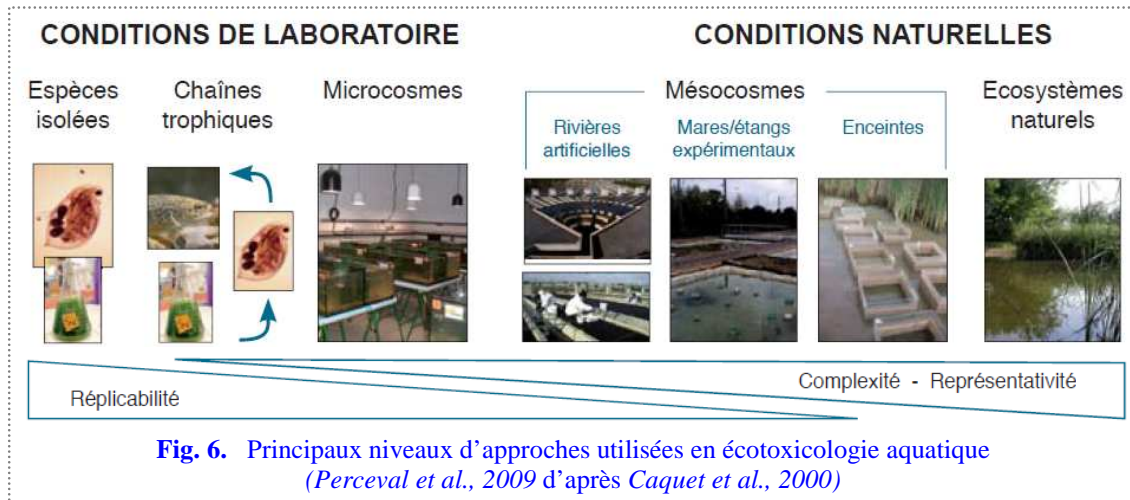
Pour de nombreux auteurs, un des moyens d'intégrer une dimension écologique aux approches écotoxicologiques est de privilégier les études à l'échelle des communautés, en s'appuyant sur les concepts écologiques associés (Rohr et al., 2006; Clements et Rohr, 2009; Geiszinger et al., 2009). Ce raisonnement repose en partie sur le constat d'une propagation non linéaire des effets toxiques lors d'un passage à un niveau d'organisation biologique supérieur (Segner, 2007 ; Fig. 5), ce qui limite les extrapolations possibles à partir d'observations réalisées aux échelles moins complexes, qu'elles soient cellulaires, individuelles ou populationnelles.



Les communautés présentent également l'avantage de constituer un niveau intermédiaire entre les populations et les écosystèmes. Composées de plusieurs espèces, elles offrent ainsi la possibilité de considérer dans les approches écotoxicologiques la notion de biodiversité spécifique et fonctionnelle, paramètre important en vue notamment d'évaluer l'impact des toxiques sur le niveau d'intégrité fonctionnelle des écosystèmes (Clements et Rohr, 2009).

²⁴ S'agit-il dans certains cas d'un déni de pollution ?

En écotoxicologie, le niveau de réalisme écologique est également conditionné, entre autres, par le type d'approche choisie parmi le continuum d'outils utilisables, qui s'échelonne des tests de toxicité en laboratoire aux suivis en milieu naturel (Fig. 6), et par le choix des concentrations testées pour évaluer, en conditions contrôlées, l'impact potentiel des toxiques dans le milieu.



Jusqu'au début des années 2000, période qui coïncide avec le démarrage de mes recherches (DEA et Doctorat), les études visant à évaluer les effets de pesticides sur les microorganismes aquatiques étaient principalement focalisées sur les microalgues, avec une majorité de tests réalisés à l'échelle mono-spécifique. La plupart des travaux antérieurs à cette période sont reportés dans la revue publiée par DeLorenzo et al. en 2001. Les auteurs soulignaient alors le déficit d'études concernant les autres compartiments microbiens. Dans une synthèse publiée en 2011, décrivant les connaissances quant aux effets des herbicides sur les communautés microbiennes phototrophes en milieu dulcicole (A14), nous avons également montré qu'à cette période, les approches réalisées à l'échelle des communautés étaient essentiellement effectuées dans des dispositifs expérimentaux (microcosmes ou mésocosmes), en testant des concentrations souvent très supérieures (parfois quelques mg/L) à celle rencontrées dans l'environnement (de quelques ng/L à quelques µg/L au maximum). A l'instar de plusieurs auteurs (Alix et al., 2005 ; Schulz, 2004 ; Ricart et al., 2010), nous avons aussi souligné le manque récurrent d'études visant à évaluer *in situ* l'impact des pesticides sur les communautés microbiennes aquatiques (A14).

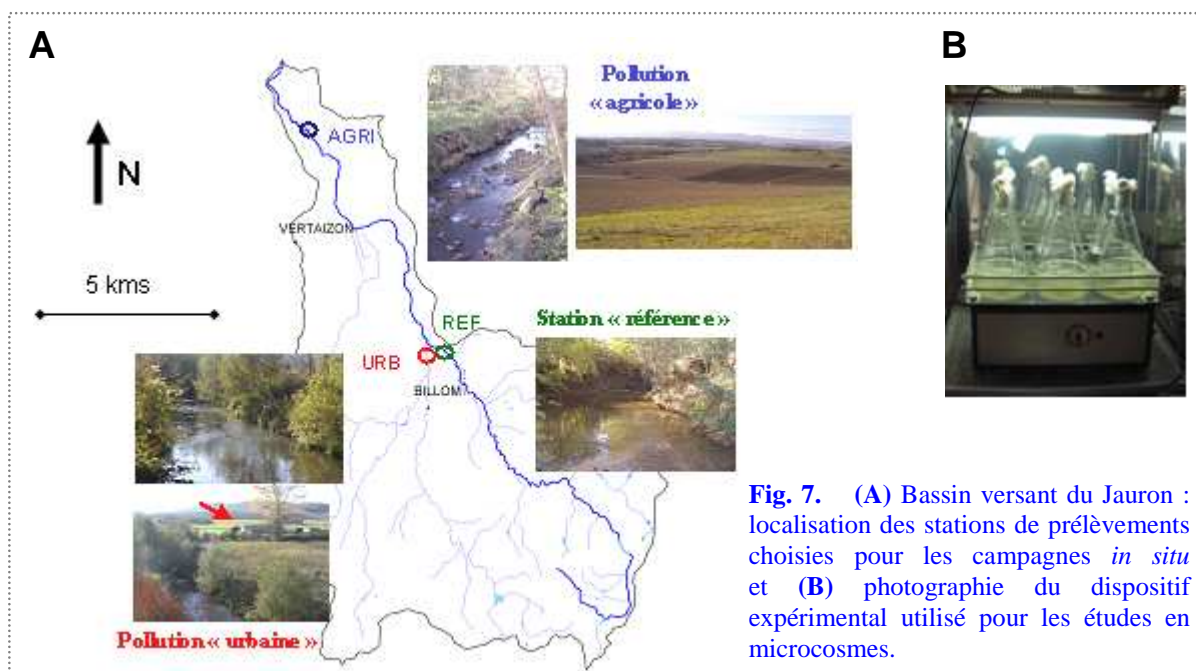
C'est dans ce contexte scientifique que j'ai réalisé mes travaux de thèse, entre 2003 et 2006, avec pour objectif d'évaluer les effets de pesticides sur l'activité et la diversité des communautés microbiennes d'un milieu lotique récepteur, en choisissant comme site d'étude une rivière située en Auvergne, le Jauron (Puy-de-Dôme). Les principales originalités de ce travail résidaient i) dans l'étude simultanée des communautés algales et bactériennes et, ii) dans la réalisation d'un suivi *in situ* pendant deux années consécutives, complété par des approches expérimentales en microcosmes. Les méthodologies utilisées et les principales conclusions de ce travail sont décrites dans le paragraphe suivant.

II.3. Effets de pesticides sur des communautés microbiennes de rivière

II.3.1. Approches et méthodologies utilisées

Le Jauron est un affluent de l'Allier avec laquelle il conflue au niveau de la localité de Beauregard-l'Évêque (Puy-de-Dôme). Cette rivière présente un bassin versant de 119 km², caractérisé par une région d'élevage en amont et une zone de culture céréalière intensive en aval. Compte tenu de ces caractéristiques, trois stations d'échantillonnage ont été sélectionnées afin de suivre mensuellement et pendant deux années consécutives (2003 et 2004), l'évolution des communautés microbiennes dans ce cours d'eau, en fonction des différents paramètres environnementaux, et en particulier du contexte de pollution par les pesticides (Fig. 7A) : i) la station localisée la plus en amont collecte des eaux très faiblement polluées par des pesticides et est ainsi considérée comme station de référence (REF), ii) la station située en aval du rejet d'une station d'épuration (ville de Billom, 5000 équivalent habitants) est réceptrice d'une pollution urbaine (URB), et iii) la station proche de l'exutoire du bassin versant est située dans une région de cultures intensives et est ainsi assujettie majoritairement à une pollution d'origine agricole (AGRI).

Pour appuyer les observations réalisées *in situ*, ce suivi a été couplé à des approches en microcosmes (Fig. 7B) visant à appréhender les effets individuels de deux herbicides récurrents dans le Jauron, le diuron et le glyphosate, sur les communautés algales et bactériennes issues de cette rivière.



Pour ces deux approches complémentaires, l'impact des molécules sur les algues planctoniques et périphytiques a été appréhendé en termes de biomasse (dosage de chlorophylle-*a*), de densité cellulaire et de diversité (identifications taxonomiques). La réponse du compartiment bactérien a été appréciée à partir de paramètres quantitatifs tels que la mesure de la densité cellulaire (par microscopie en épifluorescence), l'estimation de la production hétérotrophe (par incorporation de thymidine tritiée) et

l'évaluation de l'activité respiratoire (par marquage au CTC), mais aussi qualitatifs, à l'aide de techniques issues de la biologie moléculaire (méthodes FISH et PCR-TTGE), afin de percevoir les effets des pesticides sur la structure et la diversité génétique de cette communauté. Ces approches moléculaires, si elles étaient alors très utilisées en écologie microbienne, restaient particulièrement sous exploitées dans le cadre des recherches en écotoxicologie (Dorigo et al., 2005).

II.3.2. Principales conclusions de l'approche *in situ*

Dans le Jauron, la période de pollution la plus significative s'étend du mois d'avril au mois d'octobre, ce qui correspond à la principale période d'épandage des pesticides sur le bassin versant, avec des variations inter-annuelles très marquées au cours des deux années d'étude (2003 et 2004). Une trentaine de molécules a été détectée sur l'ensemble des prélèvements effectués durant le suivi avec une large prédominance des substances à propriétés herbicides (Fig. 8).

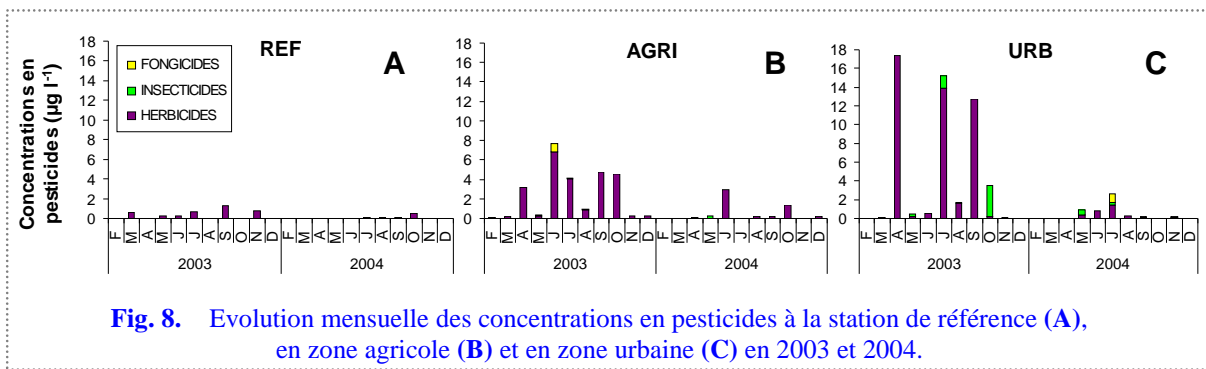


Fig. 8. Evolution mensuelle des concentrations en pesticides à la station de référence (A), en zone agricole (B) et en zone urbaine (C) en 2003 et 2004.

Les paramètres microbiens considérés ont montré que la sévérité de l'impact dans le milieu est fonction du niveau de contamination et de la nature des pesticides (présents en mélange), mais aussi des concentrations en nutriments qui représentent, sur les stations choisies, un facteur de confusion important dans l'évaluation de la réponse des communautés microbiennes aux pesticides (A3). De par la prédominance des herbicides dans le cours d'eau, les communautés algales sont les plus directement exposées à la toxicité des polluants. C'est au printemps, en début de la période de pollution, que les effets sont les plus marqués. La présence des herbicides affecte alors, immédiatement ou après un léger délai, l'efflorescence printanière des communautés algales libres et fixées. Les effets directs et/ou indirects des pesticides sur le compartiment bactérien sont plus difficilement perceptibles dans le Jauron. L'analyse de la structure des communautés bactériennes, à une échelle taxonomique assez large (méthode FISH) ou à un niveau de résolution plus fin (méthode TTGE après amplification d'un fragment du gène codant l'ARNr 16S), a permis toutefois de visualiser de forts remaniements de diversité lors des principales périodes de pollution. Cependant, même si ces variations sont vraisemblablement conditionnées en partie par la présence de pesticides, il est très difficile de caractériser et de quantifier l'influence exacte de ces polluants sur l'évolution de la communauté.

Ces travaux ont donc permis de mettre en évidence la limite des descripteurs microbiens globaux, qu'ils relèvent d'une analyse structurale (biomasse, diversité) ou fonctionnelle (respiration, production

bactérienne), pour réellement apprécier les effets des pesticides dans un milieu naturel complexe (A3). Ce constat a été confirmé récemment par Ricart et al. (2010), qui ont souligné les difficultés à pouvoir clairement relier le niveau d'exposition aux pesticides à la réponse structurale et fonctionnelle de communautés microbiennes périphytiques dans une rivière espagnole. Cela est dû pour partie à la grande sensibilité de ces descripteurs microbiens à de faibles variations des conditions environnementales (ex. conditions lumineuses ou hydrodynamiques, Villeneuve et al. 2010), mais également aux interactions possibles entre les différents facteurs biotiques et abiotiques, qui peuvent moduler la réponse des communautés microbiennes aux toxiques (Sabater et al., 2007).

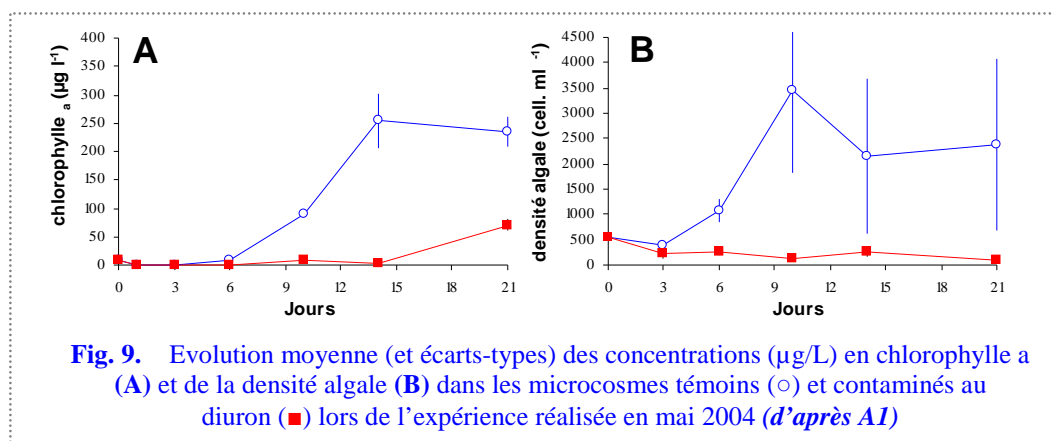
II.3.3. Effets du diuron sur les communautés phototrophes et hétérotrophes

Les expériences en microcosmes ont été menées à partir de communautés planctoniques et périphytiques naturelles, prélevées dans le Jauron à différentes périodes de l'année et exposées pendant trois semaines à une concentration nominale en diuron ou en glyphosate de 10 µg/L. Ces études visaient à appréhender, dans un contexte simplifié limitant l'influence des multiples facteurs environnementaux, les effets individuels de ces deux herbicides présents de façon récurrente dans la rivière.

Le diuron (N-(3,4-dichlorophényl)-N',N'-diméthylurée) est un herbicide de la famille des phenylurées qui inhibe la photosynthèse au niveau du photosystème II. Il fait partie des herbicides qui présentent la toxicité la plus forte sur l'activité photosynthétique des microalgues (Brown et Lean, 1995, A14). Cependant, nous avons enregistré pour ce toxique des variations importantes dans l'intensité et le délai de réponse des communautés phototrophes durant les différentes expériences. Les résultats ont ainsi montré que le niveau de sensibilité d'une communauté algale naturelle est conditionné par (1) son stade de développement (« pré » ou « post » bloom...), (2) son état physiologique et (3) sa composition taxonomique.

Ainsi, sur des communautés printanières qui présentent une forte biomasse et sont composées principalement des genres *Navicula*, *Nitzschia* et *Gomphonema*, le diuron n'entraîne aucun effet perceptible tant d'un point de vue quantitatif que qualitatif.

A l'opposé, il engendre un impact sévère sur des communautés plus diversifiées, qui présentent de faibles biomasses au regard du contexte nutritif et thermique, suggérant ainsi un état physiologique initial déficient (A1). A une concentration mesurée proche de 8 µg/L pendant les 21 jours d'exposition, le diuron contraint alors fortement le développement phytoplanctonique et maintient la biomasse (Fig. 9A) et la densité cellulaire (Fig. 9B) à leurs faibles niveaux initiaux. Cet herbicide réduit la diversité taxonomique puisque seulement quatre genres, *Navicula*, *Nitzschia*, *Gomphonema* et *Scenedesmus*, persistent en présence du polluant alors que les espèces des genres *Asterionella*, *Oocystis* et surtout *Cyclotella* semblent particulièrement sensibles au diuron (A1).

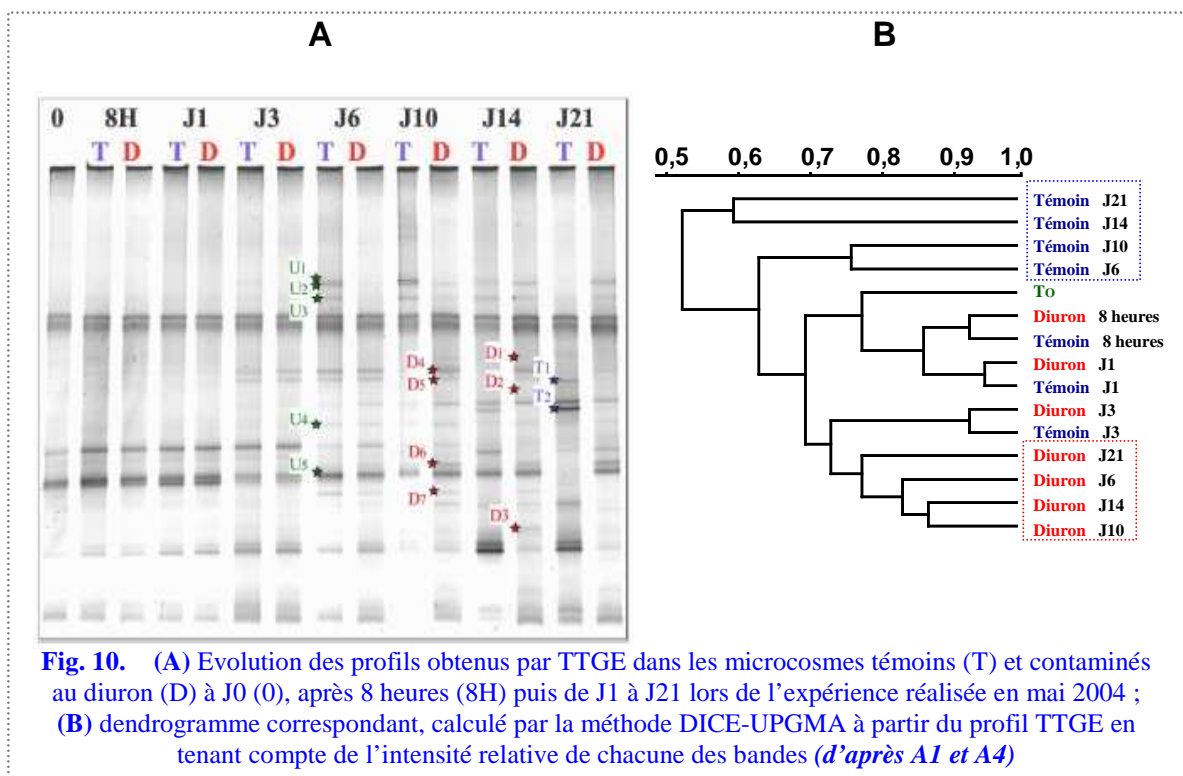


Depuis ma thèse, les effets du diuron sur les communautés microbiennes aquatiques phototrophes ont été appréhendés dans de nombreuses études (Tableau 1). Celles-ci ont confirmé une inhibition de la biomasse algale et la production primaire de communautés naturelles planctoniques (Perschbacher et Ludwig, 2004; Knauer et al., 2008, 2009; Knauer et al., 2010) et périphytiques (McClellan et al., 2008; Tlili et al., 2008, 2010; Ricart et al., 2009; López-Doval et al., 2010) suite à une exposition chronique à de faibles concentrations en diuron (quelques µg/L). Plusieurs ont également souligné l'impact de ce type d'exposition sur la structure et la diversité des communautés (Perschbacher et Ludwig, 2004 ; McClellan et al., 2008; Ricart et al., 2009 ; Tlili et al., 2010) mais également sur les biovolumes algaux (Ricart et al., 2009 ; Leboulanger et al., 2011). Cependant, les travaux de Tlili et al. (2008, 2010) ont montré que les effets du diuron sont conditionnés par différents facteurs environnementaux tels que le mode d'exposition (chronique vs aiguë ; Tlili et al., 2008) ou le contexte nutritif, les effets du diuron sur le compartiment algal étant moins marqués lorsque les concentrations en phosphates sont élevées (Tlili et al., 2010).

Systèmes expérimentaux	Conc.(µg/L)	Communautés	Paramètres	Référence
bioessais: Exposition court-terme (2h)	4662	périphyton	production primaire	Francoeur et al. 2007
mésocosmes de 10000L (96 ou 173 jours)	5	phytoplancton	production primaire composition algale PICT	Knauer et al. 2008, 2009 Knauer et al. 2010
microcosmes de 20L (5 jours)	2,2 ; 11	phytoplancton	chlorophylle a biovolumes composition algale	Leboulanger et al. 2011
canaux artificiels de laboratoire (29 jours)	2	périphyton	chlorophylle a production primaire	López-Doval et al. 2010
microcosmes de 15L (11-12 semaines)	0,0032-50	périphyton	production primaire composition algale PICT	McClellan et al. 2008
mésocosmes de 500L (28 jours)	0,2-20	phytoplancton	chlorophylle a production primaire composition algale	Perschbacher et Ludwig 2004
canaux artificiels de laboratoire (29 jours)	0,07-7	périphyton	chlorophylle a production primaire biovolumes composition algale	Ricart et al. 2009
microcosmes de 35L (28 jours)	1 (+/- pulses ponctuels; 7 ou 14)	périphyton	chlorophylle a production primaire composition algale PICT	Tlili et al. 2008
microcosmes de 35L (21 jours)	10	périphyton	chlorophylle a production primaire composition algale PICT	Tlili et al. 2010

Tableau 1. Liste des travaux visant à étudier les effets du diuron sur les communautés microbiennes phototrophes des milieux dulcicoles (*d'après AI4*)

Les interactions algues-bactéries sont très fortes dans les dispositifs expérimentaux où les microorganismes hétérotrophes ne peuvent bénéficier d'apports organiques allochtones et sont fortement tributaires de la charge de matière organique initiale puis de celle libérée par le compartiment algal. S'il inhibe le développement algal, le diuron peut donc limiter indirectement le développement bactérien tant d'un point de vue quantitatif (densité, production hétérotrophe, activité respiratoire) que qualitatif au niveau de la diversité génétique de cette communauté (Fig. 10 ; A1, A4). Depuis mes travaux, l'impact direct ou indirect d'une exposition chronique au diuron sur la structure et la fonctionnalité des communautés bactériennes aquatiques a été confirmé par plusieurs auteurs (Thili et al., 2008, 2010; Ricart et al., 2009; Tadolnéké et al., 2009 ; Vercreane-Eairmal et al., 2010).



Outre l'analyse de la structure de la communauté bactérienne, l'approche par PCR-TTGE nous a également permis de découper et séquencer des bandes « d'intérêt » sur le gel obtenu lors de l'expérience réalisée en mai 2004 (Fig. 10A). Nous avons ainsi montré que certains phylotypes qui apparaissent seulement dans les microcosmes contrôles (bandes T) et qui semblent particulièrement affectés par la présence du diuron appartiennent aux phyla des *Chlamydiae* alors que ceux qui semblent au contraire être favorisés, directement ou indirectement, par la présence de ce toxique (bandes D) appartiennent aux γ -*Proteobacteria*, et plus spécialement aux *Pseudomonadaceae*, aux *Verrucomicrobia*, aux *Gemmatimonadetes* et aux *Actinobacteria*. (A4).

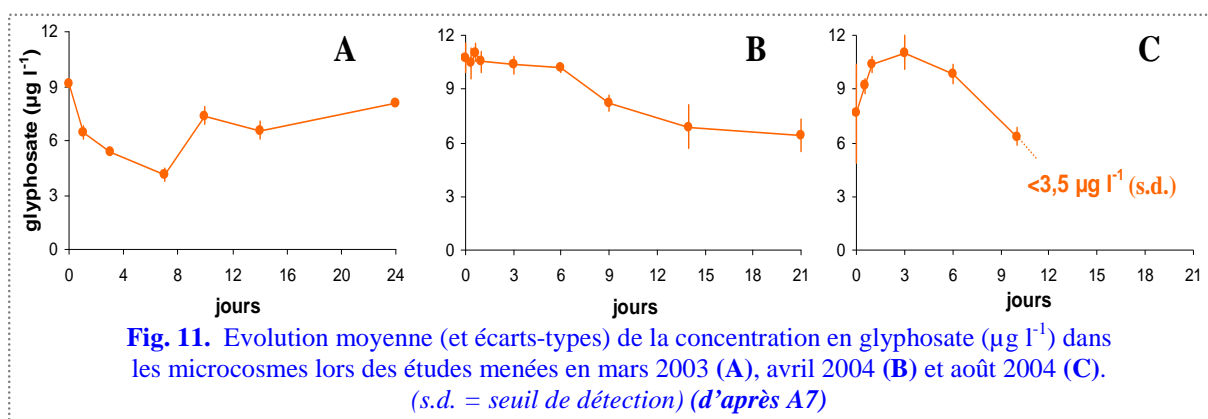
II.3.4. Effets du glyphosate sur les communautés phototrophes et hétérotrophes

Le glyphosate (N-(phosphonométhyl) glycine) est un herbicide à large spectre qui agit en inhibant l'activité d'une enzyme jouant un rôle clé dans la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques: la 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. Non sélectif, il représente un des herbicides les plus utilisés au monde pour le contrôle des mauvaises herbes dans les domaines agricoles, industriels et domestiques (Kolpin et al., 2006; Helander et al., 2012).

Les expériences réalisées durant ma thèse ont montré qu'à la même concentration nominale que celle testée pour le diuron (10 µg/L), le glyphosate n'affecte pas la croissance d'une communauté algale présentant des caractéristiques physiologiques et taxonomiques comparables à celles décrites précédemment. En revanche, comme le diuron, il entraîne une diminution de la diversité taxonomique en empêchant le développement et/ou le maintien des espèces les plus sensibles, en particulier celles appartenant au genre *Oocystis* (A7).

Le glyphosate n'ayant pas (ou peu) d'effet sur la biomasse algale, la production hétérotrophe n'est pas influencée indirectement par la présence du polluant. En revanche, cet herbicide peut engendrer des variations au niveau de la structure de la communauté bactérienne (appréhendée par PCR-TTGE), soit par effet indirect, suite à la simplification de la composition de la communauté algale, soit par un effet direct favorisant le développement d'espèces impliquées dans les processus de dégradation de cet herbicide. A une concentration légèrement supérieure à celles généralement observées dans l'environnement, les effets du glyphosate sur les communautés microbiennes n'ont donc été perçus dans nos travaux qu'au niveau de la structure et de la diversité des communautés microbiennes.

Comme pour le diuron, ces effets sont cependant variables suivant la saison et les caractéristiques des communautés prélevées *in situ*. Ces variables de saisonnalité conditionnent fortement les réponses biologiques mais également la cinétique du glyphosate dans les microcosmes, modulant ainsi l'exposition des microorganismes à ce toxique (Fig. 11 ; A7).



Etonnamment, et malgré la présence importante des résidus du glyphosate et de son principal métabolite, l'acide aminométhylphosphonique (AMPA) dans les eaux de surface, l'impact de ces molécules sur les communautés microbiennes aquatiques a été peu étudié ces dernières années. Il est notamment intéressant de constater que les effets chroniques de faibles concentrations en glyphosate

sur ces communautés sont encore largement méconnus, puisque la plupart des données disponibles concernent des expositions à des concentrations comprises entre 0,125 et 12,5 mg/L (voir pour revue [A14](#)), y compris dans les travaux les plus récents (ex. Vera et al., 2010, 2012). Testant un niveau de contamination plus « réaliste » (i.e. 6,9 µg/L de glyphosate), Relyea (2009) a cependant montré que la formulation commerciale Roundup® semble avoir un effet insignifiant sur la biomasse algale planctonique et périphytique, confirmant ainsi les résultats obtenus lors de ma thèse. Des observations similaires ont également été reportées par Stachowski-Haberkorn et al. (2008) avec des communautés planctoniques marines exposées pendant 7 jours à 1 µg/L et 10 µg/L de glyphosate sous sa forme commerciale Roundup®. A ces concentrations, ils ont en effet mis en évidence l'absence d'impact sur les concentrations en chlorophylle-*a* et les densités cellulaires, alors que des modifications structurelles interviennent au sein des communautés microbiennes procaryotes et eucaryotes, quel que soit le niveau d'exposition.

L'ensemble de ces résultats confirme donc i) la nécessité de ne pas se limiter à des descripteurs quantitatifs pour appréhender les effets de faibles doses de pesticides sur les communautés microbiennes, et ii) l'intérêt de considérer à la fois les compartiments phototrophes et hétérotrophes dans les approches écotoxicologiques.

II.4. Adaptation des communautés microbienne aux pesticides

II.4.1. Adaptation microbienne et écotoxicologie

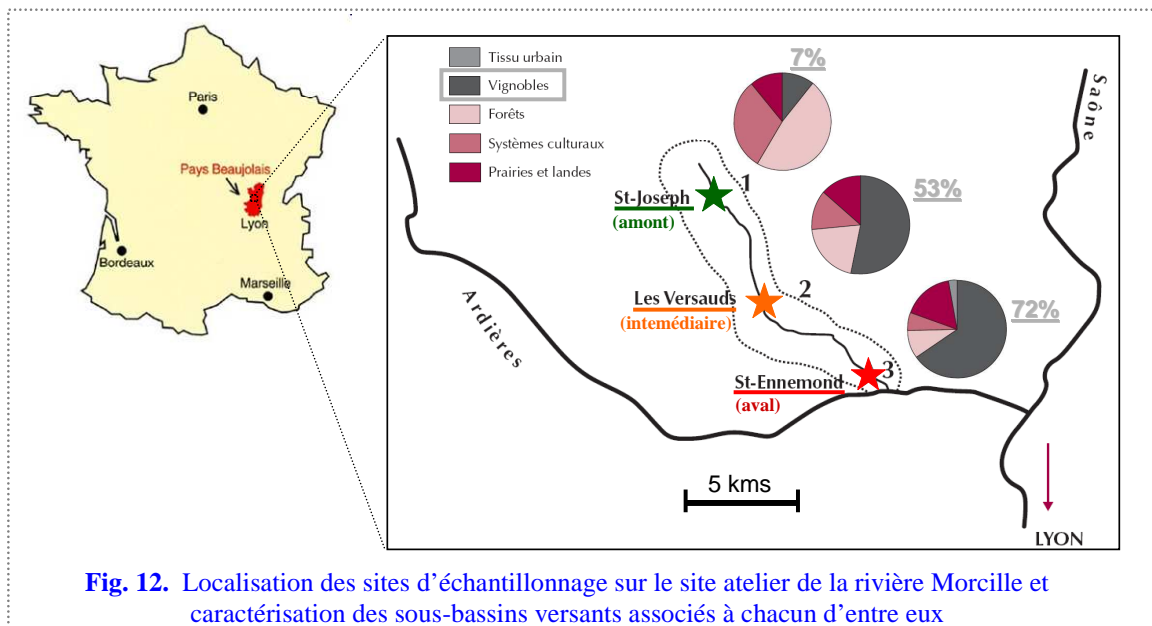
Parmi les principaux défis de l'écotoxicologie, le développement d'outils permettant d'établir les liens entre exposition aux toxiques et effets biologiques représente un enjeu particulièrement important en vue d'appréhender finement l'impact des contaminants sur la qualité écologique des milieux récepteurs. Cette tâche s'avère d'autant plus délicate que la contamination de l'environnement s'inscrit dans un contexte de changement global et les écosystèmes sont généralement soumis à des situations de multi-stress qui découlent de la multiplicité des pressions chimiques (pollutions toxiques et trophiques) et/ou physiques. De ce fait, il est souvent délicat de réellement distinguer les effets des toxiques parmi les changements biologiques observés au sein des communautés exposées.

L'exposition chronique des communautés microbiennes à de faibles doses de toxiques organiques ou inorganiques peut se traduire par la sélection d'espèces tolérantes mais également par des phénomènes d'adaptation génétique ou physiologique. Au sein des communautés microbiennes, ces processus d'adaptation peuvent ainsi engendrer l'acquisition et le développement de capacités de tolérance (concept PICT²⁵, Blanck et al., 1998) ou de biodégradation pour les composés métabolisables (Toräng et al., 2003). L'étude de ces capacités adaptatives, généralement assez spécifiques d'un composé ou d'une famille de composés, s'avère donc très prometteuse pour établir *in situ* des liens entre exposition et effets biologiques sur les communautés microbiennes.

²⁵ Pollution Induced Community Tolerance

Dans ce contexte, une grande partie des travaux réalisés depuis ma thèse s’est portée sur deux types d’approches ciblées sur l’étude des capacités adaptatives des communautés microbiennes suite à une exposition prolongée aux toxiques: i) des approches de type PICT et ii) des approches focalisant sur l’acquisition de capacités de biodégradation des pesticides organiques par les microorganismes hétérotrophes.

Ces travaux se sont centrés sur une problématique de pollution agricole, en s’appuyant principalement sur un site atelier situé au cœur de la région viticole du Beaujolais : la rivière Morcille. Le bassin versant de la Morcille (9,5 km²) est situé au nord du département du Rhône, dans le Haut-Beaujolais, entre la bordure orientale du Massif Central et l’extrémité ouest de la vallée de la Saône (Fig. 12). Il constitue un sous-bassin de l’Ardières (220 km²) avec lequel il compose le site atelier Ardières-Morcille (SAAM), intégré dans la zone atelier du bassin du Rhône (ZABR). Le bassin versant de la Morcille est essentiellement forestier en amont et planté de vignes en aval. Ce plan d’occupation des sols se traduit donc par une augmentation de la proportion relative de vigne sur la surface de bassin versant drainée par le cours d’eau de la station amont (7%) à la station aval (72%) (Fig. 12), ce qui engendre un gradient croissant des teneurs en pesticides tout au long du cours d’eau (Rabiet et al., 2010). De par ces caractéristiques, ce bassin versant représente donc un site de choix pour évaluer dans le cours d’eau récepteur, l’impact de la pollution générée par l’activité viticole.



II.4.2. Approche PICT

Le développement des approches PICT en vue d’améliorer l’évaluation des liens « exposition chimique-effets biologiques sur les communautés microbiennes » représente une problématique scientifique particulièrement structurante au sein du Thème de Recherche BELCA. L’ensemble des recherches présentées ci-dessous s’inscrit donc dans le cadre d’une étroite collaboration entre plusieurs équipes des UR MAEP et REBX appartenant respectivement aux centres Irstea de Lyon et Bordeaux. Ces travaux ont principalement été financés par le programme interne Irstea Pesticides « PestExpo », la convention Irstea-ONEMA « Evaluation et remédiation de l’effet de pesticides » et le programme ANR CESA « POTOMAC ».

II.4.2.1. Généralités

Le concept PICT ou l'acquisition de tolérance induite proposé en 1988 par Blanck et al. est basé sur le fait qu'une communauté biologique naturelle est constituée de différentes entités (populations, espèces, souches) ayant des sensibilités variables vis-à-vis d'un toxique donné.

L'exposition chronique d'une communauté à ce toxique se traduira donc généralement par la sélection des organismes les plus tolérants, accompagnée éventuellement par la mise en place de mécanismes de résistance chez certaines espèces. La communauté résultant de ces changements présentera alors, dans son ensemble, une tolérance vis-à-vis du toxique supérieure à celle d'une communauté n'ayant pas subi de pression de sélection par ce toxique. Cette différence de tolérance, que l'on peut évaluer *in-vitro* par des bioessais à courte durée en laboratoire avec des concentrations croissantes en toxique, peut ainsi renseigner sur l'historique d'exposition préalable au toxique des différentes communautés échantillonnées (Fig. 13).

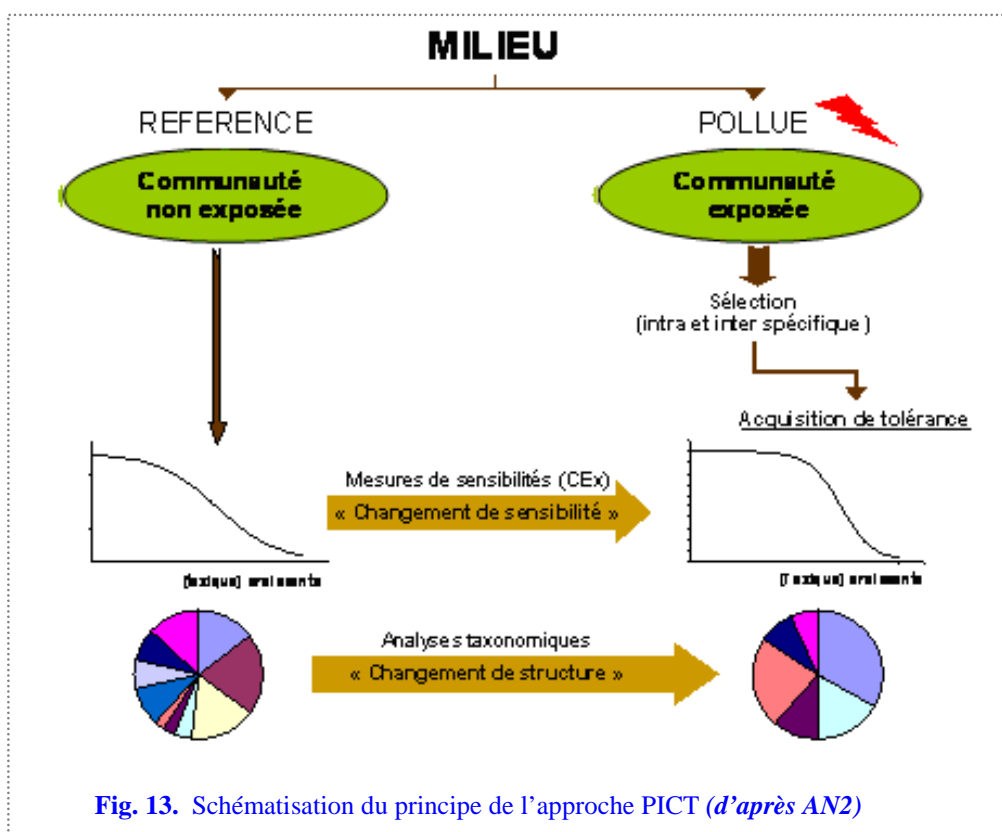


Fig. 13. Schématisation du principe de l'approche PICT (d'après AN2)

Plusieurs articles de synthèses ont repris et analysé les travaux mettant en œuvre des approches PICT avec des communautés microbiennes aquatiques et terrestres (Blanck, 2002 ; Imfeld et al., 2010 ; Tlili et Montuelle 2010). Ils ont permis de mettre clairement en évidence le fort potentiel du PICT dans les procédures d'évaluation de risque, du fait notamment de l'intérêt de considérer les microorganismes à l'échelle des communautés mais également de pouvoir renseigner sur un niveau chronique d'exposition tout en établissant un lien entre pression chimique et impact biologique.

II.4.2.2. Evaluation in situ du lien entre niveau d'exposition et niveau de tolérance

La plupart des approches PICT menées en milieu aquatique ont concerné les communautés phototrophes, en considérant la photosynthèse comme paramètre fonctionnel pour mesurer leur niveau de tolérance à des herbicides organiques ou des métaux (Tableau 2 ; Tlili et Montuelle 2010).

Communautés phototrophes	Paramètres structurels	Références
Phytoplancton	Diversité taxonomique (microscopie)	Wangberg et al. 1991; Nyström et al. 2000; Paulsson et al. 2000; Soldo et Behra 2000; Bérard et Benninghoff 2001; Schmitt-Jansen et Altenburger 2005; Hjorth et al. 2006; Dorigo et al. 2007; Navarro et al. 2008; McClellan et al. 2008; Schmitt-Jansen et Altenburger 2008; Tlili et al. 2008; Eriksson et al. 2009; Blanck et al. 2009; Debenest et al. 2009; Pesce et al. 2010 (A9, A12)
Périphyton	Diversité moléculaire (PCR-DGGE, PCR-TTGE, PFGE)	
	Diversité pigmentaire (HPLC, PhytoPAM)	

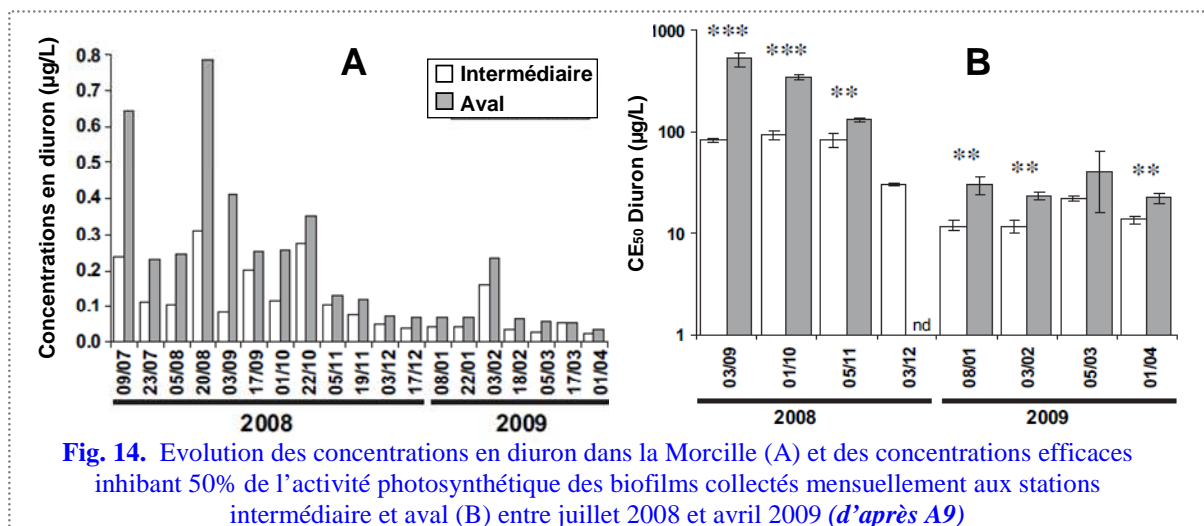
Tableau 2. Exemples d'études mettant en œuvre des approches PICT en milieu aquatique en considérant l'activité photosynthétique comme descripteur fonctionnel (d'après Tlili et Montuelle, 2010)

Tous ces travaux confirment que le niveau de tolérance des communautés phototrophes à ces toxiques peut augmenter suite à une exposition chronique, qu'elle ait lieu en milieu naturel ou en conditions contrôlées. Cependant, ce niveau peut être modulé par i) des facteurs environnementaux externes tels que les conditions lumineuses (Guasch et al., 1998; Guasch et Sabater, 1998), le contexte nutritif (Tlili et al., 2010) ou la présence d'autres toxiques pouvant entraîner des phénomènes de cotolérance (Schmitt-Jansen et al., 2008 ; Tlili et al., 2011a) et ii) des propriétés biologiques intrinsèques, telles que la biomasse dans le cas des communautés périphytiques (Guasch et al., 2003).

Ces observations soulèvent donc la question de la signification réelle de l'évolution du niveau de tolérance des communautés dans le milieu naturel et de l'importance relative du niveau d'exposition au toxique étudié par rapport à l'ensemble des facteurs pouvant fluctuer dans un environnement complexe (A9 ; Tlili et al., 2011b).

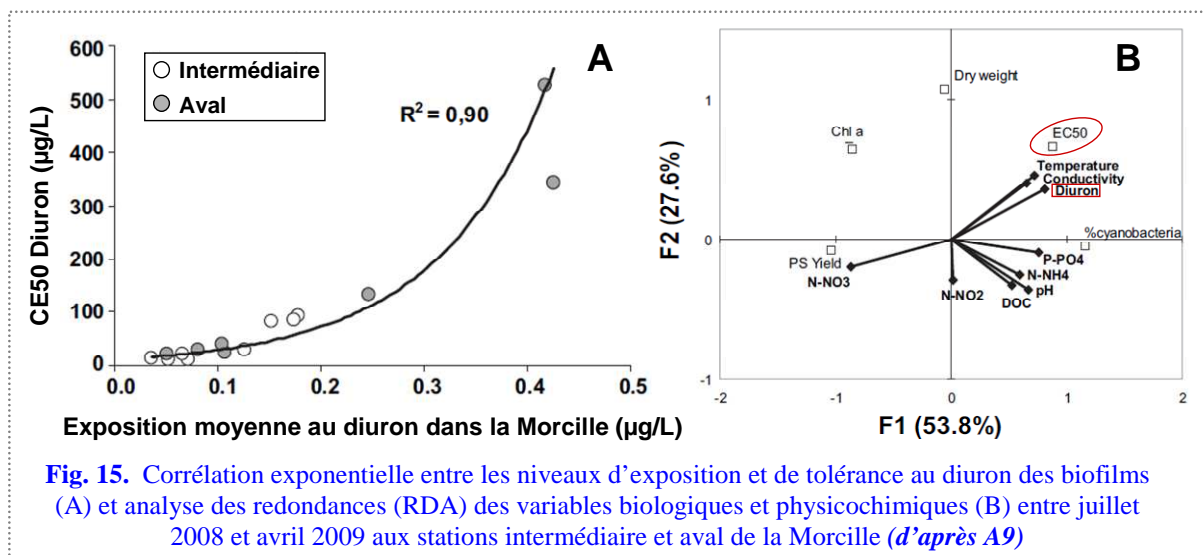
Afin de répondre à celle-ci, dans le contexte particulier de la Morcille, une approche PICT a été réalisée sur cette rivière afin d'évaluer pendant 9 mois (août 2008-avril 2009) les variations spatio-temporelles du niveau de tolérance des communautés phototrophes au diuron, herbicide très largement utilisé sur le bassin versant avant son interdiction²⁶ et fortement majoritaire parmi les herbicides retrouvés dans le cours d'eau. Pour ce faire, un suivi chimique intensif a été réalisé à partir d'analyses réalisées bimensuellement. Le niveau de tolérance au diuron des communautés périphytiques autotrophes, collectées mensuellement sur substrats artificiels (lames de verre) aux trois stations d'échantillonnage, a été apprécié à partir de tests de toxicité aiguë effectués en laboratoire (A9). Brièvement, les biofilms ont été soumis au laboratoire à des concentrations croissantes en diuron (0,2 µg/L à 2 mg/L, 3h30 d'exposition) et la réponse microbienne, en fonction du niveau d'exposition, a été appréciée par mesure du rendement photosynthétique à l'aide d'un fluorimètre à lumière modulée (PhytoPAM). Les courbes dose-réponse obtenues ont permis de déterminer, pour chaque échantillon, la concentration efficace en diuron inhibant de moitié le rendement photosynthétique (CE₅₀).

²⁶ Le diuron est interdit d'utilisation en zones agricoles et en zones non agricoles depuis le 13 décembre 2008



Les analyses de diuron confirment le gradient spatial de contamination le long du cours d'eau, et ce, quelle que soit la période de l'année, puisque les concentrations mesurées sont toujours plus élevées au niveau de la station la plus en aval (Fig. 14A). Elles font également apparaître une tendance saisonnière avec une diminution des concentrations diuron en zone contaminée dès le début de l'automne, après la principale période de traitement des vignes.

En parallèle, les mesures de CE_{50} révèlent une concomitance entre les variations spatio-temporelles des concentrations en diuron dans le cours d'eau et celles du niveau de tolérance des communautés phototrophes à cet herbicide (Fig. 14B). En effet, les CE_{50} obtenues, qui augmentent entre la station intermédiaire et la station aval, révèlent une augmentation graduelle des capacités de tolérance des communautés le long du cours d'eau, quelle que soit la période considérée. Parallèlement, une variation saisonnière est observée, avec des CE_{50} hivernales faibles (<40 µg/L maximum quelle que soit la station) très inférieures à celles mesurées à la fin de l'été (jusqu'à 500 µg/L en aval). Ces observations sont confirmées par les analyses statistiques qui révèlent une forte corrélation entre le niveau d'exposition moyen des biofilms au diuron durant leur croissance dans la Morcille (2 mois) et leur niveau de tolérance à cet herbicide lors des tests de toxicité en laboratoire (Fig. 15).



Dans le contexte de la Morcille, ces travaux ont donc clairement démontré la pertinence de ce type d'approche pour établir un lien entre exposition et effet dans le milieu naturel, en tenant compte des variations spatio-temporelles du niveau de contamination par l'herbicide diuron. Un suivi similaire, réalisé par Tlili et al. (2011b) sur la rivière Osor, située en Catalogne (Espagne), a également permis de mettre en évidence que les variations spatio-temporelles du niveau de tolérance de la composante phototrophe de biofilms au zinc sont très majoritairement conditionnées par leur niveau d'exposition (concentrations et durée) à ce métal dans le milieu. Considérant aussi dans cette étude la composante hétérotrophe, à l'aide d'une approche PICT réalisée à partir de tests de toxicité basés sur le niveau de respiration induite par le glucose (SIR²⁷), ils ont cependant montré que le niveau de tolérance de ces communautés est moins directement relié au niveau d'exposition car il est également fortement influencé par l'ensemble des paramètres environnementaux mesurés. Cela est cohérent avec les résultats décrits précédemment par Tlili et al. (2010), qui avaient démontré par le même type d'approche PICT (basée sur des mesures de SIR), une forte influence des concentrations en phosphore sur l'acquisition de tolérance des communautés hétérotrophes à un autre polluant métallique (le cuivre) alors que le niveau de tolérance des communautés phototrophes à ce toxique (sur la base de l'efficacité photosynthétique) restait relativement constant, quelles que soient les teneurs en phosphore dans le milieu.

L'ensemble de ces résultats confirme donc l'intérêt de l'approche PICT dans une démarche d'évaluation de la qualité écologique des milieux aquatiques mais ils soulignent également la nécessité de parfaire les développements, pour pouvoir notamment l'appliquer à des toxiques n'ayant pas d'effet sur les activités photosynthétiques, afin d'élargir la gamme des molécules pouvant être prises en considération dans ce type de démarche.

II.4.2.3. Utilisation du PICT pour apprécier l'impact de mélanges de toxiques

Un des points cruciaux, tant pour l'amélioration des procédures d'évaluation des risques que pour la caractérisation des effets des pesticides, concerne la prise en considération des interactions entre les substances dans des mélanges complexes, tels que ceux rencontrés dans l'environnement (Chèvre et al., 2006 ; Van den Brink, 2009). Se pose notamment le problème des métabolites, souvent présents en combinaison avec leur(s) molécule(s) mère(s) dans les milieux contaminés, alors qu'ils sont généralement peu considérés dans les travaux d'écotoxicologie, surtout lorsqu'ils sont réalisés à l'échelle des communautés (Sinclair et Boxall, 2003).

Concernant le diuron, sa présence combinée avec deux de ses principaux métabolites, le DCPMU²⁸ et la 3,4-DCA²⁹, a ainsi été reportée dans différentes eaux de surface (ex. Field et al., 1997 ; Claver et al., 2006 ; Morin et al., 2009) et notamment dans la Morcille (Dorigo et al., 2007).

²⁷ SIR : substrate induced respiration

²⁸ DCPMU: N-(3,4-dichlorophenyl)-N-méthylurée

²⁹ 3,4-DCA : 3,4-dichloroaniline

Des études réalisées avec des cultures algales monospécifiques montrent que le diuron présente une toxicité plus forte que ses métabolites sur l'activité photosynthétique et que les effets de la 3,4-DCA sont très limités sur ce paramètre (Gatidou et Thomaidis, 2007 ; Neuwoehner et al., 2010). Sur ces cultures, la combinaison du diuron avec le DCPMU résulte en un effet additif (CA³⁰) alors qu'elle répond au modèle d'indépendance d'effet (IA³¹) avec la 3,4-DCA (Neuwoehner et al., 2010). Cependant, le manque de connaissances concernant la réponse de communautés complexes à ce type de mélanges est flagrant.

En conséquence, et afin d'étudier les effets des métabolites du diuron sur des communautés phototrophes naturelles, une nouvelle approche PICT a été réalisée sur la Morcille, en considérant à la fois le diuron, le DCPMU et la 3,4-DCA, seuls ou en mélange (A12). Ce suivi a permis de confirmer l'ordre décroissant de toxicité : diuron>DCPMU>3,4-DCA (Fig. 16A). Il a également permis de montrer que l'augmentation spatiale du niveau de tolérance le long de la rivière est visible pour le diuron mais aussi pour le DCPMU, dont les concentrations sont également plus élevées dans la zone aval (Fig. 16B), suggérant que les approches PICT sont tout à fait applicables aux métabolites. Cependant, cette observation n'est pas vérifiée dans le cas de la 3,4-DCA, dont les concentrations dans la Morcille (détectées mais non quantifiables) et la toxicité (CE₅₀>8 mg/L), sont vraisemblablement trop faibles pour induire le développement des capacités de tolérance.

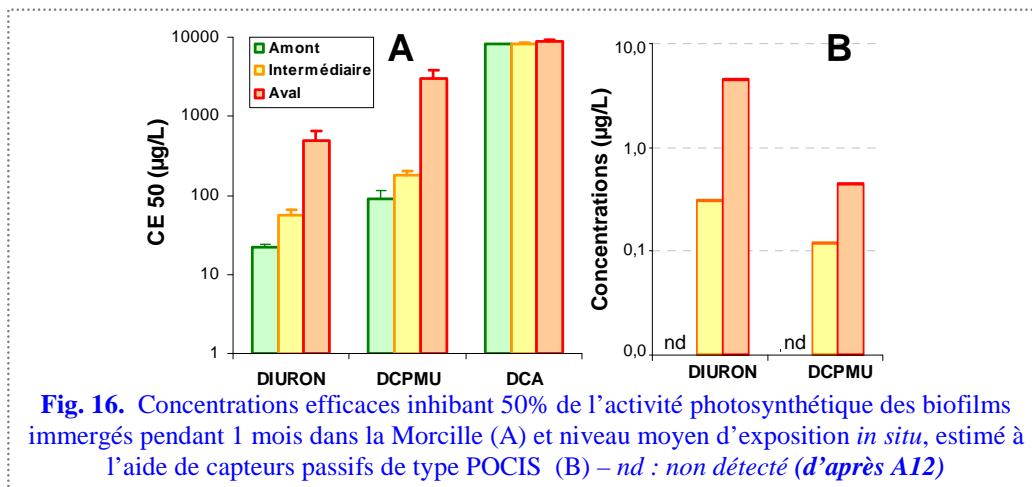


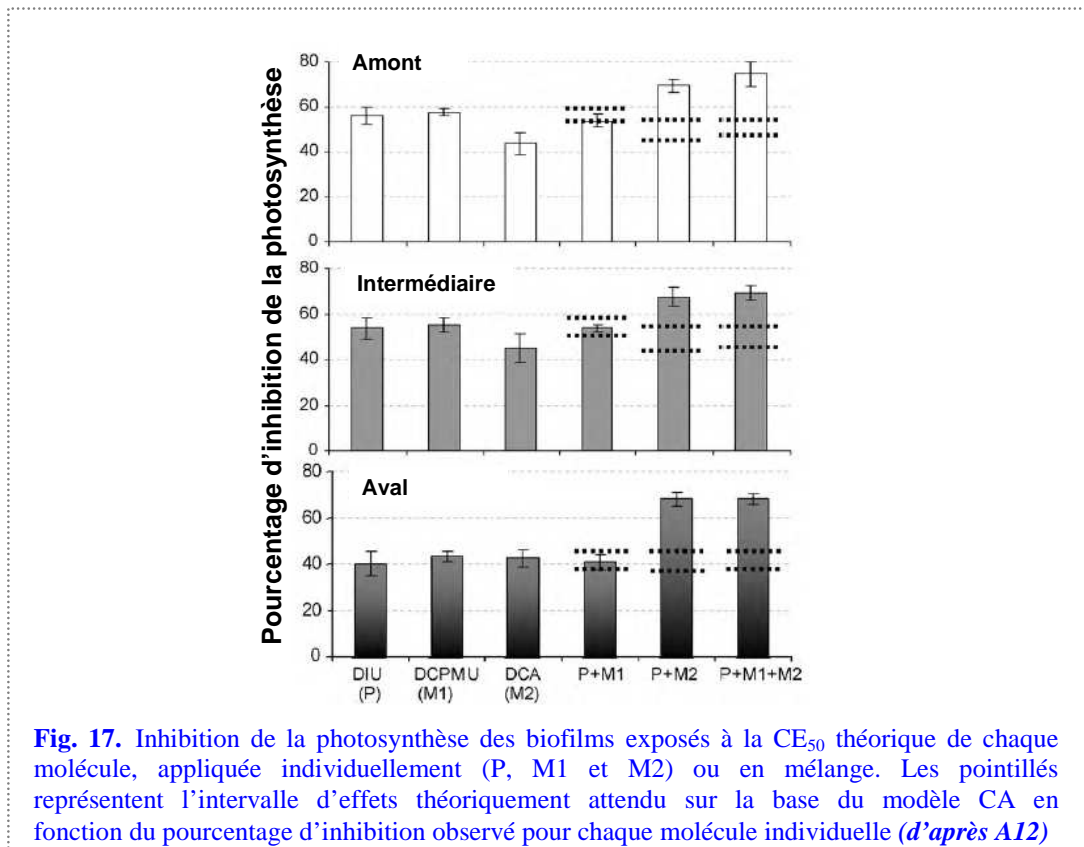
Fig. 16. Concentrations efficaces inhibant 50% de l'activité photosynthétique des biofilms immergés pendant 1 mois dans la Morcille (A) et niveau moyen d'exposition *in situ*, estimé à l'aide de capteurs passifs de type POCIS (B) – nd : non détecté (d'après A12)

L'évaluation de la toxicité des mélanges et sa comparaison avec celle des molécules individuelles ont été réalisées sur la base de l'hypothèse d'additivité. Dans le cas de combinaisons binaires (diuron+DCPMU ou diuron+3,4-DCA), les communautés provenant de chacun des trois sites ont ainsi été exposées à des mélanges contenant la moitié des CE₅₀ correspondantes (estimées au préalable et décrites dans la Fig. 16a). La procédure est identique dans le cas du mélange des trois molécules (diuron+DCPMU+3,4-DCA), celui-ci étant alors composé du 1/3 de chaque CE₅₀. Dans les deux cas, ce type de combinaison doit théoriquement engendrer une inhibition de 50% de la photosynthèse si le modèle CA est vérifié (Knauert et al., 2008).

³⁰ CA : concentration addition

³¹ IA : independent action

Les résultats obtenus confirment que la combinaison du diuron et du DCPMU engendre un effet additif comme cela avaient été décrits par Neuwoehner et al. (2010), et ce quel que soit le site d'origine des communautés, suggérant que l'acquisition de tolérance ne modifie en rien l'interaction entre les molécules (Fig. 17). La présence de 3,4-DCA, induit un effet synergique mais compte tenu des concentrations testées dans les mélanges (>1,5 mg/L de 3,4-DCA), cette synergie est vraisemblablement inexistante (ou négligeable) dans l'environnement.



Cette étude particulièrement novatrice montre qu'il est possible de mettre en œuvre des approches PICT pour la problématique des mélanges de substances. Cependant, la méthodologie utilisée présente plusieurs inconvénients, à commencer par la nécessité de bien connaître les molécules présentes dans le milieu et une lourdeur expérimentale qui découle du besoin de caractériser au préalable les CEx de chaque molécule avant de pouvoir tester les interactions en mélange. Compte tenu des multiples combinaisons possibles dans le cas de mélanges complexes, ce type de protocole ne peut donc *a priori* s'appliquer qu'à des mélanges simples, composés d'un nombre très limité de molécules.

Au regard de ces limites, il a donc été envisagé d'explorer une autre voie, centrée sur le couplage de l'approche PICT et de l'utilisation d'échantillonneurs passifs. Ces capteurs chimiques, qui visent principalement à permettre l'estimation des concentrations chroniques moyennes des toxiques dans les milieux aquatiques ouvrent en effet de nouvelles perspectives pour caractériser les relations entre l'état chimique et l'état biologique et apprécier l'impact écologique des pesticides dans le milieu naturel.

Outre le fait de permettre de s'affranchir des biais qui peuvent découler des mesures chimiques effectuées ponctuellement dans le milieu (sur- ou sous-estimation des niveaux d'exposition), ils présentent également l'avantage de pré-concentrer la contamination de la phase dissoute dans une matrice assez simple, offrant ainsi la possibilité de réaliser des tests de toxicité à partir des substances directement extraites du milieu naturel. Jusqu'alors, les travaux réalisés avec ce type d'approches ont principalement concerné des bioessais sur cultures monospécifiques, tels que des tests de cytotoxicité et génotoxicité sur des levures (Petty et al., 2004; Vermeirssen et al., 2005; Liscio et al., 2009) et des souches bactériennes (Alvarez et al., 2008 ; Vermeirssen et al., 2010) ou de phytotoxicité sur cultures algales (Escher et al., 2006; Muller et al., 2007; Shaw et al., 2009 ; Vermeirssen et al., 2010). La majorité de ces études ont été réalisées à partir d'extraits de POCIS³², qui piègent, entre autres substances organiques, les pesticides les plus hydrophiles (voir pour revue Harman et al., 2012).

Dans les rivières soumises à une pollution chimique d'origine agricole, les POCIS permettent ainsi généralement de piéger la très grande majorité des herbicides. Pour tester la faisabilité de tests de toxicité des mélanges directement extraits du milieu sur des communautés phototrophes naturelles, nous avons, dans un premier temps, choisi d'évaluer les effets aigus de mélanges de pesticides extraits de POCIS immergés dans un cours d'eau situé en zone agricole (Ruiné, Charente) sur des biofilms issus du même site (A13).

L'analyse des POCIS collectés dans la zone aval du Ruiné a montré la présence exclusive d'herbicides appartenant aux triazines et aux chloroacétamides. Les biofilms, respectivement prélevés en zone amont et aval du Ruiné, ont été exposés durant 24h et 48h à différentes dilutions de pesticides réalisées à partir du mélange de molécules extraites des POCIS (d0 à d4, Tableau 3). La mesure de la fluorescence chlorophyllienne et de l'activité photosynthétique a permis de mettre en évidence des effets sur les communautés photosynthétiques, avec des réponses variables en fonction de l'origine des biofilms et de leur composition algale (Fig. 18).

	d0	d1	d2	d3	d4
Desethylatrazine	66.000	20.871	6.600	2.087	0.660
Deisopropylatrazine	15.600	4.933	1.560	0.493	0.156
Simazine	8.250	2.609	0.825	0.261	0.083
Desethylterbuthylazine	5.325	1.684	0.533	0.168	0.053
Atrazine	3.480	1.100	0.348	0.110	0.035
Metolachlor	1.950	0.617	0.195	0.062	0.019
Terbuthylazine	0.249	0.079	0.025	0.008	0.002

Tableau 3. Composition et concentrations finales (en µg/L) des différentes dilutions des mélanges extraits de POCIS utilisés dans les tests de toxicité (*d'après A13*)

³² POCIS : polar organic chemical integrative sampler

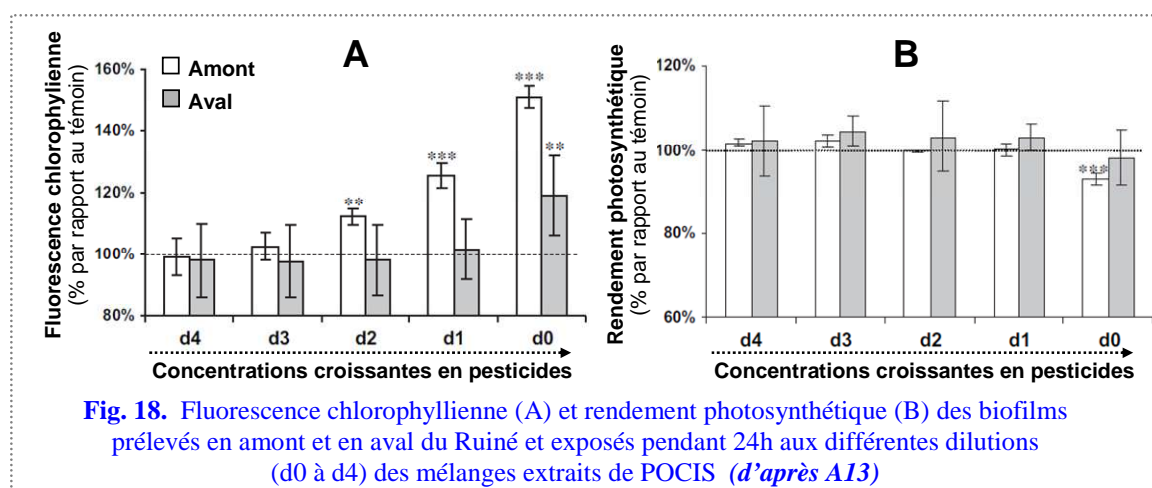


Fig. 18. Fluorescence chlorophyllienne (A) et rendement photosynthétique (B) des biofilms prélevés en amont et en aval du Ruiné et exposés pendant 24h aux différentes dilutions (d0 à d4) des mélanges extraits de POCIS (*d'après A13*)

Ces premiers travaux ont ainsi démontré l'intérêt du couplage des échantillonneurs passifs avec des biotests pour apprécier le potentiel toxique de mélanges de contaminants sur des communautés microbiennes dans des situations d'exposition aiguë à court terme. Ils ouvrent également des perspectives intéressantes pour évaluer l'impact écotoxicologique à moyen ou long terme, soit dans le milieu naturel à l'aide d'approches de type PICT, soit dans des conditions contrôlées à l'aide de dispositifs expérimentaux de types microcosmes ou canaux artificiels.

L'expérience a été renouvelée dans la rivière Morcille, marquée par un gradient en pesticides entre l'amont et l'aval beaucoup plus marqué que celui du Ruiné. Les résultats ont montré que les communautés phototrophes de biofilms prélevés sur des galets dans la zone aval très contaminée sont caractérisées par un niveau de tolérance au mélange de pesticides présents dans le milieu (extraits à l'aide de POCIS immergés 2 semaines au niveau de la station aval) quatre fois plus élevé que celui des communautés issues de la zone amont et peu exposées aux pesticides, confirmant l'intérêt d'utiliser ce type de couplage pour les approches PICT *in situ* (A16).

Au regard de ces premiers résultats, il semblerait donc judicieux de développer ce type d'approche avec différents types de capteurs passifs afin de pouvoir évaluer et comparer le niveau de tolérance des communautés aux différentes fractions toxiques qui peuvent être isolées à partir des capteurs passifs actuellement disponibles (POCIS, DGT³³, SBSE³⁴, SPMD³⁵... ; Vrana et al., 2005 ; Miège et al., 2012). Pour ce faire, un des verrous scientifiques à lever concerne le choix des descripteurs fonctionnels microbiens les plus pertinents en fonction des types de toxiques échantillonnés par les différents dispositifs et le développement de protocoles adaptés pour mesurer les effets des mélanges extraits à partir de tests de toxicité aigus. Ceci fait partie des objectifs affichés dans le programme ANR CESA « POTOMAC », actuellement en cours (2012-2015) et dans lequel je suis fortement impliqué (voir perspectives au § III.2.1).

³³ DGT : diffusive gradients in thin films (pour les métaux)

³⁴ SBSE : Stir Bar Sorptive Extraction (pour les molécules organiques hydrophobes)

³⁵ SPMD : Semi-Permeable Membrane Device (pour les molécules organiques hydrophobes)

II.4.3. Adaptation à la biodégradation des pesticides

L'ensemble des travaux concernant l'adaptation des communautés microbiennes à la biodégradation du diuron s'inscrit dans une étroite collaboration avec le groupe de recherche de Fabrice Martin-Laurent (INRA Dijon, UMR Agroécologie), spécialisé dans l'étude de ces processus adaptatifs dans les sols agricoles contaminés par les pesticides. Ces travaux ont principalement été financés par l'AIP INRA Ecoger « Papier », les conventions Irstea-ONEMA et INRA-ONEMA « Evaluation et remédiation de l'effet de pesticides » et l'APR Pesticides-Ecophyto « IMPEC ».

En cas d'exposition prolongée à des polluants organiques, les processus d'adaptation microbienne peuvent aussi conduire à la stimulation des capacités de biodégradation de ces composés. Cette fonctionnalité concerne principalement les microorganismes hétérotrophes (essentiellement les bactéries et les champignons) capables de dégrader les polluants (totalement ou partiellement) en les utilisant comme source énergétique. Ces processus d'adaptation microbienne ont principalement été étudiés à partir d'approches culturales visant à isoler et caractériser des souches dégradantes (voir par exemple A2) ou par l'évaluation du potentiel de dégradation de communautés naturelles provenant de sols agricoles. Ainsi, plusieurs études ont montré que la vitesse de dégradation du diuron ou d'autres molécules appartenant aux phénylurées dans ces milieux est variable suivant le type de sols étudié et qu'elle peut augmenter fortement suite à des traitements répétés favorisant l'adaptation des communautés microbiennes à la biodégradation de ces composés (Sørensen et al., 2003 ; Dellamatrice et Monteiro, 2004 ; Barra Caracciolo et al., 2005). Ces travaux suggèrent donc l'existence d'un lien fort entre l'historique d'exposition des communautés microbiennes édaphiques aux pesticides et leurs capacités à les dégrader. Appliqué aux communautés microbiennes aquatiques, ce constat offre donc des perspectives intéressantes pour la mise en œuvre de nouvelles approches visant à évaluer les liens entre exposition chimique et effets biologiques.

Dans cette optique, un premier suivi a été réalisé en juin 2007 sur le site de la Morcille afin d'évaluer, à l'échelle de ce bassin versant, l'influence du niveau d'exposition au diuron sur le potentiel de minéralisation de cet herbicide par les communautés microbiennes de différents éléments du paysage (parcelle agricole, zone tampon enherbée, cours d'eau récepteur ; Fig. 19 ; A6).

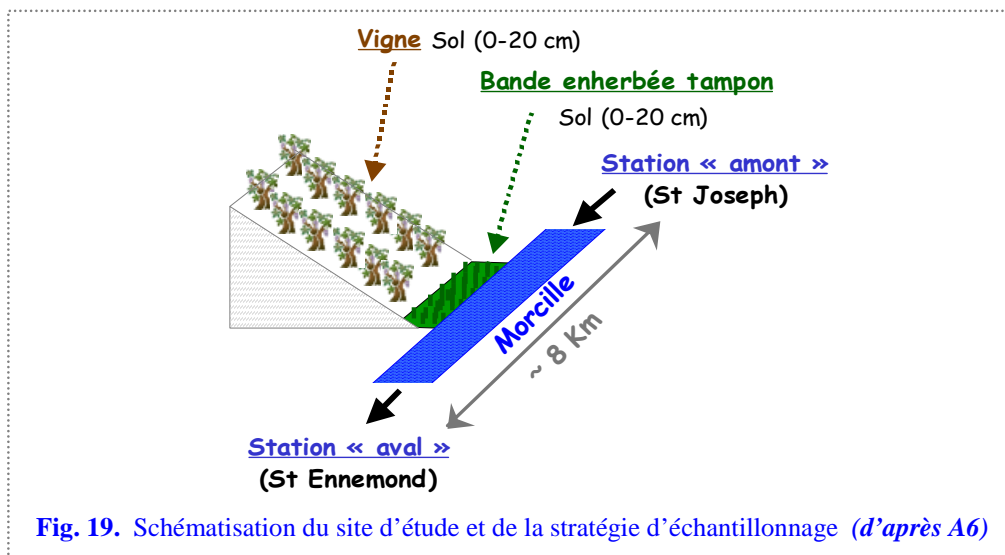


Fig. 19. Schématisation du site d'étude et de la stratégie d'échantillonnage (d'après A6)

Un des caractères novateurs de ce travail résidait dans l'étude simultanée des compartiments terrestres et aquatiques, en utilisant une méthodologie peu exploitée en hydrobiologie: la radiorespirométrie associée à l'utilisation de pesticides radioactifs. Brièvement, les échantillons composites de sol ont été réalisés à partir de dix carottages effectués dans l'horizon superficiel (0-20 cm) de la parcelle de vigne, de la bande tampon enherbée qui lui est associée (BE expérimentale) et d'une bande enherbée adjacente faiblement contaminée au diuron (BE témoin). Les communautés aquatiques ont été collectées dans le lit de la Morcille, dans le sédiment (500 g) et sur des pierres immergées (20 pierres). Deux stations d'échantillonnage ont été considérées afin d'apprécier l'influence du niveau d'exposition au diuron sur les capacités microbiennes de dégradation de cet herbicide : la station amont « Saint Joseph », située à 1 km en amont de la parcelle et la station aval « Saint Ennemonde ». Le suivi des cinétiques de minéralisation du diuron a été réalisé par radiorespirométrie après traitement des échantillons au ^{14}C -diuron (marquage uniforme sur le groupement phényle) et dosage du $^{14}\text{CO}_2$ dégagé lors de l'incubation en enceinte hermétique.

Les résultats obtenus (Fig. 20) ont permis de mettre en évidence un potentiel de biodégradation élevé chez les communautés microbiennes telluriques et aquatiques (sédiment et périphyton) prélevées dans les zones fortement impactées par la présence de diuron (parcelle de vigne, bande enherbée expérimentale et station aval de la Morcille), contrairement à celles peu exposées (bande enherbée témoin et station amont de la Morcille).

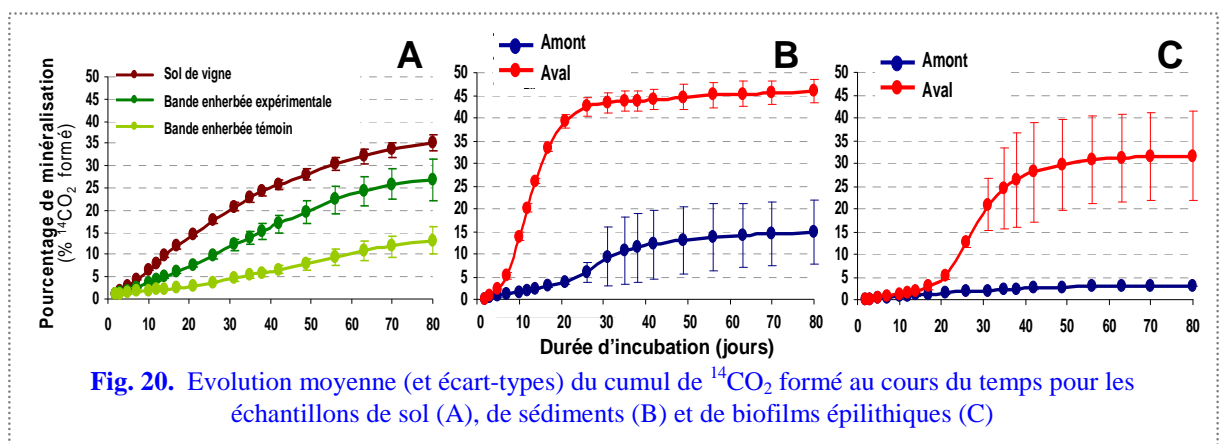


Fig. 20. Evolution moyenne (et écart-types) du cumul de $^{14}\text{CO}_2$ formé au cours du temps pour les échantillons de sol (A), de sédiments (B) et de biofilms épilithiques (C)

Cela révèle une adaptation des communautés soumises à une exposition chronique, qui leur confère un rôle potentiel important dans l'auto épuration du milieu, de la source de pollution jusqu'au cours d'eau. Cependant, les processus d'adaptation restent encore méconnus et ces premiers résultats, associés au faible niveau de connaissances concernant la biodégradation des pesticides en cours d'eau, nous ont conduit à nous questionner sur l'influence des phénomènes de ruissellement et/ou d'érosion sur l'acquisition des capacités de biodégradation du diuron par les communautés sédimentaires de la Morcille. L'objectif était notamment de tester l'hypothèse selon laquelle le compartiment terrestre *via* le processus érosif, très marqué dans le contexte viticole du Beaujolais, pouvait être à l'origine de la dispersion du potentiel dégradant dans le milieu aquatique.

Pour ce faire une expérience a été réalisée dans des dispositifs de type microcosmes aquatiques formés d'eau (7 L) et de sédiments (3 kg poids sec) collectés à la station amont de la Morcille (Fig. 21 ; **A11**). Ces microcosmes ont été contaminés ou non par le diuron (10 µg/L) et supplémentés ou non par des sols prélevés sur la parcelle viticole (0,3 kg poids sec), traités hebdomadairement et pendant trois semaines au diuron, à la dose agronomique de 1.2 mg/kg (dernier traitement 2 semaines avant le début de l'expérience).

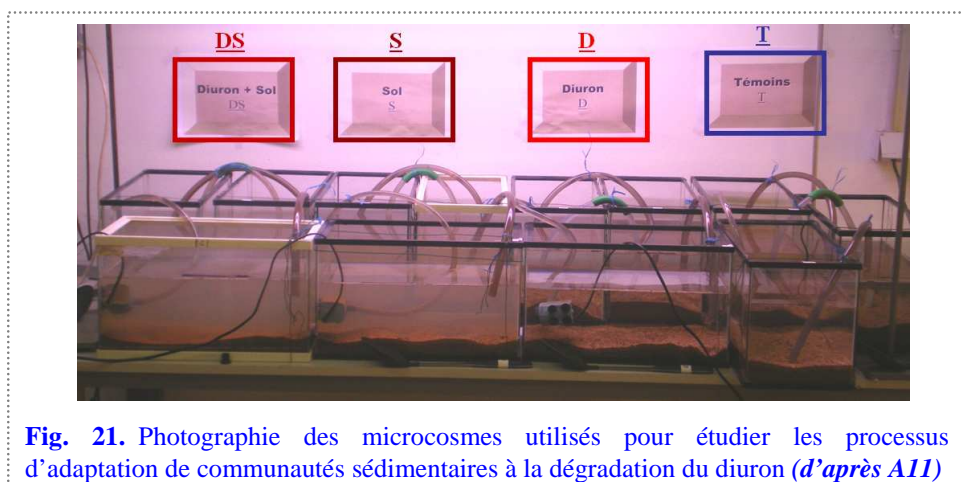


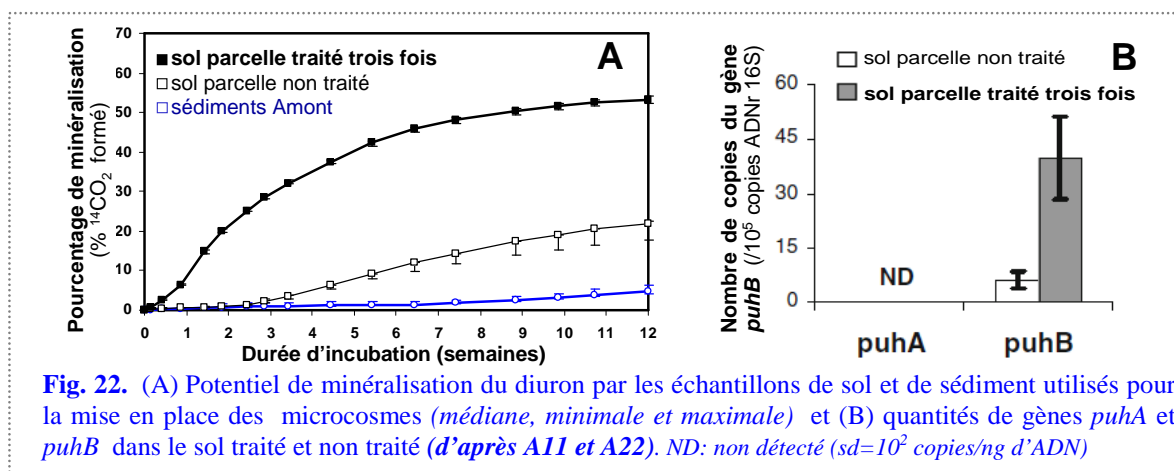
Fig. 21. Photographie des microcosmes utilisés pour étudier les processus d'adaptation de communautés sédimentaires à la dégradation du diuron (*d'après A11*)

L'analyse des capacités de biodégradation du sol de la parcelle de vigne et des sédiments prélevés dans la zone amont de la Morcille juste avant la mise en place des microcosmes (Fig. 22A ; **A11**) a permis de confirmer que :

- les communautés microbiennes telluriques de la parcelle de vigne (traitée alors régulièrement au diuron) présentent intrinsèquement un potentiel de biodégradation de cette molécule (~20% de minéralisation après 12 semaines d'incubation)
- ces capacités sont significativement augmentées suite aux trois traitements successifs au diuron (>50% de minéralisation après 12 semaines d'incubation)
- les communautés sédimentaires de la zone amont de la Morcille, peu (ou pas) exposées au diuron ne sont capables de minéraliser qu'une très faible quantité de cette molécule (<5%)

L'utilisation d'une méthode de PCR quantitative (qPCR), que nous avons mise au point afin de cibler les gènes *puhA* et *puhB* codant respectivement pour les phénylurées hydrolases A et B impliqués dans la dégradation du diuron (Turnbull et al., 2001 ; Khurana et al., 2009), suggère une forte contribution des populations possédant le gène *puhB* dans les étapes conduisant à la minéralisation de ce composé dans le sol étudié (Fig. 22B ; **A22**). En effet, ce gène détecté dans les échantillons prélevés dans la parcelle de vigne (~6 copies pour 10⁵ copies du gène codant l'ARNr 16S), voit sa proportion augmenter 6 à 7 fois suite aux trois traitements successifs au diuron (~40 copies/ 10⁵ ADNr 16S), cette augmentation étant concomitante avec celle du potentiel de minéralisation (Fig. 22A). A l'opposé, les populations possédant *puhA* sont absentes ou très faiblement représentées dans la communauté puisque ce gène n'est pas détecté dans le sol, qu'il soit traité ou non au laboratoire (Fig. 22B).

Aucun de ces gènes n'a été détecté dans les échantillons de sédiments prélevés dans la zone amont de la Morcille (seuil de détection = 10^2 copies par ng d'ADN), ce qui est cohérent compte tenu du faible potentiel de dégradation du diuron observé chez les communautés sédimentaires (Fig. 22A).



Afin d'évaluer et comparer l'influence de l'apport de diuron sous forme dissoute ou de sol contaminé au diuron sur l'adaptation des communautés sédimentaires à la dégradation de ce toxique, les capacités à minéraliser ce composé ont été évaluées pour les sédiments prélevés dans chaque type de microcosme après 2, 4 et 9 semaines d'incubation dans les différents contextes décrits plus haut. Les résultats, exprimés en pourcentage maximal de minéralisation après 12 semaines dans les dispositifs de radiorespirométrie (M_{max} ; Fig. 23A) ou en nombre de jours nécessaires à la minéralisation de 5% du ^{14}C diuron (temps de minéralisation 5%: TM_5 ; Fig. 23B) ont permis de montrer que l'adaptation des sédiments n'est visible qu'après 4 semaines d'exposition dans les microcosmes. En effet, les cinétiques de minéralisation obtenues n'ont pas révélé de différence significative entre les sédiments prélevés après 2 semaines dans les différents contextes (Fig. 23A et 23B). Après 4 et 9 semaines, les résultats ont clairement démontré une forte stimulation du potentiel de biodégradation au sein des communautés sédimentaires exposées au diuron ou au sol traité par cette molécule. Cela s'est traduit par une augmentation significative du pourcentage maximal de minéralisation (Fig. 23A) et une diminution significative de la TM_5 (Fig. 23B), quel que soit le mode opératoire utilisé pour contaminer les microcosmes. Cependant, les résultats ont également révélé des différences significatives entre les sédiments exposés au diuron sous forme dissoute et ceux supplémentés avec le sol traité, qui présentaient un potentiel de biodégradation encore plus élevé. Ces observations, qui mettent en évidence que l'apport de sol contribue à améliorer les capacités épuratrices des sédiments, suggèrent que les capacités de biodégradation des communautés microbiennes terrestres ont été transférées aux communautés sédimentaires. A partir de ce constat, deux hypothèses ont été émises pour expliquer la réponse adaptative des sédiments à l'apport de sol de la parcelle viticole : (i) soit des populations microbiennes dégradant le diuron provenant du sol ont colonisé les sédiments ou (ii) soit elles ont transféré leur potentiel génétique dégradant aux communautés autochtones du sédiment (A11).

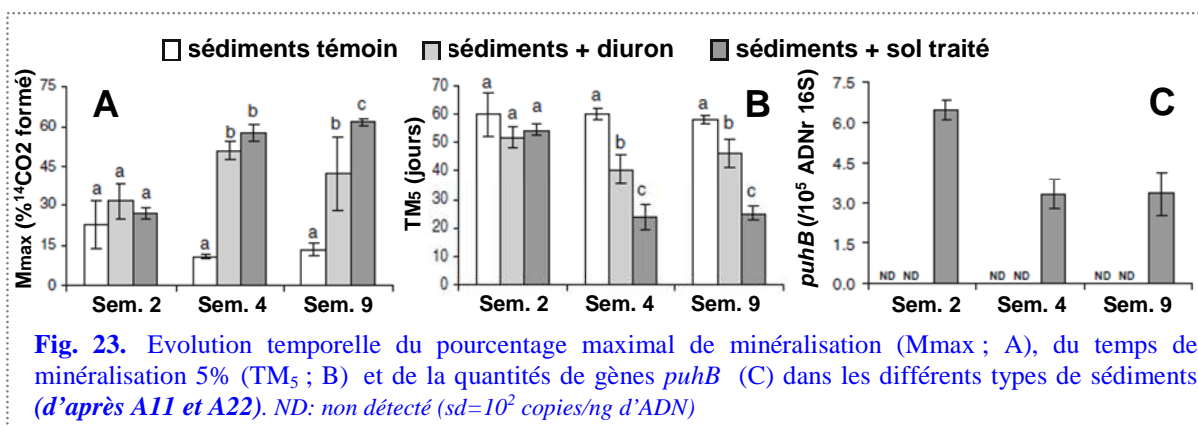


Fig. 23. Evolution temporelle du pourcentage maximal de minéralisation (Mmax ; A), du temps de minéralisation 5% (TM₅ ; B) et de la quantités de gènes *puhB* (C) dans les différents types de sédiments (d'après A11 et A22). ND: non détecté (sd=10² copies/ng d'ADN)

L'analyse de la structure globale des communautés bactériennes des sédiments par PCR-t-RFLP³⁶ (A11) n'a pas permis de détecter de différence significative entre les différents types de sédiments. Toutefois, les approches d'empreintes génétiques, telles que la t-RFLP, ne permettent pas d'accéder aux populations minoritaires et il n'est donc pas totalement exclu que certaines espèces telluriques dégradantes aient pu s'implanter dans le sédiment. En complément, la quantification par qPCR des gènes *puhB* dans les différents types de sédiments n'a permis de révéler la présence de ce gène que dans ceux supplémentés avec le sol traité (Fig. 23C), qui abritait une population *puhB* positive fortement représentée (Fig. 22B). Cela confirme l'existence d'un transfert biologique important entre le compartiment terrestre et le compartiment aquatique, suite à l'implantation des populations terrestres *puhB* positive ou au transfert de gènes *puhB* de celles-ci vers les communautés sédimentaires, cette hypothèse étant appuyée par l'absence de détection de ces gènes dans les sédiments exposés uniquement au diuron sous forme dissoute. Ces travaux illustrent donc clairement l'intérêt de renforcer les études concernant les connexions entre les zones rivulaires et les cours d'eau, tant en terme de transfert chimique que de transfert biologique, et de prendre en compte ces échanges pour appréhender les processus d'adaptation microbienne dans le milieu aquatique.

D'autre part, l'absence de détection des gènes *puhA* (tous les échantillons) et *puhB* (sédiments non supplémentés en sol), dans certains sédiments dotés d'un fort potentiel de minéralisation du diuron, a également permis de montrer qu'il existe vraisemblablement des voies de dégradation microbienne de ce composé actuellement non décrites. De manière plus globale, et compte tenu de la grande diversité et de l'évolution constante de la typologie des pesticides, il existe pour la plupart d'entre eux, une connaissance très partielle (voire une méconnaissance totale) des voies métaboliques et des processus génétiques associés. Il me semble donc important de poursuivre les recherches dans ce domaine, notamment pour développer et faciliter des approches moléculaires qui permettraient d'appréhender plus facilement le potentiel génétique de biodégradation au sein des communautés naturelles, de caractériser les facteurs favorisant l'expression de ce potentiel et de mieux comprendre l'impact des microorganismes dans le devenir des pesticides dans les différents compartiments de l'environnement.

³⁶ t-RFLP : terminal Restriction Fragment Length Polymorphism

II.5. Potentiel de récupération des communautés microbiennes

II.5.1. Conséquences écologiques de la restauration chimique

La contrainte législative de la Directive Cadre Européenne sur l'Eau (DCE, 2000) impose le retour au « bon état écologique » des eaux d'ici à 2015 (avec toutefois des possibilités de dérogation aux horizons 2021 et 2027). Le retour au « bon état écologique » passe donc inévitablement par la restauration chimique (et parfois hydromorphologique) des rivières altérées. Plusieurs mesures ont ainsi été prises à différentes échelles (locales, régionales ou nationales) afin de favoriser l'amélioration de la qualité chimique des cours d'eau. Par exemple, à l'échelle nationale, l'une des actions phares concernant les pesticides a été l'élaboration du plan Ecophyto 2018, suite au Grenelle de l'Environnement organisé en 2008. Ce plan vise à inciter une réduction des usages de pesticides en zone agricole et non agricole, en fixant comme objectif une réduction de 50% de ces usages, grâce notamment au développement et à la diffusion de méthodes alternatives. Bien que l'atteinte de cet objectif devrait contribuer à améliorer la qualité des masses d'eaux, l'évaluation du bénéfice environnemental des mesures mises en œuvre ne devra pas se limiter à la seule évaluation de la qualité chimique de l'environnement mais devra aussi considérer la qualité écologique de celui-ci. Dans ce contexte, il apparaît donc important d'être capable d'appréhender les capacités de récupération des communautés aquatiques suite à une réduction de pression polluante. Pour ce faire, différentes approches peuvent être envisagées :

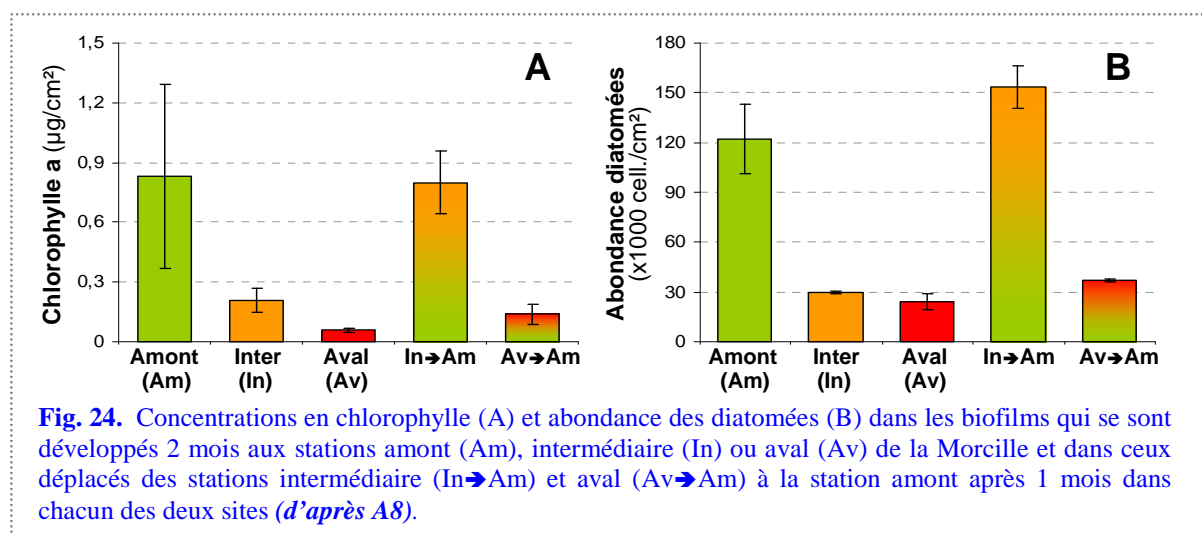
- i) des études *in situ* dites de « translocation », qui visent à simuler une levée de pression polluante en déplaçant des communautés d'une zone polluée vers une zone de référence, et à suivre leur évolution dans ce nouveau milieu
- ii) des études expérimentales en conditions contrôlées, qui permettent d'appréhender plus finement la dynamique de récupération des communautés suite à une diminution du niveau de contamination
- iii) des études de cas, réalisées à partir de suivis à moyen-long terme sur des sites en cours de restauration chimique.

L'ensemble des travaux concernant l'étude du potentiel de récupération des communautés microbiennes ont été financés par le programme interne Irstea Pesticides « PestExpo » et les convention Irstea-ONEMA et INRA-ONEMA « Evaluation et remédiation de l'effet de pesticides »

II.5.2. Potentiel de récupération des communautés périphytiques de la Morcille

Au printemps 2008, nous avons réalisé une approche de « translocation » sur le site de la Morcille, au cours de laquelle des biofilms périphytiques ont été déplacés des stations aval et intermédiaire, contaminées aux pesticides organiques et aux métaux utilisés en viticulture, vers la station amont, considérée comme station de référence (voir § II.4.1. pour la description du site d'étude).

Cette étude (A8) a permis de mettre en évidence un impact important des polluants sur la biomasse chlorophyllienne (Fig. 24A) et l'abondance des diatomées (Fig. 24B) après 2 mois de croissance au niveau des deux stations contaminées (intermédiaire et aval), par comparaison aux valeurs observées à l'amont, au moins 4 à 5 fois supérieures pour ces deux paramètres.



Lorsque les communautés de la station intermédiaire sont déplacées en amont après 1 mois de colonisation (i.e. «In→Am» sur la Fig. 24), elles présentent en fin de croissance (soit 1 mois après) une biomasse et une densité diatomique similaires aux communautés de la station de référence, traduisant une récupération totale sur la base de ces deux paramètres. Cependant, cette récupération est très incomplète pour les communautés issues de la station la plus en aval («Av→Am»), malgré des durées de croissance identiques dans les deux types de milieux (i.e. 1 mois en milieu contaminé puis 1 mois dans le milieu de référence). Ces résultats suggèrent donc une trajectoire de récupération plus rapide pour les communautés issues de la station intermédiaire. Cette différence en terme de potentiel de récupération est probablement à relier avec le gradient toxique observé entre la section intermédiaire et la section aval du cours d'eau. Ce gradient, qui se traduit par des concentrations croissantes en pesticides et en métaux d'amont en aval, peut avoir sélectionné des espèces à capacité de croissance différente mais il peut également avoir favorisé une accumulation plus forte de toxiques au sein des biofilms périphytiques issus de l'aval et prolonger l'exposition des communautés, même si celles-ci sont déplacées dans un milieu moins contaminé. Ceci a notamment été observé par Dorigo et al. (2010a) à partir de dosages de cuivre réalisés dans des biofilms déplacés de la station intermédiaire à la station amont au cours d'une expérience de translocation similaire, réalisée en 2006 dans la Morcille. Ces dosages ont ainsi montré que 9 semaines après la translocation, les quantités de cuivre internalisées étaient encore 2 fois plus élevées dans les biofilms issus de la station intermédiaire que dans ceux ayant toujours évolué dans la station de référence.

Nos travaux ont également permis de mettre en évidence une récupération incomplète de la communauté diatomique d'un point de vue de sa diversité et de sa structure, quelle que soit l'origine des échantillons (A8). Il est cependant intéressant de constater que les conclusions des différentes études de translocation visant à évaluer la dynamique de récupération de communautés diatomiques en réponse à une amélioration de la qualité chimique de l'eau (pesticides et/ou métaux) sont assez divergentes à ce sujet. Ainsi, si certains auteurs observent un rapprochement très net de la structure des communautés déplacées vers celle des communautés en place dans le milieu de référence (ex. Ivorra et al., 1999 ; Rotter et al., 2011 ; Arini et al., 2012), d'autres décrivent une récupération structurale très faible, même plusieurs semaines après la translocation (ex. Rimet et al., 2005 ; Dorigo et al., 2010a). Si cette divergence est probablement due pour partie aux caractéristiques spécifiques de chacune des rivières considérées et à des procédures expérimentales variables entre les différentes études (en particulier la durée choisie pour les périodes pré- et post-translocation), elle soulève toutefois plusieurs interrogations quant à la pertinence réelle de ce type d'approches de translocation. Par exemple, dans ces études en milieux naturels, il est difficile (voire impossible) de dissocier l'influence de la réduction du niveau d'exposition aux toxiques dans le processus de récupération, des autres facteurs pouvant fluctuer d'un site à l'autre (ex. disponibilités en nutriments, exposition lumineuse...). D'autre part, ces approches ne permettent pas de savoir si la présence des communautés autochtones influence ou non les processus de récupération de celles issues de zones contaminées. En effet une des hypothèses envisageables, serait que la proximité de ces communautés « pristines » faciliterait la récupération *via* notamment le transfert d'espèces autochtones qui pourraient rapidement s'implanter et se développer au sein des communautés déplacées. Pour évaluer plus précisément le potentiel de récupération de communautés naturelles, en appréhendant notamment leur potentiel intrinsèque et l'influence des échanges biologiques, il apparaît donc nécessaire de mettre en œuvre des approches expérimentales complémentaires aux études de translocation *in situ*.

II.5.3. Influence des migrations d'espèces dans les processus de récupération

Une étude expérimentale en canaux de laboratoire a été réalisée dans le cadre du stage de M2 d'Anne-Sophie Lambert afin d'étudier finement le processus de récupération de communautés naturelles périphytiques en réponse à une baisse du niveau d'exposition chronique à une contamination métallique (en prenant comme modèle le cuivre), en appréhendant notamment l'influence des migrations d'espèces dans la dynamique de récupération des communautés (A15, A17). Après une période de pré-colonisation de 4 semaines, durant laquelle des biofilms issus de la station amont de la Morcille ont été exposés ou non au cuivre (~20 µg/L), la dynamique de récupération des communautés pré-exposées a été étudiée pendant 6 semaines en présence ou non de communautés « pristines » issues des canaux non contaminés.

Les résultats obtenus à l'issue de la période de pré-colonisation confirment l'impact chronique du cuivre sur les biofilms périphytiques en terme de structure (biomasse, répartition des groupes algaux), de diversité taxonomique (diatomées) et génétique (bactéries) et de fonctionnalité (inhibition de la photosynthèse et de l'activité enzymatique extra-cellulaire β -glucosidase). L'exposition au cuivre engendre également une augmentation du niveau de tolérance des communautés phototrophes à ce toxique, conformément au concept PICT, tous ces effets ayant déjà été largement décrits dans la littérature (ex. Soldo et Behra, 2000; Boivin et al., 2006; Serra et Guasch, 2009; Tlili et al., 2010). Suite à la diminution de pression chimique, la récupération des communautés phototrophes est très faible voire inexistante après 6 semaines en absence de migration d'espèces provenant de biofilms non contaminés (échantillons « Ex-Cu2 »), alors que cette récupération est facilitée lorsque ces échanges sont possibles (échantillons « Ex-Cu1 »), quel que soit le paramètre considéré, qu'il soit quantitatif (biomasse chlorophyllienne, Fig. 25A), fonctionnel (rendement photosynthétique Fig. 25B) ou structurel (répartition des groupes algaux, Fig. 25C ; composition diatomique Fig. 26).

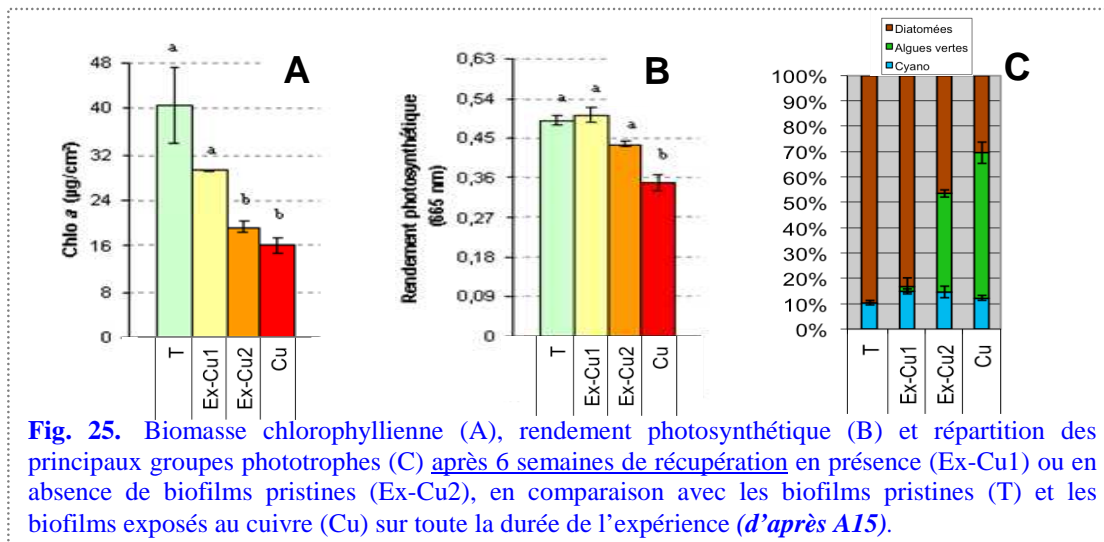


Fig. 25. Biomasse chlorophyllienne (A), rendement photosynthétique (B) et répartition des principaux groupes phototrophes (C) après 6 semaines de récupération en présence (Ex-Cu1) ou en absence de biofilms pristines (Ex-Cu2), en comparaison avec les biofilms pristines (T) et les biofilms exposés au cuivre (Cu) sur toute la durée de l'expérience (*d'après A15*).

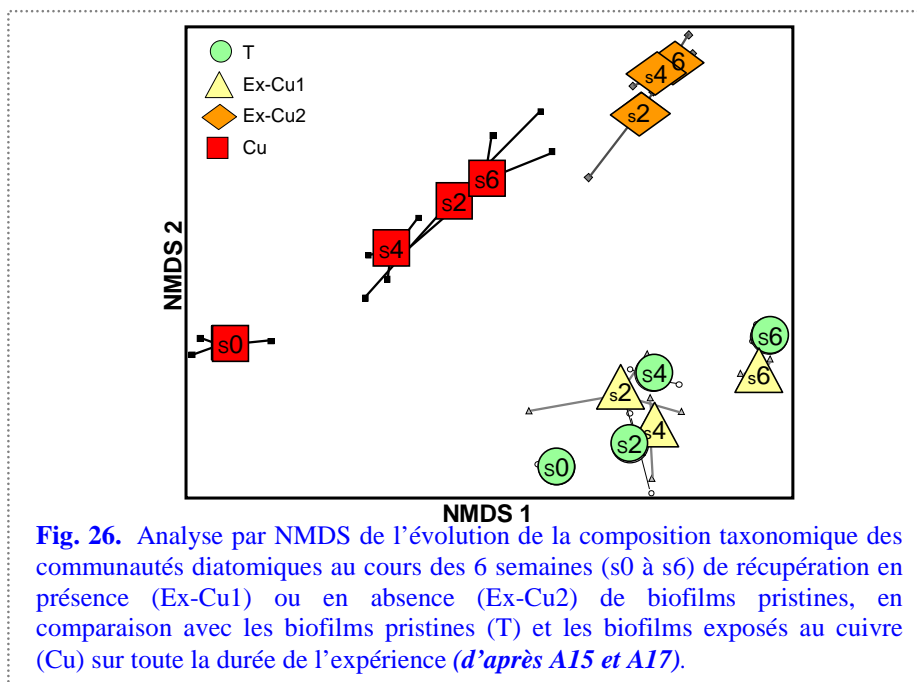


Fig. 26. Analyse par NMDS de l'évolution de la composition taxonomique des communautés diatomiques au cours des 6 semaines (s0 à s6) de récupération en présence (Ex-Cu1) ou en absence (Ex-Cu2) de biofilms pristines, en comparaison avec les biofilms pristines (T) et les biofilms exposés au cuivre (Cu) sur toute la durée de l'expérience (*d'après A15 et A17*).

Dans notre étude, et contrairement aux communautés phototrophes, les communautés bactériennes ne semblent pas récupérer au niveau de leur structure génétique (PCR-ARISA), même en présence de biofilms non contaminés (résultats non présentés, voir A15). Cela semble suggérer une faible influence des processus de migration au sein de cette communauté. Toutefois, la diminution de la pression toxique favorise l'évolution de la communauté bactérienne, puisque des changements temporels de la diversité sont observés dans ce cas alors que celle-ci reste très stable dans les communautés exposées aux fortes concentrations en cuivre. Cette évolution structurale est associée à une récupération fonctionnelle. En effet, une récupération totale est observée au niveau du potentiel d'activité β -glucosidase à la fin du suivi, quel que soit le contexte de récupération. Cependant, la présence de biofilms non contaminés semble accélérer le processus, la récupération survenant après 4 semaines seulement, contre 6 en absence de ces biofilms (résultats non présentés, voir A15).

Dans une perspective de restauration écologique des cours d'eau, il semble donc important, au regard de nos résultats, de conserver des zones non contaminées pouvant permettre le maintien de communautés microbiennes non impactées, susceptibles de recoloniser le milieu en cas d'amélioration de la qualité chimique. De manière plus générale, ces conclusions suggèrent également l'importance de considérer les communautés microbiennes dans la réflexion actuelle concernant la Trame bleue³⁷ et le maintien des continuités écologiques.

D'autre part, nous avons également caractérisé l'évolution du niveau de tolérance des communautés phototrophes au cuivre au cours de la période post-exposition, sur la base de tests de toxicité aiguë réalisés à partir de mesures de la fluorescence chlorophyllienne (Fig. 27, A15). Les CE_{50} obtenues pour ce paramètre montrent bien que les communautés pristines (T) et exposées au cuivre (Cu) se distinguent durant tout le suivi par leur niveau de tolérance à ce métal (celui-ci étant environ 3 fois plus important pour les communautés « Cu »). Suite à la réduction du niveau d'exposition au cuivre, une diminution significative des CE_{50} est observée pour les communautés « Ex-Cu1 », au contact de communautés pristines, alors que les communautés « Ex-Cu 2 » conservent jusqu'à la fin de l'expérience un niveau de tolérance identique à celui des communautés « Cu ».

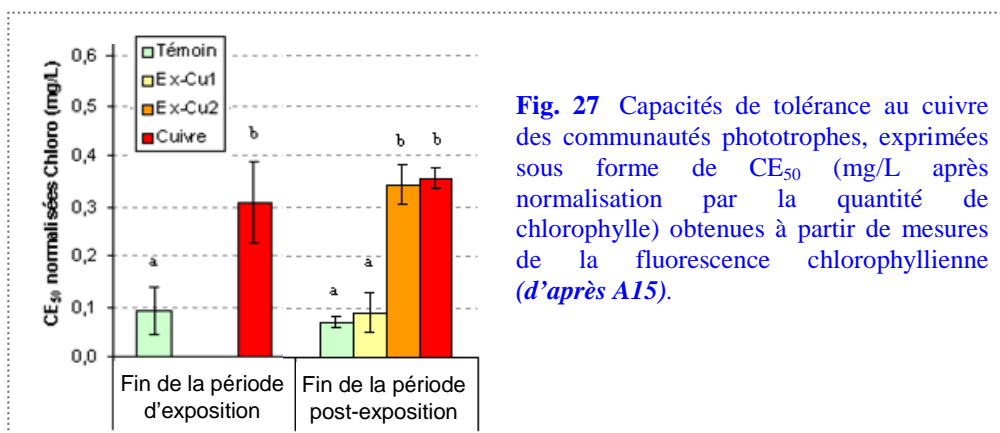


Fig. 27 Capacités de tolérance au cuivre des communautés phototrophes, exprimées sous forme de CE_{50} (mg/L après normalisation par la quantité de chlorophylle) obtenues à partir de mesures de la fluorescence chlorophyllienne (d'après A15).

³⁷ La Trame bleue (et verte) est une mesure phare du Grenelle Environnement qui porte l'ambition d'enrayer le déclin de la biodiversité au travers de la préservation et de la restauration des continuités écologiques (<http://www.developpement-durable.gouv.fr/-La-Trame-verte-et-bleue,1034-.html>)

Ces résultats sont en accord avec les observations faites au niveau de l'évolution de la structure des communautés phototrophes. Cela suggère donc que les approches basées sur l'étude de l'évolution des capacités d'adaptation microbienne aux toxiques (et notamment l'acquisition de tolérance, dans le cadre des approches PICT) peuvent offrir des perspectives intéressantes pour étudier la récupération des communautés microbiennes dans des écosystèmes en cours de restauration chimique et contribuer ainsi à établir le lien entre gain chimique et gain écologique dans un contexte d'amélioration de la qualité des eaux. Ce constat rejoint celui émis en conclusions de récentes expériences de translocation, qui mettaient en œuvre des approches PICT pour évaluer la récupération de communautés microbiennes phototrophes (Dorigo et al., 2010a, 2010b ; Rotter et al., 2011) et hétérotrophes (Dorigo et al., 2010a ; Fechner et al., 2012) suite à leur déplacement dans un milieu moins contaminé.

II.5.4. Interdiction du diuron et conséquences écologiques dans la Morcille

Les différentes études menées sur le site de la Morcille avant l'interdiction d'utilisation du diuron (effective à partir du 13 décembre 2008 ; Journal officiel de la République Française No. 204; 04.09.2007) ont clairement démontré que les communautés microbiennes situées dans les sections les plus contaminées présentaient i) une forte capacité à dégrader cet herbicide (A6) et ii) un niveau de tolérance élevé à celui-ci (Dorigo et al., 2007, 2010a, 2010b ; A9). Ces travaux ont révélé que ces capacités de biodégradation et de tolérance traduisaient une adaptation des communautés microbiennes, très dépendante de leur niveau d'exposition à ce contaminant, régulièrement détecté dans le cours d'eau.

Partant de ce constat, nous avons cherché à évaluer l'intérêt de considérer l'évolution de ce niveau d'adaptation comme un indicateur rendant compte d'une baisse attendue du niveau d'exposition des biocénoses au diuron dans la Morcille, suite à son interdiction d'utilisation sur le bassin versant. L'objectif de travail était ainsi de vérifier que l'interdiction d'utilisation du diuron engendrait réellement une diminution de la contamination de la rivière et en conséquence, une diminution progressive des capacités de biodégradation (communautés hétérotrophes sédimentaires) et de tolérance (communautés phototrophes périphytiques) dans sa section intermédiaire et aval.

Pour ce faire un suivi chimique intensif, réalisé pendant 4 ans (2008-2011, échantillonnage bimensuel) au niveau des trois stations réparties le long de la Morcille (amont, intermédiaire, aval, voir ch. 4.1.), a été couplé à i) un échantillonnage trimestriel de communautés sédimentaires afin de suivre l'évolution de leur potentiel de biodégradation du diuron et à ii) un échantillonnage mensuel de biofilms périphytiques (sur substrats artificiels) afin de suivre l'évolution de leur niveau de tolérance à cet herbicide (approche PICT sur la base de l'activité photosynthétique).

Les résultats issus de l'approche PICT étant encore en cours d'analyse et d'interprétation, je ne décrirai ici que les conclusions tirées du suivi de l'évolution des conditions chimiques des eaux de la Morcille (évolution des concentrations en diuron) et des capacités de biodégradation dans le compartiment sédimentaire (A21).

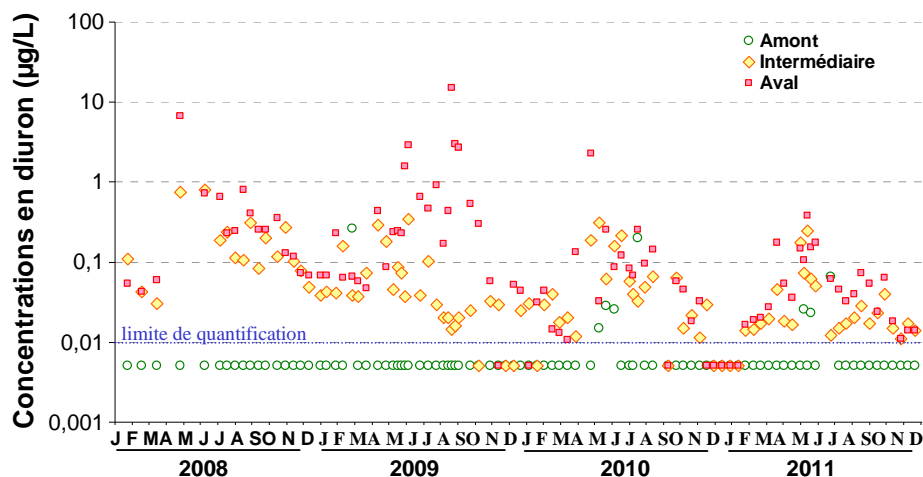


Fig. 28. Evolution des concentrations en diuron ($\mu\text{g/L}$) mesurées à partir de prélèvements ponctuelles effectuées sur les trois stations de la Morcille entre janvier 2008 et décembre 2011 (*d'après A21*).

Le suivi chimique intensif, qui a permis d'effectuer 97 dosages de diuron à chaque station sur la durée de l'étude (Fig. 28), témoigne du très faible niveau de contamination de la station de référence par cet herbicide, puisque 92% des analyses ont révélé des concentrations inférieures au seuil de quantification ($0,01 \mu\text{g/L}$) avec seulement deux échantillons présentant des concentrations supérieures à la norme de qualité environnementale (NQE), fixée à $0,2 \mu\text{g/L}$ pour le diuron (donnée INERIS). En conséquence, les communautés sédimentaires prélevées sur cette station disposent d'une capacité très faible à dégrader le diuron, quelle que soit la période de prélèvement (Fig. 29A), avec un temps de minéralisation 10% (TM_{10}) moyen compris entre 85 et 140 jours au cours des différentes cinétiques de minéralisation réalisées avec ces échantillons (Fig. 30A). Il est important de constater que ces cinétiques sont relativement constantes et similaires sur l'ensemble du suivi, révélant ainsi une stabilité temporelle qui confirme l'intérêt de les considérer comme échantillons de référence.

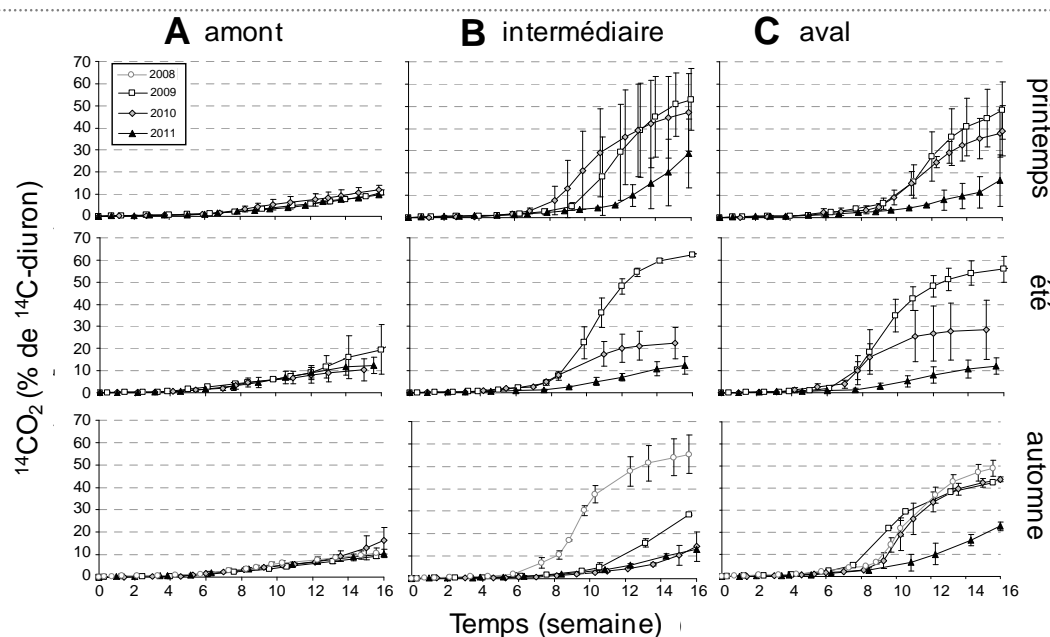
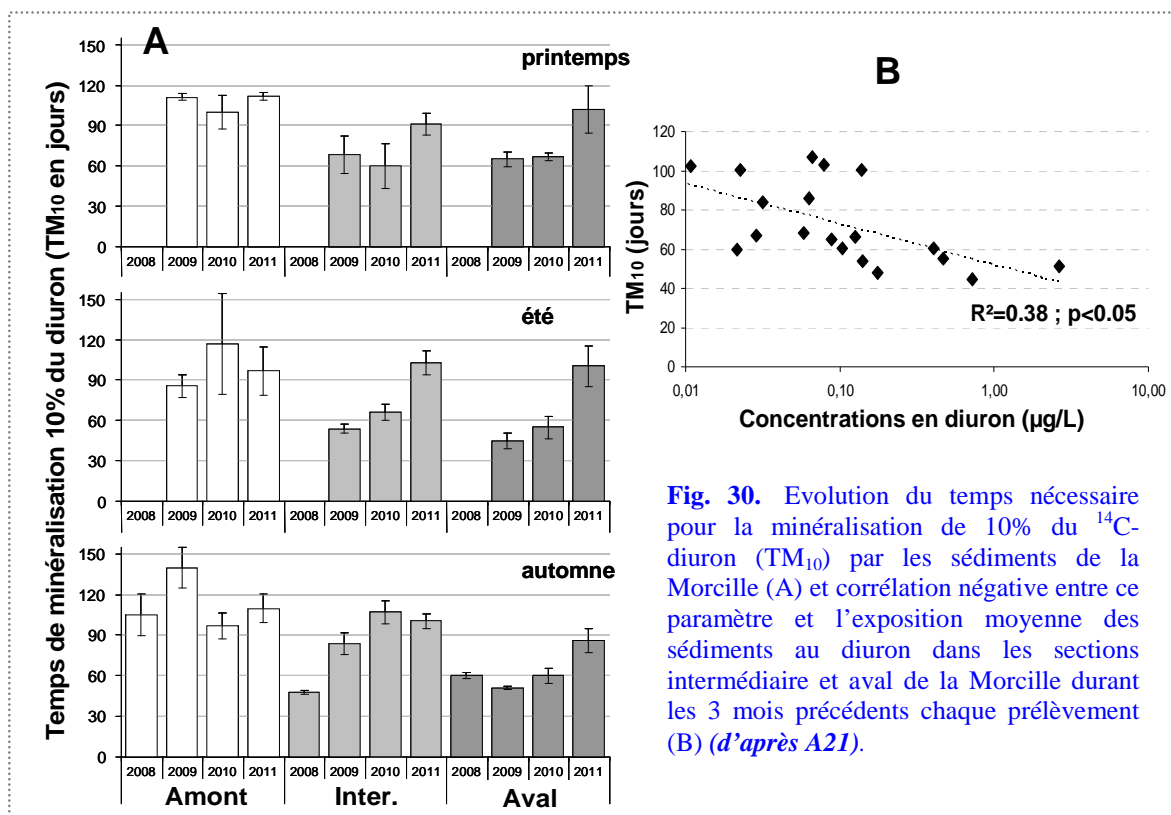


Fig. 29. Evolution de la capacité de minéralisation du ^{14}C -diuron par les sédiments de la Morcille prélevés aux stations amont (A), intermédiaire (B) et aval (C) sur la période 2008-2011 (*d'après A21*).

L'évolution des concentrations en diuron aux stations contaminées confirme l'hypothèse d'une diminution progressive du niveau de contamination de la Morcille suite à son interdiction (Fig. 28). Ainsi, en 2008, les concentrations mesurées sur ces deux sites sont toujours supérieures à la limite de quantification (0,01 µg/L) avec des valeurs annuelles médianes de l'ordre de 0,11 µg/L dans la section intermédiaire et 0,25 µg/L en aval, alors qu'en 2011, ces valeurs médianes sont divisées par 5 environ, avec des valeurs respectivement proches de 0,02 µg/L et 0,05 µg/L (A21). Il est cependant important de noter que même 3 ans après son interdiction, le diuron est toujours détecté fréquemment dans la Morcille, avec des concentrations parfois supérieures à la NQE, en particulier en période printanière³⁸. Les cinétiques de minéralisation du diuron obtenues avec les échantillons prélevés dans les deux stations contaminées font apparaître une évolution temporelle très nette des capacités de biodégradation entre 2008 et 2011, et ce, quelle que soit la période d'échantillonnage (Fig. 29B et 29C). Cela se traduit par une augmentation progressive des TM_{10} qui passent d'environ 60 jours au début du suivi (automne 2008 à été 2009) à environ 100 jours en 2011, avec des valeurs semblables à celles observées avec les échantillons de référence (Fig. 30A). L'influence de la diminution du niveau de contamination de la Morcille par le diuron sur la perte des capacités des communautés sédimentaires autochtones à le minéraliser est confirmée par la corrélation négative significative entre les TM_{10} obtenus avec les sédiments intermédiaires et aval et leur niveau d'exposition chronique au diuron dans les 3 mois précédents chaque prélèvement (Fig. 30B).



³⁸ ...le printemps...principale période d'utilisation du diuron sur le bassin versant lorsque celle-ci était permise...mais pas de conclusion hâtive ou de médisance, les pics de pollution sont sans doute exclusivement issus d'un fort lessivage des sols à cause des giboulées printanières...

Ce travail, basé sur une étude de cas, a donc permis de mettre en évidence un lien fort entre i) un changement de pratique agricole, ii) une amélioration de l'état chimique d'un cours d'eau et iii) une modification des capacités fonctionnelles des communautés microbiennes sédimentaires, sur la base de leur potentiel de biodégradation.

Cela offre des perspectives particulièrement intéressantes en vue de développer des approches de bioindication basées sur les capacités de biodégradation des communautés microbiennes aquatiques. Cependant, il est toutefois intéressant de noter que paradoxalement, bien que la diminution du potentiel de biodégradation soit ici le signe d'une amélioration de la qualité chimique du cours d'eau, elle contribue également à diminuer la capacité d'atténuation naturelle du polluant dans ce milieu. La conséquence de ce paradoxe est que le résidu de pollution observé risque de perdurer puisque la capacité épuratrice de l'environnement continuera de diminuer.

D'autre part, il est également important de mentionner que ce type d'approche n'est pas généralisable en l'état du fait des fortes contraintes méthodologiques associées aux mesures de radiorespirométrie. Parmi celles-ci, on peut notamment citer la durée nécessaire pour suivre les cinétiques de biodégradation de pesticides par des communautés naturelles (plusieurs semaines), la nécessité de posséder l'accréditation pour manipuler des produits radioactifs ou encore le coût élevé de certains pesticides marqués. Cela renforce donc le constat dressé plus haut (§ II.4.3.) quant à la nécessité de développer des approches moléculaires qui permettraient d'appréhender plus facilement le potentiel génétique de biodégradation (et idéalement son niveau d'expression) au sein de communautés naturelles.

Chapitre III

Perspectives

III.1. De l'écotoxicologie à « l'écologie du stress multiple »

Mes perspectives de recherche s'inscrivent dans la continuité de mes travaux décrits précédemment. Déjà engagées pour la plupart, elles se placent principalement dans le deuxième objectif formulé dans le récent rapport IFRES³⁹ (2013). Celui-ci, résumé sous le titre « *intégrer l'ensemble des expositions* », vise à « ... *passer d'une approche fragmentée par contaminant et par stress à une approche intégrée de l'ensemble des expositions et des stress. Cela implique d'aborder progressivement l'exposome et les effets multistress sur les écosystèmes...* ». Si cet objectif peut paraître (trop) ambitieux, il me semble néanmoins nécessaire de s'y attacher en essayant de mettre en œuvre des recherches qui tendent à y contribuer.

En effet, la pollution des eaux de surface s'inscrit dans un contexte de changement global. Les milieux aquatiques sont donc généralement soumis à une multiplicité de pressions chimiques (pollutions trophiques et toxiques) et/ou physiques. De ce fait, les communautés aquatiques sont le plus souvent exposées à des situations de multi-stress (ou stress multiple). Une des questions prégnantes en écotoxicologie concerne donc l'évaluation des impacts toxiques dans le cas de mélanges (à faibles doses) ou de combinaison multi-stress (Segner, 2007 ; Clements et Rohr, 2009). Bel et bien prégnante, cette question n'est cependant pas particulièrement nouvelle puisqu'elle était déjà clairement identifiée au début des années 2000 comme un des principaux défis de l'écotoxicologie (ex. Van Straalen, 2003 ; Eggen et al., 2004 ; Steinberg et Ale, 2005). Ce constat avait alors conduit certains auteurs à suggérer une évolution de l'écotoxicologie qui devait, à leur yeux, tendre vers « l'écologie du stress » (Van Straalen, 2003 ; Steinberg et Ale, 2005). Si cette vision rejoint sur de nombreux points celle des auteurs militant pour le « plus d'écologie dans l'écotoxicologie » (voir chapitre II.2.), elle ajoute une dimension supplémentaire en intégrant cette notion de stress (pas nécessairement de nature chimique), ou plus précisément de multi-stress, si l'on se réfère au contenu des articles précités. En poussant le raisonnement un peu plus loin, ne devrait-on donc pas affirmer ainsi que les études écotoxicologiques doivent s'orienter tant que possible vers des études d'écologie du stress multiple?

La plupart des études réalisées *in situ* s'inscrivent, de fait, dans un contexte multi-stress. Une partie de mes précédents travaux se place donc dans cette problématique mais je souhaite renforcer l'aspect « multistress » dans mes futures recherches, en me focalisant plus particulièrement dans un premier temps sur :

- i) la réponse des communautés microbiennes à des mélanges de toxiques,
- ii) l'influence des modifications climatiques (hausses thermiques et phénomènes d'assèchement) sur l'impact des toxiques sur ces communautés.

³⁹ IFRES : Initiative Française pour la Recherche en Environnement Santé (dans les domaines toxicologie, écotoxicologie, épidémiologie et sciences sociales)

Dans ce contexte multistress, je souhaite notamment mieux appréhender les processus d'adaptation des communautés microbiennes aux toxiques. Pour ce faire et pour comprendre ces processus et leur déterminisme, il me semble important de mettre en œuvre des recherches visant à caractériser les mécanismes fins impliqués dans cette adaptation. Cette perspective introduit une dimension supplémentaire à mes travaux, qui ont surtout cherché jusqu'à présent à établir des liens de causalité entre l'évolution des conditions d'exposition aux pesticides organiques et celles des capacités des communautés microbiennes en terme de tolérance et de biodégradation, sans réellement chercher à appréhender pour l'instant les mécanismes d'adaptation mis en jeu. En effet, si des modifications structurelles ont généralement été observées au sein des communautés, traduisant vraisemblablement le remplacement de populations sensibles par des populations mieux adaptées et donc une adaptation à l'échelle interspécifique, cela n'exclut pas l'existence de processus d'adaptation à des niveaux d'organisation inférieurs. Il sera donc intéressant d'étudier les mécanismes d'adaptation qui peuvent intervenir à des échelles intraspécifiques, et qui peuvent moduler ainsi la dynamique des différentes populations. Cet aspect fera donc l'objet d'une attention particulière au cours des prochaines années grâce notamment à une demande de renforcement de l'équipe, par l'intermédiaire du recrutement d'un jeune chercheur possédant de bonnes compétences dans le domaine de la génomique.

Le « défi du multistress », identifié depuis bien longtemps, est vaste et loin d'être relevé. Il nécessite donc de nombreux efforts de recherche qui dépassent l'échelle du chercheur ou d'un petit groupe de recherche. Or, si la faible taille et la forte dispersion de la communauté française des écotoxicologues ont été récemment soulignés (IFRES, 2013), ce constat est sans doute encore plus marqué pour la sous-partie représentée par sa « branche microbienne ». Ainsi, l'écotoxicologie microbienne reste une thématique en émergence qui ne bénéficie d'aucune structuration réelle en France, contrairement aux disciplines d'écologie microbienne et d'écotoxicologie, auxquelles elle se rattache. Je souhaite donc m'engager à titre personnel pour contribuer à une meilleure reconnaissance de cette thématique à l'échelle nationale et favoriser l'émergence d'une dynamique collective permettant de faciliter la mise en œuvre de projets ambitieux. Je souhaite également m'investir à l'échelle européenne, à travers le réseau « PICT » auquel je suis associé.

III.2. Evaluer les effets de stress multiples

III.2.1. Mélanges de toxiques

La problématique des effets de mélanges est particulièrement structurante au sein du Thème de Recherche BELCA puisqu'elle s'appuie principalement sur le couplage entre les échantillonneurs passifs et les tests de toxicité. Elle génère donc une étroite collaboration entre plusieurs équipes des UR MAEP et REBX appartenant respectivement aux centres Irstea de Lyon-Villeurbanne et Bordeaux. Aujourd'hui, celle-ci est principalement active dans le cadre du programme ANR CESA « POTOMAC » (2012-2015), porté par Nicolas Mazzella (UR REBX), qui vise entre autre à tester l'apport de différents échantillonneurs passifs pour caractériser la fraction toxique des eaux sur les biofilms microbiens.

III.2.1.1. Contexte

S'il s'avère nécessaire d'appréhender le potentiel toxique et l'impact écologique des pesticides en mélange, un débat persiste au sein de la communauté scientifique quant à la meilleure stratégie à adopter pour y parvenir (Knauert et al., 2009). Classiquement, les approches écotoxicologiques considérant les mélanges sont (i) orientées « substances », via l'exposition des organismes à des toxiques sélectionnés *a priori*, ou (ii) orientées « milieu » dans le cas de l'étude des réponses des organismes *in situ* à un cocktail naturel de contaminants.

Comme je l'ai écrit plus haut (§ II.4.2.3.), j'ai choisi d'aborder la problématique des mélanges en m'impliquant dans le développement des approches consistant à coupler l'utilisation d'échantillonneurs passifs et de tests de toxicité (aiguë ou chronique) afin d'évaluer le potentiel toxique de mélanges de substances directement extraits de milieux contaminés. En effet, à mes yeux, ce type de couplage novateur offre une possibilité réelle d'introduire plus de réalisme écologique dans les tests écotoxicologiques basés sur l'utilisation de mélanges, du fait de la représentativité environnementale⁴⁰ des combinaisons testées, avec notamment la prise en considération des métabolites. Il semble ainsi représenter une alternative à l'interface entre les entrées « substances » et « milieu », décrites ci-dessus. En outre, il peut également s'avérer intéressant d'un point de vue économique, puisque la possibilité d'utiliser directement les mélanges extraits du milieu permet de s'affranchir des dosages chimiques (au moins dans un premier temps). Il me semble également important de mentionner que ce choix s'inscrit pour partie dans une volonté de bénéficier de l'effort de recherche mené depuis plusieurs années par les laboratoires de chimie des centres Irstea de Lyon (LAMA) et de Bordeaux (CARMA) dans la mise au point et la validation des échantillonneurs passifs visant à caractériser les contaminations chroniques en pesticides organiques et inorganiques dans les milieux lotiques.

A l'heure actuelle, les travaux auxquels j'ai contribué ont exclusivement concerné des mélanges de pesticides extraits de POCIS, qui piègent les molécules les plus hydrophiles, en utilisant les paramètres photosynthétiques comme descripteurs d'effets, du fait de la prédominance des herbicides dans les milieux étudiés. Je ne reviendrai pas ici sur les résultats issus des tests de toxicité aiguë, décrits dans le § II.4.2.3. En complément à ces tests, nous avons également réalisé récemment deux expériences pour évaluer les effets chroniques de mélanges extraits de POCIS, directement utilisés pour contaminer des canaux artificiels à des concentrations comparables à celles du milieu d'origine dans lequel étaient immergés ces échantillonneurs (A16, A26). Si ces deux expériences ont confirmé l'intérêt potentiel de ce type d'approche, elles ont également révélé un certain nombre de limites méthodologiques.

⁴⁰ Même si cette représentativité n'est que partielle, du fait notamment d'un taux d'échantillonnage qui peut varier suivant les molécules (Harman et al., 2012)

La première concerne la difficulté à maintenir un niveau de contamination constant et réaliste sur des durées suffisamment longues, ce qui n'a pas été le cas lors de la première expérience (A16). Pour atteindre cet objectif, il est donc nécessaire de mettre en œuvre un système de renouvellement d'eau continu (même s'il n'est que partiel), afin de limiter l'abattement des concentrations au cours du temps (A26). Or, ceci implique de pouvoir disposer d'une quantité de pesticides suffisamment importante pour répondre aux besoins expérimentaux, qui dépendent des volumes d'eau nécessaires à l'alimentation des dispositifs et de la durée des expériences. Cette contrainte forte conditionne donc le nombre de POCIS à utiliser, qui peut devenir rapidement très important et représenter ainsi un facteur particulièrement limitant.

La seconde limite a trait à la nécessité de mettre en œuvre une gamme de descripteurs d'effets suffisamment large pour pouvoir réellement évaluer l'impact chronique des mélanges, qui peuvent se révéler composés de nombreuses molécules aux propriétés variées. Cette limite, qui n'est pas spécifique à ces approches, est ici assez contraignante. En effet, une des particularités de ce type de couplage tient au fait que la composition complète des mélanges n'est généralement pas connue lors du démarrage des expériences et il est toujours possible que certaines molécules présentes ne soient pas détectables (ou pas recherchées !) à l'aide des analyses chimiques (Harman et al., 2012). Par exemple, dans le cas des extraits de POCIS, qui piègent une grande majorité des herbicides, il peut s'avérer nécessaire de ne pas se cantonner aux descripteurs visant à évaluer uniquement les effets sur le photosystème II, tels que des mesures du rendement photosynthétique (Harman et al., 2012). Ce constat est encore plus fort si on le place dans un objectif qui vise à développer ces approches avec différents types d'échantillonneurs, afin de considérer une plus grande gamme de toxiques (pesticides organiques hydrophiles et hydrophobes, pesticides inorganiques...) ayant des cibles biologiques potentielles différentes.

III.2.1.2 Projets en cours et perspectives

Dans ce contexte, les perspectives de recherche visant à développer ce type de couplage avec les échantillonneurs passifs se situent à différents niveaux, en fonction du type d'échantillonneur passif et des propriétés chimiques des molécules piégées par chacun d'entre eux.

- **Métaux (extraits de DGT)**

Au regard des premiers travaux réalisés avec les POCIS, il semble possible de généraliser ces approches aux échantillonneurs qui piègent des molécules affectant les communautés phototrophes. Parmi les échantillonneurs actuellement disponibles et compte tenu des effets connus des métaux sur les activités microbiennes photosynthétiques il est donc envisageable d'effectuer des tests de toxicité avec des mélanges extraits du milieu à partir de DGT qui piègent ce type de substances.

A ma connaissance, l'évaluation de la toxicité d'extraits de DGT n'a fait l'objet que d'une seule étude (Roig et al., 2011), réalisée à partir de tests sur la bactérie *Vibrio fischeri* (test Microtox®). Celle-ci a

mis en évidence une bonne corrélation entre le niveau de toxicité des mélanges extraits et les concentrations métalliques dans le milieu, ce qui semble confirmer la pertinence de ce type de démarche. Cependant, d'un point de vue méthodologique, un des questionnements concerne la préparation des mélanges piégés par les DGT en vue de la réalisation des bioessais. En effet, la désorption des métaux de la résine des DGT s'effectue à l'aide d'une solution d'acide nitrique (HNO_3) et il faut neutraliser la solution extraite (par ajout de NaOH) avant de mesurer sa toxicité sur les communautés microbiennes, qui peuvent être sensibles à l'acidité du milieu. Il est donc nécessaire de s'assurer que ces deux étapes (acidification puis neutralisation), qui engendrent l'apport de quantités importantes de nitrates et de sodium, ne modifient pas fortement la réponse des communautés phototrophes lors des tests de toxicité aiguë.

Si elle est validée, ce type d'approche avec les extraits de DGT pourra également être élargie aux communautés hétérotrophes, en s'appuyant par exemple sur les protocoles décrits par Fechner et al. (2010) ou Tlili et al. (2010 ; 2011c) qui ont développé des approches PICT avec différents métaux à partir de mesures de potentiels enzymatiques (ex. β -glucosidase ou leucine-aminopeptidase) ou respiratoires. Cependant, il a été montré que le niveau de tolérance des communautés hétérotrophes aux métaux peut-être fortement conditionné par le contexte nutritif (Tlili et al., 2010 ; 2011b). Il est donc envisageable que la présence de sels dans les extraits de DGT, et notamment de nitrates, puisse, dans ce cas, biaiser fortement les résultats des tests de toxicité.

- *Pesticides hydrophobes*

Les échantillonneurs qui piègent les pesticides organiques les plus hydrophobes (ex. SBSE, SPMD,...) vont généralement concentrer majoritairement en milieu agricole des molécules de type fongicides, surtout dans les zones viticoles. En effet, ce type de culture, qui fait partie des plus fortes consommatrices de pesticides, occupe en France seulement 3,7% de la surface agricole utile (SAU) mais consomme de l'ordre de 20% des pesticides organiques (en masse) parmi lesquels une majorité (80%) de fongicides. Or, il existe aujourd'hui un déficit flagrant de travaux concernant l'impact des fongicides sur les communautés microbiennes aquatiques, contrairement à celui des herbicides et des éléments métalliques, relativement bien documenté.

Compte tenu du mode d'action de ces toxiques, les communautés microbiennes, et plus particulièrement les communautés fongiques, sont susceptibles d'être directement impactées par la présence de fongicides dans les milieux aquatiques. Quelques études récentes ont ainsi montré qu'une exposition chronique aux fongicides pouvait impacter des communautés fongiques aquatiques naturelles, tant au niveau structurel que fonctionnel (ex. Bundschuh et al., 2011; Rasmussen et al., 2012). Dans le cadre du post-doctorat de Joan Artigas, nous avons également mis en évidence l'impact potentiel du tébuconazole (un inhibiteur de la synthèse d'ergostérol) sur la structure des communautés fongiques et bactériennes, sur leur potentiel enzymatique (cellobiohydrolase, β -Glucosidase) et sur les processus de décomposition microbienne de litières de feuilles (voir pour plus de détails § III.2.2.2.).

Pour envisager la mise en œuvre de tests de toxicité aiguë avec des extraits principalement composés de fongicides, il est nécessaire d'identifier des descripteurs microbiens sensibles (et qui répondent rapidement) et de mettre au point les protocoles associés. Nous avons récemment initié ce type de démarche, en ciblant plusieurs activités hétérotrophes. Ainsi, une série d'expérience a été réalisée pour tester la toxicité aiguë de fongicides présents dans la Morcille sur des communautés fongiques colonisant des litières de feuilles. Trois de ces fongicides présentent un mode d'action ciblé sur des composants membranaires (le tebuconazole, le dimétomorphe et la spiromoxamine) et le quatrième agit sur les fonctions respiratoires (l'azoxystrobine). Plusieurs descripteurs ont été utilisés : la respiration induite et la respiration basale ainsi que six activités enzymatiques extra-cellulaires (β -glucosidase, β -glucosaminidase, cellobiohydrolase, phenol oxydase, laccase). Or, si les fongicides semblent avoir un impact sur certains de ces paramètres, les procédures utilisées n'ont pas permis de mettre en évidence un fort lien de causalité entre les concentrations et les effets observés sur les durées d'exposition testées (quelques heures à quelques jours). Ces premiers résultats mettent donc clairement en exergue un besoin de recherche important avant de pouvoir envisager la réalisation de tests de toxicité aiguë avec des mélanges de fongicides directement extraits du milieu.

- Approches EDA

Si l'utilisation de mélanges directement extraits de différents types d'échantillonneurs passifs offre la possibilité d'avoir une vision globale du potentiel toxique de mélanges « réalistes », ceux-ci sont appréhendés sous forme de boîte noire, sans possibilité d'identifier les molécules les plus toxiques ou d'évaluer les interactions entre les molécules. A mes yeux, il serait donc intéressant d'envisager à terme le développement des approches dites EDA (« Effect-directed analysis » ; Brack, 2003) avec ce type de mélanges, afin de permettre l'identification de la fraction toxique, c'est-à-dire la substance (ou le groupe de substances) responsable des principaux effets. Les approches EDA sont également des approches sans *a priori* qui conditionnent la recherche des contaminants à partir de procédures de fractionnement successifs, en fonction d'une toxicité potentielle, qui est elle-même évaluée par rapport à des organismes et des réponses biologiques ciblées (Fig. 31).

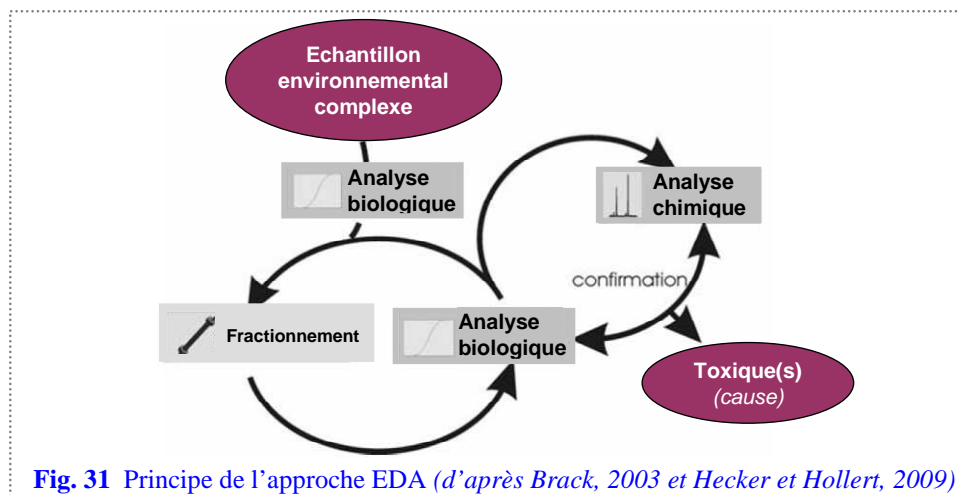


Fig. 31 Principe de l'approche EDA (d'après Brack, 2003 et Hecker et Hollert, 2009)

Plusieurs auteurs ont ainsi mis en évidence, à partir d'articles de synthèse, l'intérêt des approches EDA dans les démarches d'évaluation des risques environnementaux, et notamment dans le cadre de la DCE (Brack et al., 2007 ; Hecker et Hollert, 2009). Brack et al. (2007) ont toutefois souligné la nécessité de développer ces approches à des niveaux d'organisation biologique élevés (populations et communautés) afin d'améliorer leur réalisme écologique. Dans ce sens, les communautés microbiennes peuvent représenter des modèles d'études particulièrement adaptés à cette problématique. Cela renforce donc la nécessité de multiplier le nombre de descripteurs microbiens pour évaluer la toxicité aiguë des mélanges, afin d'élargir le champ possible d'investigation, tout en soulignant l'importance d'une interdisciplinarité forte entre chimistes et écotoxicologues (microbiens ou non). Le contexte scientifique dans lequel j'évolue me semble donc particulièrement propice pour envisager à moyen terme de m'investir dans le développement de ce type d'approches, qui semblent représenter une suite logique aux travaux que nous menons actuellement avec les échantillonneurs passifs.

III.2.2. Influence des modifications climatiques

Les recherches concernant l'influence des conditions thermiques sur les communautés microbiennes ont été initiées récemment dans le cadre du programme Microtherm (convention EDF-INRA-Irstea, 2011-2013). Elles font actuellement l'objet de la thèse d'Anne-Sophie Lambert (2012-2015), qui vise à apprécier l'influence de la température sur la réponse de biofilms au cuivre. Les aspects assèchements ont quant à eux été partiellement abordés dans le cadre des projets ANR CEP Wetchange (2010-2013) et EC2CO-BIOHEFFECT Interhym (2012-2013) et ils devraient faire l'objet prochainement de travaux de stages dans le laboratoire.

III.2.2.1. Contexte

Dans le contexte du changement global et de la multiplicité des pressions, il me paraît important de tenir compte des modifications climatiques qui peuvent affecter directement les communautés microbiennes, modifier leurs conditions d'exposition aux toxiques et moduler les impacts de ces derniers.

Une des modifications importantes concerne le réchauffement. En effet, avec une augmentation moyenne des températures de près de 1°C au cours des 100 dernières années, notre planète est soumise à des modifications thermiques sans précédent (Acuña et al., 2008) et plusieurs scénarios prédisent une augmentation supérieure à 0,2°C tous les 10 ans au cours des prochaines décennies, entraînant une hausse de 2 à 4,5°C d'ici 2100 (IPCC, 2007). Ce réchauffement peut entraîner une hausse de la température des eaux de surface et engendrer ainsi un impact biologique direct sur les communautés aquatiques, et notamment sur le compartiment microbien, tant au niveau de la biodiversité que des capacités métaboliques des communautés (voir pour revue [RE2](#) et [A28](#)).

Les modifications climatiques peuvent également engendrer des changements importants des régimes hydrologiques. Ainsi, les variations de débit, les baisses de niveau d'eau et les phénomènes d'assèchements temporaires deviennent plus fréquents, en particulier en région méditerranéenne, en raison du réchauffement et des besoins accrus de l'agriculture irriguée (Larned et al., 2012). Les modifications des conditions hydrologiques peuvent affecter les communautés microbiennes phototrophes et hétérotrophes, tant au niveau structurel que fonctionnel (Amalfitano et al., 2008 ; Timoner et al., 2012). Outre cet impact direct, elles peuvent aussi favoriser indirectement l'altération de la qualité chimique des cours d'eau, suite à une diminution des capacités de dilution des substances toxiques dans les milieux aquatiques récepteurs (Wilby et al., 2006, 2010).

Dans ce contexte, Wilby et al. (2006) ont mis en exergue la nécessité de prendre en compte les changements climatiques pour la mise en œuvre de la DCE. Un rapport technique de la commission européenne a ainsi récemment appuyé ce constat en proposant des aménagements à inclure en conséquence dans les prochains cycles de la DCE (European Commission, 2009).

Si la caractérisation des effets des contaminants en milieu aquatique fait l'objet de nombreuses études, la prise en compte des interactions des modifications climatiques sur leurs impacts écotoxicologiques est encore peu documentée (Holmstrup et al., 2010). Les travaux publiés ciblent principalement les pollutions de type métallique et ils tendent à montrer une augmentation des effets toxiques des métaux sur divers organismes aquatiques macroscopiques (poissons, macroinvertébrés...) lorsque les températures s'élèvent (Heugens et al., 2001; Holmstrup et al., 2010).

Au niveau microbien, seuls Boivin et al. (2005) ont cherché à appréhender les effets cumulés d'une pollution métallique au cuivre et d'une hausse de la température sur des communautés bactériennes périphytiques. Ces travaux ont montré que la réponse de ces communautés au toxique était fortement conditionnée par le niveau thermique. Ils confirment l'existence possible d'une interaction entre le cuivre et la température sans permettre toutefois de savoir si la modulation des effets en fonction des conditions thermiques résulte d'une modification de la biodisponibilité du cuivre et/ou d'une modification de la sensibilité des communautés en fonction de la température testée.

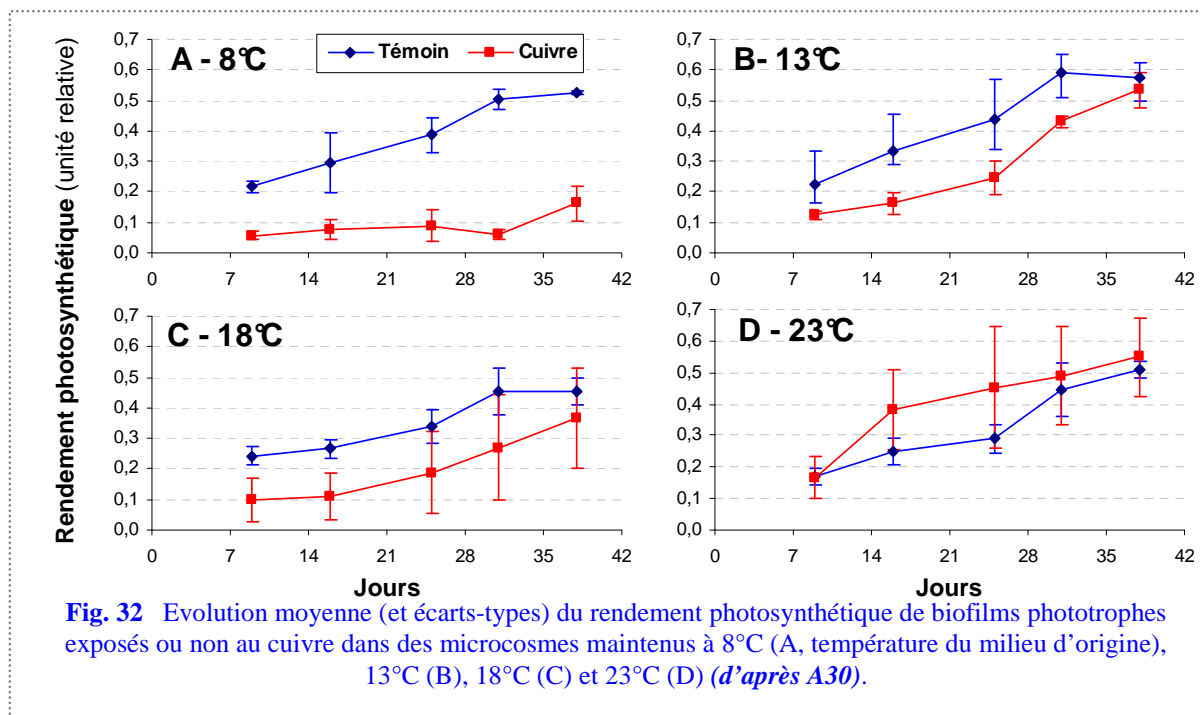
III.2.2.2. Projets en cours et perspectives

Au regard du contexte décrit précédemment, il apparaît donc important d'appréhender l'influence des facteurs physiques (température et/ou régime hydrologique), tant sur la sensibilité directe des communautés microbiennes aux toxiques que sur leurs modalités d'exposition à ces substances, afin de réellement apprécier les interactions dans ce type d'approches multistress.

- **Influence des modifications climatiques sur l'impact de polluants métalliques**

Une première expérience en microcosmes, réalisée dans le cadre de la thèse d'Anne-Sophie Lambert (A30), a permis de mettre en évidence une modulation des effets du cuivre (15 µg/L) sur des communautés périphytiques phototrophes prélevées dans la Morcille en période hivernale

(température du milieu = 8°C) lorsque la température est augmentée de 5°C à 15°C. Ainsi, si ce métal affecte fortement la structure (biomasse totale ou algale, composition diatomique...) et l'activité (rendement photosynthétique) des communautés phototrophes à la température du milieu, ces effets deviennent transitoires voire imperceptibles à des températures comprises entre 13°C et 23°C (voir par exemple Fig. 32 pour le rendement photosynthétique).

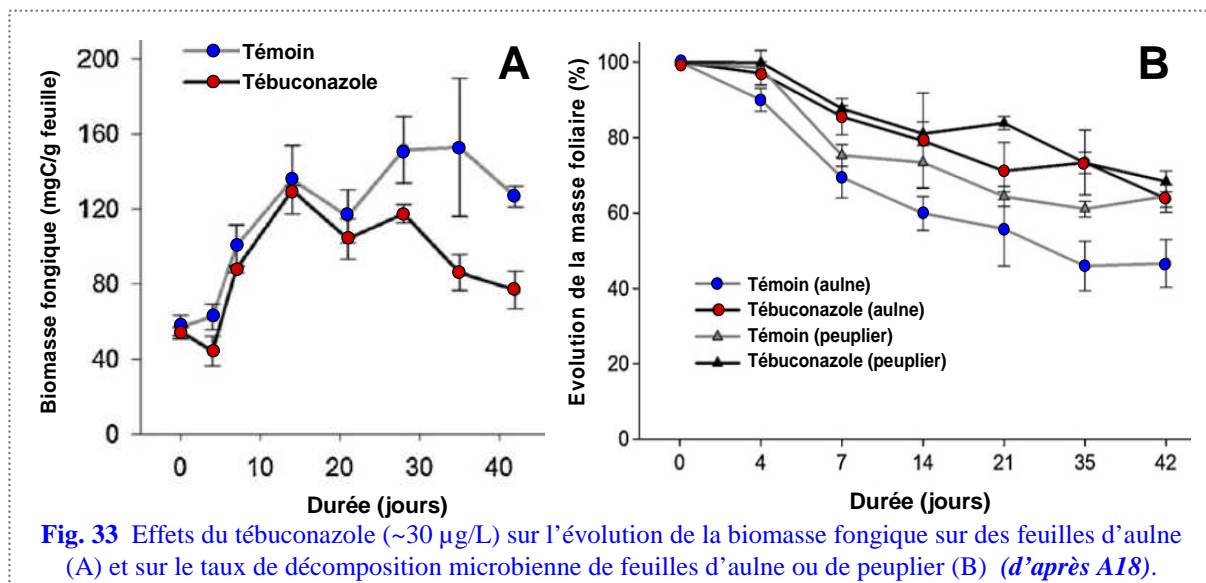


La température semble donc représenter un facteur de forçage important et les analyses statistiques mettent en évidence une interaction marquée entre ce paramètre et le niveau d'exposition au cuivre. Cependant, les résultats de cette première expérience font naître de nombreuses questions. Celles-ci concernent notamment l'influence directe ou indirecte de la température sur la biodisponibilité du cuivre et le caractère saisonnier du niveau de sensibilité des communautés aux deux facteurs étudiés. Ils soulèvent également des interrogations méthodologiques quant aux choix des conditions thermiques lors des incubations mises en œuvre pour les mesures d'activités microbiennes, en particulier pour les approches PICT. Ces questions seront abordées au cours du travail de thèse d'Anne-Sophie Lambert, programmée jusqu'à fin 2015.

- Influence des modifications climatiques sur l'impact de fongicides

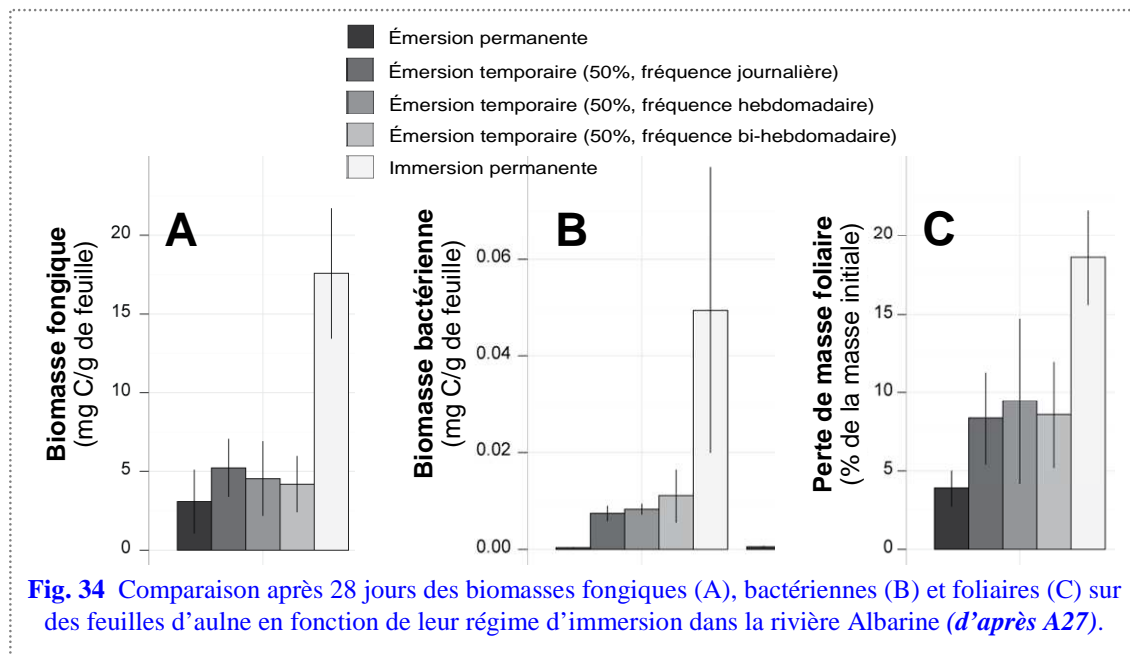
Je souhaite également poursuivre ma collaboration avec Joan Artigas (LMGE, Clermont-Ferrand) sur la problématique des effets de fongicides sur les communautés hétérotrophes (bactéries et champignons), appréhendée au cours de son post-doctorat (qu'il a effectué sous ma responsabilité de 2010 à 2012), en considérant l'influence potentielle des modifications climatiques.

Parmi les pesticides, les fongicides sont probablement ceux dont les effets sur les communautés microbiennes aquatiques sont les moins connus. Les premières expériences que nous avons réalisées en canaux artificiels avec Joan Artigas ont montré l'impact potentiel du fongicide tébuconazole (TBZ) sur des biofilms microbiens (A18 ; A24). Ainsi, ces travaux ont mis en évidence une forte réduction de la biomasse fongique (ex. Fig. 33A) et bactérienne et un fort remaniement de la diversité (caractérisé par PCR-ARISA) dans les communautés fongiques et bactériennes exposées au TBZ (2 à 30 µg/L). Sur des communautés se développant sur des substrats végétaux (feuilles d'aulne et de peuplier), cet impact structural a été associé un fort impact fonctionnel, engendrant une réduction significative du potentiel enzymatique (cellobiohydrolase, β-Glucosidase) et une réduction de la vitesse de dégradation des feuilles, plus marquée dans le cas de l'aulne (Fig. 33B). Cette inhibition des processus de décomposition microbienne de litières végétales peut avoir un impact important sur le fonctionnement écologique des hydrosystèmes. En effet, dans les milieux aquatiques, et en particulier dans les cours d'eau situés en tête de bassin versant, les communautés microbiennes hétérotrophes (principalement les champignons qui représentent généralement près de 95% de la biomasse microbienne totale sur les substrats végétaux) sont fortement impliquées dans ces processus de décomposition qui représentent un service écosystémique majeur puisqu'ils entretiennent la dynamique trophique, via le recyclage de la matière organique.



En parallèle, des travaux réalisés *in situ* dans le cadre du post-doctorat d'Arnaud Foulquier et du programme Interhym (EC2CO-BIOHEFFECT, 2012-2013) ont révélé une influence forte du régime hydrologique, et plus particulièrement des phénomènes d'assèchements temporaires, sur la structure et l'activité de décomposition de communautés bactériennes et fongiques présentes sur des litières de feuilles d'aulne (A27).

Ainsi, après 28 jours de suivi, les résultats montrent clairement que la biomasse microbienne diminue lorsque la durée cumulée des périodes d'émergence augmente et ce, quelle que soit la fréquence considérée (journalière, hebdomadaire, bi-hebdomadaire ; Fig. 34A et 34B). Cette diminution engendre dans le même temps une inhibition des processus de décomposition des feuilles d'aulne, puisque celle-ci, de l'ordre de 18% pour les feuilles immergées en permanence, est divisée par deux pour les feuilles immergées 50% du temps (sans influence de la fréquence d'émergence) et par 4 lorsque les feuilles sont maintenues en permanence hors de l'eau (Fig. 34C). Ces observations sont en accord avec celles de Langhans et Tockner (2006) dans une étude visant à évaluer l'influence d'épisodes d'inondations sur les processus de décomposition microbienne de feuilles de peupliers. En complément à cet aspect fonctionnel, notre approche a mis en évidence une influence forte des durées d'immersion sur la structure génétique des communautés bactériennes et fongiques (A27).



L'ensemble de ces travaux montrent donc que la structure et l'activité des communautés hétérotrophes impliquées dans la décomposition des substrats végétaux peuvent être impactées à la fois par la présence de fongicides et par des modifications du régime hydrologique engendrant des périodes d'assèchements de durée et de fréquence variables. Dans l'état actuel des connaissances, il m'apparaît donc intéressant de mettre en œuvre des travaux visant à évaluer les interactions possibles entre ces deux types de stress.

Dans ce sens, une première expérience en canaux artificiels de laboratoire devrait être prochainement réalisée en collaboration avec Joan Artigas, dans le cadre d'un co-encadrement d'un stage de Master. Cela pourrait donner lieu par la suite à un projet de thèse sur cette problématique.

III.3. Etudier les mécanismes d'adaptation microbienne

L'adaptation des communautés microbiennes aux toxiques est au cœur de nombreux projets dans lesquels je suis impliqué. Cependant, une attention plus particulière est portée à l'étude des mécanismes mis en jeu dans le projet ANR Bioadapt SequAdapt (2012-2015) qui concerne la tolérance aux métaux et dans le projet Ecophyto-IMPEC (2012-2015) qui s'intéresse au potentiel de biodégradation des pesticides organiques. Des échanges avancés sont également en cours avec la plateforme de recherche en écotoxicologie de Rovaltain afin de mettre en œuvre un dispositif expérimental de type bassin versant, permettant d'étudier finement les processus d'adaptation microbienne aux pesticides à cette échelle.

III.3.1. Mécanismes impliqués dans la tolérance au cuivre

Dans un premier temps, j'envisage principalement de m'impliquer dans des travaux abordant les mécanismes d'adaptation à l'échelle moléculaire. Pour compléter la démarche utilisée actuellement dans les approches PICT, je souhaite notamment développer des recherches ciblées sur les gènes de résistance aux toxiques, en m'intéressant d'abord à l'adaptation des communautés bactériennes aux polluants métalliques, et plus particulièrement au cuivre (notamment dans le cadre de la thèse d'Anne-Sophie Lambert).

En effet, les bactéries ont développé différents systèmes de résistance aux métaux traces, décrits en détails dans plusieurs articles de synthèse (ex. Silver et Phung, 1996 ; Nies, 1999 ; Bruins et al., 2000). Il est possible de distinguer les mécanismes de résistance non inductibles des mécanismes de résistance induits en réponse à la concentration en cuivre, qui dépendent du métabolisme et impliquent des enzymes/protéines codées par des gènes spécifiques. Ainsi, des mécanismes de résistance tels que la séquestration ou la conversion enzymatique diffèrent des résistances aux métaux lourds qui sont liées, pour leur part, à la présence de gènes localisés sur des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides. Ceux-ci portent notamment les déterminants de résistance qui assurent l'extrusion des métaux. Parmi les transporteurs permettant l'efflux des métaux grâce à l'hydrolyse de l'ATP, les pompes ATPasiques de type P sont les plus connues (Argüello et al., 2007, De la Iglesia et al., 2010). Elles sont le plus souvent très spécifiques du métal (ou des métaux) qu'elles exportent. Dans le cas du cuivre, elles appartiennent ainsi généralement à la sous famille P1-B (De la Iglesia et al., 2010), la plus connue étant l'ATPase CopA (Rensing et Grass, 2003). La compilation des informations génétiques concernant les souches bactériennes possédant de fortes capacités de résistance au cuivre révèlent ainsi la présence systématique de gènes homologues au gène *copA*, codant pour cette ATPase (Lejon et al., 2007).

Une première piste de travail pourrait donc être le développement au laboratoire d'une approche de PCR quantitative sur ADN et ARN, en s'appuyant sur les données disponibles dans la littérature (ex. Lejon et al., 2007 ; De la Iglesia et al., 2010 ; Besaury et al., 2013) et sur la collaboration engagée avec les équipes de Lise Fechner (Irstea Antony) et Fabienne Petit (Université de Rouen) dans le cadre du projet ANR Bioadapt SequAdapt. Ce type d'approche, peu utilisée sur des échantillons naturels (Besaury et al., 2013), permettrait de vérifier la présence de ces gènes au sein des communautés que

nous étudions puis d'établir le lien entre leur niveau d'expression et les mesures de tolérance réalisée à partir de diverses fonctions hétérotrophes. Cela pourrait également offrir la possibilité d'étudier le déterminisme de ce type de gènes et notamment l'influence du niveau d'exposition au cuivre et de facteurs environnementaux (tels que la température) sur leur niveau d'expression.

III.3.2. Mécanismes impliqués dans la biodégradation des pesticides organiques

Je souhaite également maintenir et renforcer la collaboration avec Fabrice Martin-Laurent (INRA Dijon) en développant des travaux visant à mieux appréhender les processus adaptatifs des communautés bactériennes à la biodégradation des pesticides organiques. A partir de molécules modèles, telles que l'atrazine et le diuron, pour lesquels nous connaissons tout ou partie des gènes impliqués dans les voies de dégradation, nous chercherons à comprendre les processus évolutifs conduisant à l'apparition (et la disparition éventuelle) de populations dégradant ces polluants. Une attention particulière sera portée sur la connectivité des différents éléments du paysage, afin de mieux évaluer l'influence des transferts du potentiel dégradant des communautés terrestres aux communautés aquatiques.

Ces travaux s'appuieront fortement sur l'expertise de l'équipe de Fabrice Martin-Laurent, qui a développé ces dernières années de nombreux outils permettant de caractériser la plasticité génétique des populations microbiennes dégradant les pesticides organiques, et notamment l'atrazine (ex. Devers et al., 2007a, 2007b, 2008 ; Changey et al., 2011).

Ils seront mis en œuvre dans un premier temps dans le cadre du projet Ecophyto-IMPEC qui vise à contribuer au développement d'indicateurs microbiens pour l'évaluation de l'impact des pesticides sur des fonctions écosystémiques terrestres et aquatiques, en ciblant notamment la fonction filtre associée à la biodégradation des pesticides organiques.

Il est également à noter que j'ai coordonné l'année dernière la rédaction d'un programme de recherche ayant pour but de développer une approche interdisciplinaire (biochimie, microbiologie, génétique, chimie et bioinformatique) afin d'étudier les processus clés qui conduisent à l'adaptation des microorganismes à la biodégradation de pesticides, en prenant l'atrazine comme molécule modèle. Il visait à considérer une approche intégrative, des gènes de dégradation aux différents éléments du paysage, à partir de l'utilisation combinée de plusieurs approches moléculaires (génomique, protéomique et métabolomique) maîtrisées par les différents partenaires (UMR Agroécologie, INRA de Dijon, UMR LMGE Clermont-Ferrand et UMR ICCF Clermont-Ferrand). Si ce programme, proposé dans le cadre de l'appel à projet ANR BIOADAPT 2013, n'a pas été retenu en état, il offre une base de réflexion solide pour la mise en œuvre rapide d'une collaboration avec ces différentes équipes afin d'explorer ces processus.

La poursuite de cette thématique de recherche devrait également pouvoir s'appuyer sur une collaboration avec la nouvelle plateforme de recherche en écotoxicologie de Rovaltain, des échanges avancés étant en cours pour la mise en œuvre, dans ce cadre, d'un dispositif expérimental de type bassin versant, permettant d'étudier finement les processus d'adaptation microbienne aux pesticides à cette échelle. La réflexion à ce sujet implique les équipes Ecologie Microbienne des Hydrosystèmes Anthropisés (Stéphane Pesce et Marc Neyra) et Pollutions Diffuses (Nadia Carluer et Véronique Gouy) ainsi que le Laboratoire d'Analyses des Milieux Aquatiques (Christelle Margoum et Marina Coquery) de l'UR MAEP du centre Irstea de Lyon-Villeurbanne et l'équipe Ecologie Microbienne Fonctionnelle des Intrants (Fabrice Martin-Laurent et Marion Devers) de l'UMR Agroécologie du centre INRA de Dijon. Elle devrait se conclure par le dépôt d'un projet d'ici fin 2013.

III.4. Fédérer l'écotoxicologie microbienne à l'échelle nationale

Malgré une forte demande politique et sociétale en relation avec des préoccupations d'impact environnemental et de santé publique, l'écotoxicologie microbienne reste une thématique en émergence. En effet, si elle est représentée dans de nombreux centres de recherches appartenant à différents instituts, il apparaît qu'elle ne bénéficie d'aucune structuration réelle en France. Fort de ce constat, je me suis associé à Fabrice Martin-Laurent (INRA, Dijon) pour organiser pour la première fois des journées thématiques entièrement consacrées à l'écotoxicologie microbienne.

Ces journées, qui ont été financées par Irstea et le Réseau ECOTOX de l'INRA, se sont déroulées en mars 2013 au centre Irstea de Lyon-Villeurbanne. Réunissant une quarantaine de chercheurs représentant 25 laboratoires (Fig. 35), elles avaient pour vocations principales de dresser un état des lieux des forces en présence dans le domaine de l'écotoxicologie microbienne à l'échelle nationale et d'engager une réflexion collective quant aux évolutions futures de cette thématique.

L'objectif, *in fine*, était d'identifier la communauté impliquée dans ce domaine pour améliorer sa visibilité et dégager des pistes de prospective et de valorisation communes en engageant une démarche collective participative avec l'ensemble de la communauté présente. Pour ce faire, il a tout d'abord été choisi d'impliquer les participants en amont, en leur demandant de répondre à un questionnaire ayant pour but de dresser un premier état des lieux de l'écotoxicologie microbienne dans le paysage de recherche national. La présentation de la synthèse des résultats issus de ce questionnaire et d'une analyse bibliométrique réalisée par Anne-Laure Achard (documentaliste Irstea) a ainsi offert un cadre introductif aux journées en s'appuyant uniquement sur les réponses des différents acteurs. Cela a ainsi permis d'établir un premier constat collectif qui a contribué à initier une base de réflexion pour la suite des échanges. Celle-ci a également été alimentée par le contenu des différentes conférences effectuées par Jeanne Garric⁴¹, Christian Mougin⁴², Philippe Garrigues⁴³ et Ed Topp⁴⁴.

⁴¹ Directrice Adjointe Scientifique au Département Eaux d'Irstea

⁴² Responsable du réseau des Ecotoxicologues de l'INRA

Ces différentes étapes s'inscrivaient dans une démarche d'évaluation, qui visait à identifier les forces en présence dans le domaine de l'écotoxicologie microbienne à l'échelle nationale et à dresser un premier état des lieux de la thématique et de sa visibilité. Ceci avait pour but principal d'initier une démarche collective prospective à partir des éléments contextuels décrits dans les différentes présentations. Cette démarche prospective s'est établie selon de trois phases successives visant à :

1. identifier les enjeux forts de l'écotoxicologie microbienne
2. définir des objectifs et des pistes d'actions à mettre en œuvre
3. fixer des niveaux de priorités aux actions à engager

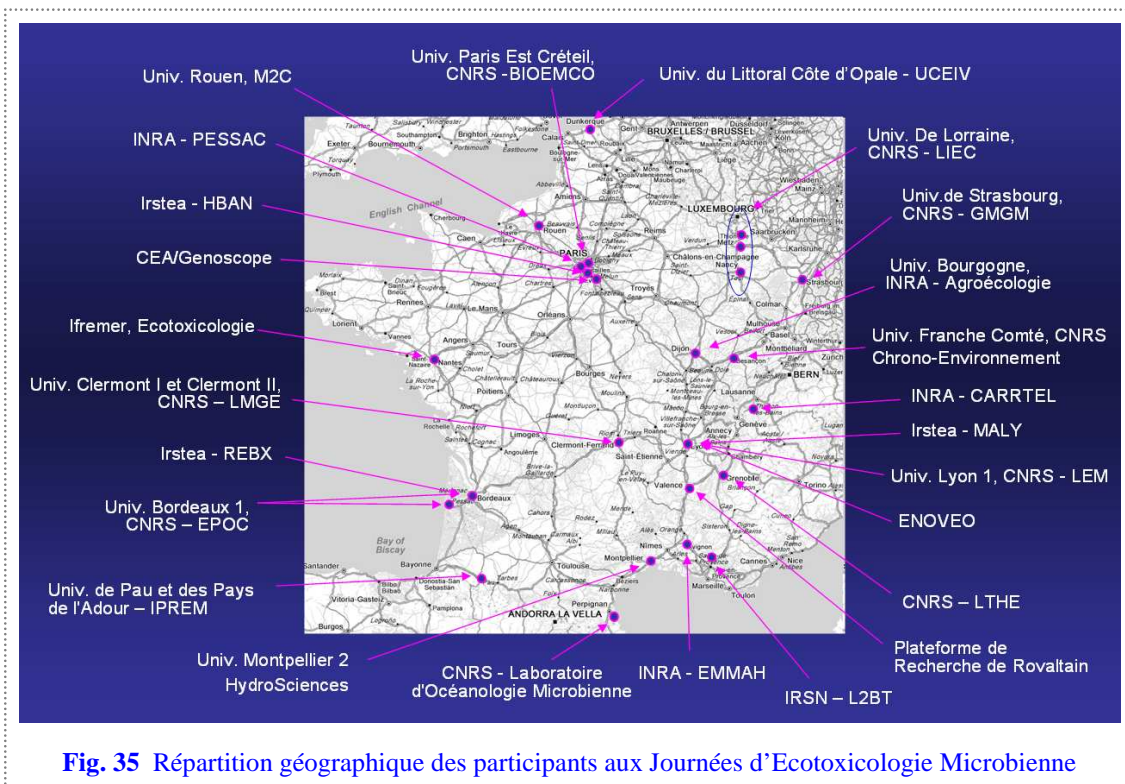


Fig. 35 Répartition géographique des participants aux Journées d'Ecotoxicologie Microbienne

Quatre groupes d'enjeux ont ainsi été identifiés, à savoir un enjeu sociétal (comment favoriser les interactions entre la recherche en écotoxicologie microbienne et la société ?), un enjeu scientifique (comment mieux évaluer les impacts « réels » des toxiques dans des environnements complexes ?), un enjeu d'interface (comment passer de la connaissance scientifique à la formulation de recommandations ?) et un enjeu organisationnel (comment améliorer la reconnaissance et lisibilité de l'écotoxicologie microbienne ?).

⁴³ Directeur de l'Institut des Sciences Moléculaires, ISM, UMR 5255 CNRS, Université Bordeaux I ; Editeur en chef de la revue *Environmental Science and Pollution Research*

⁴⁴ Directeur de Recherche à Agriculture and Agri-Food Canada

Si la majeure partie de mon activité vise à contribuer à répondre aux enjeux scientifiques associés à l'écotoxicologie microbienne, je souhaite néanmoins poursuivre la démarche initiée avec cette première rencontre, en m'impliquant fortement dans des actions répondant à l'enjeu organisationnel. Parmi les objectifs fixés par les participants pour répondre à cet enjeu, il est ressorti une nécessité de structurer la recherche en écotoxicologie microbienne et de fédérer les acteurs impliqués dans celle-ci, afin d'augmenter la reconnaissance et la lisibilité de cette thématique au niveau national. En conséquence, plusieurs pistes d'actions possibles ont été identifiées pour répondre à ce besoin. Elles sont listées dans la Fig. 36.

RECONNAISSANCE ET LISIBILITÉ DE L'ÉCOTOXICOLOGIE MICROBIENNE

ACTIONS

1. Établir une liste de diffusion des chercheurs au niveau national voire européen (mots clés recherche) – **14 points**
2. Créer un site web spécifique (pérenne) – **10 points**
3. Créer des réseaux de recherche spécifiques (GDR, action COST,...) – **10 points**
4. Proposer des sessions spécifiques sur l'écotoxicologie microbienne dans les colloques – **7 pts**
 - Restitution de nos travaux (Journées des 20 21 22 mars) au colloque de l'AFEM
 - colloques SETAC, SEFA, SFM,...
5. Intégrer les problématiques de l'écotoxicologie microbienne dans les réflexions des grands organismes – **6 points**
 - ALLENI, AVISAN
 - Perspective SIC
6. Vers une approche rationnelle des recherches menées au niveau national - **5 points**
 - Identifier les complémentarités (contaminants, sites d'études,...)
7. Créer un réseau d'enseignants pour réfléchir sur l'offre de formation (Club)

Fig. 36 Pistes d'action identifiées par l'ensemble des participants pour répondre aux objectifs associés à l'enjeu organisationnel (*le nombre de points reflète le niveau de priorité fixé*)

En collaboration avec Fabrice Martin-Laurent et d'autres participants (en particulier Fabienne Petit de l'Université de Rouen et Jean-François Ghiglione du LOMIC à Banyuls sur mer), je me suis donc investi rapidement pour mettre en œuvre certaines de ces actions, à savoir notamment:

- une contribution intégrée à la réflexion sur la prospective SIC menée par le CNRS (INSU)
- une contribution à la rédaction du rapport IFRES (juillet 2013)
- la présentation des principales conclusions des journées d'écotoxicologie microbienne aux congrès SEFA⁴⁵ (juillet 2013) et AFEM⁴⁶ (octobre 2013)
- la programmation d'une session dédiée à l'écotoxicologie microbienne aux congrès SEFA (juillet 2013) et SFM⁴⁷ (avril 2014)
- la mise en place d'une liste de diffusion (ecotoxicomic@lists.irstea.fr) pour faire circuler les principales informations concernant l'écotoxicologie microbienne.

⁴⁵ SEFA : Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée

⁴⁶ AFEM : Association Francophone d'Ecologie Microbienne

⁴⁷ SFM : Société Française de Microbiologie

A ces actions déjà engagées, s'ajoutent l'ouverture prochaine d'un site internet (<http://ecotoxicomic.irstea.fr/>, en cours de création) et l'organisation en 2014 d'un colloque entièrement dédié à l'écotoxicologie microbienne⁴⁸. L'objectif est de contribuer à créer et maintenir une dynamique afin de favoriser les échanges et les interactions entre les différentes équipes, en faisant émerger une communauté qui dépasse les cloisonnements (tels que ceux liés par exemple aux différents types de milieux étudiés).

III.5. M'impliquer activement dans le « réseau PICT » européen

En 2012, j'ai eu la chance d'être convié par Renata Behra au workshop européen «Biofilm Workshop: Field applications of pollution induced community tolerance measurements». Cela m'a permis de rencontrer les principaux chercheurs impliqués dans les recherches sur le PICT et de participer à une réflexion globale quant aux possibilités de structuration de ces recherches à l'échelle européenne.

Ce workshop a donné lieu à la rédaction d'un projet EU-COST⁴⁹ visant à favoriser les échanges entre les différents laboratoires impliqués (représentant la France, l'Espagne, l'Allemagne, la Suisse, la Suède, le Portugal et le Royaume-Uni). Si ce projet n'a pas été retenu, il a tout de même été décidé de poursuivre la mise en œuvre de ce groupe européen. Dans ce contexte, j'ai décidé de m'impliquer fortement en me portant volontaire pour organiser en 2014 un nouveau rassemblement à Lyon.

Ces journées permettront de décrire les avancées majeures dans les approches PICT, d'identifier les pistes de recherche les plus prometteuses et de favoriser les échanges et interactions afin d'harmoniser les méthodes employées. L'objectif est de réussir à créer et pérenniser un véritable réseau européen permettant d'établir une synergie entre les différentes équipes impliquées dans cette thématique de recherche.

III.6. Entre science appliquée et recherche opérationnelle

Enfin, et même si elle ne conduit pas actuellement à des perspectives concrètes, je souhaite également mentionner ici une réflexion personnelle croissante sur le potentiel de transfert d'une partie de mes recherches. En effet, il me semble important de garder à l'esprit que les travaux menés en écotoxicologie doivent contribuer à répondre à terme à la demande sociétale en matière de gestion environnementale et de développement durable. Ils doivent donc viser à fournir des éléments, voire des outils, permettant de mieux appréhender les risques environnementaux et/ou de mieux évaluer la qualité écologique des milieux exposés aux substances chimiques.

⁴⁸ vraisemblablement à Banyuls sur mer du 21 au 23 mai 2014 (organisateur principal: Jean-François Ghiglione)

⁴⁹ « New effect-based monitoring approach to provide causal links between chemical and ecological status in European waters: Harmonisation and simplification of PICT methodologies » ; porteur : Hans Blanck, Université de Göteborg, Suède

Au regard de mes propres recherches, il me semble donc intéressant d'envisager à plus ou moins long terme le développement d'outils opérationnels visant à utiliser les communautés microbiennes aquatiques benthiques pour évaluer la qualité écologique des cours d'eau et contribuer aux processus de bioremédiation des pesticides. Cependant, cette réflexion sur la continuité des travaux de la recherche au transfert doit s'effectuer collectivement, et nécessite, *a minima*, une évaluation scientifique précise de l'état de maturité des outils en terme de « niveau de transférabilité », quant à leur champ d'utilisation, leurs limites d'interprétation, etc ...

Chapitre IV
Publications et communications scientifiques

IV.1. Publications internationales

Les publications internationales sont numérotées de A1 à A30 (par ordre chronologique décroissant). Cette numérotation est utilisée dans le manuscrit pour faire référence aux articles correspondants.

Articles publiés ou sous presse (23)

- A23** - ARTS G., BABUT M., BARRA CARACCILO A., CARLUER N., DOMANGE N., FRIBERG N., GOUY V., GRUNG M., LAGADIC L., MARTIN-LAURENT F., **PESCE S.**, REAL B., REICHENBERGER S., ROEX E.W.M., ROMIJN K., RÖTTELE M., STENRØD M., TOURNEBIZE J., VERNIER F., VINDIMIAN E. Pesticide risk assessment and management in a globally changing world – Report from a European interdisciplinary workshop. *Environ. Sci. Pollut. Res.* (sous presse)
- A22** - **PESCE S.**, BEGUET J., ROUARD N., DEVERS-LAMRANI M., MARTIN-LAURENT F., 2013. Real-Time PCR quantification of phenylurea hydrolases A and B (puhA and puhB) genes in soil and sediment samples exposed to diuron. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 1661-1668.
- A21** – **PESCE S.**, MARGOUM C., ROUARD N., FOULQUIER A., MARTIN-LAURENT F., 2013. Freshwater sediment pesticide biodegradation potential as an ecological indicator of microbial recovery following a decrease in chronic pesticide exposure: A case study with the herbicide diuron. *Ecol. Indic.* 29, 18-25.
- A20** - MORIN S., ROUBEIX V., BATISSON I., WINTERTON P., **PESCE S.**, 2012. Characterization of freshwater diatom communities: comparing taxonomic and genetic-fingerprint approaches. *J. Phycol.* 48, 1458-1464.
- A19** - ROUBEIX V., **PESCE S.**, MAZZELLA N., COSTE M., DELMAS F., 2012. Variations in periphytic diatom tolerance to agricultural pesticides in a contaminated river: An analysis at different diversity levels. *Fresen. Environ. Bull.* 21, 2090-2094.
- A18** - ARTIGAS J., MAJERHOLC J., MARGOUM C., VOLAT B., NEYRA M., **PESCE S.**, 2012. Effects of the fungicide tebuconazole on microbial capacities for litter breakdown in streams. *Aquat. Toxicol* 122-123, 197-205
- A17** - MORIN S., LAMBERT A.S., ARTIGAS J., COQUERY M., **PESCE S.**, 2012. Diatom immigration drives biofilm recovery after chronic copper exposure. *Freshwat. Biol.* 57, 1658–1666.
- A16** - MORIN S., **PESCE S.**, KIM-TIAM S., LIBERT X., COQUERY M., MAZZELLA N., 2012. Periphyton tolerance following chronic exposure to low doses of pesticides in mixtures. *Ecotoxicology* 21, 1570–1580.
- A15** - LAMBERT A.S., MORIN S., ARTIGAS J., VOLAT B., COQUERY M., NEYRA M., **PESCE S.**, 2012. Structural and functional recovery of microbial biofilms after a decrease in copper exposure: Influence of the presence of pristine communities. *Aquat. Toxicol.* 109, 118-126.
- A14** - **PESCE S.**, BOUCHEZ A., MONTUELLE B., 2011. Effects of organic herbicides on phototrophic microbial communities in freshwater ecosystems. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 214, 87-124.
- A13** - **PESCE S.**, MORIN S., LISSALDE S., MONTUELLE B., MAZZELLA N., 2011. Combining polar organic chemical integrative samplers (POCIS) with toxicity testing to evaluate pesticide mixture effects on natural phototrophic biofilms. *Environ. Pollut.* 159, 735-741.
- A12** - **PESCE S.**, LISSALDE S., LAVIEILLE D., MARGOUM C., MAZZELLA N., ROUBEIX V., MONTUELLE B., 2010. Evaluation of single and joint toxic effects of diuron and its main metabolites on natural phototrophic biofilms using a pollution-induced community tolerance (PICT) approach. *Aquat. Toxicol.* 99, 492-499.
- A11** - **PESCE S.**, MARTIN-LAURENT F., ROUARD N., ROBIN A., MONTUELLE B., 2010. Evidence for adaptation of riverine sediment microbial communities to diuron mineralization: incidence of run-off and soil erosion. *J. Soil. Sed.* 10, 698-707.

- A10** - MONTUELLE B., DORIGO U., BERARD A., VOLAT B., BOUCHEZ A., TLILI A., GOUY V., PESCE S., 2010. The periphyton as a multimetric bioindicator for assessing the impact of land use on rivers: an overview of the Ardières-Morcille experimental watershed, *Hydrobiologia*, 657, 123-141.
- A9** - PESCE S., MARGOUM C., MONTUELLE B., 2010. In situ relationships between spatio-temporal variations in diuron concentrations and phototrophic biofilm tolerance in a contaminated river. *Water Res.* 44, 1941-1949.
- A8** - MORIN S., PESCE S., TLILI A., COSTE M., MONTUELLE B., 2010. Recovery potential of periphytic communities in a river impacted by a vineyard watershed. *Ecol. Indic.* 10, 429-426.
- A7** - PESCE S., BATHISSON I., BARDOT C., FAJON C., PORTELLI C., MONTUELLE B., BOHATIER J., 2009. Response of spring and summer riverine microbial communities following glyphosate exposure. *Ecotox. Environ. Saf.* 72, 1905-1912.
- A6** - PESCE S., MARTIN-LAURENT F., ROUARD N., MONTUELLE B., 2009. Potential for microbial diuron mineralisation in a small wine-growing watershed: from treated plots to lotic receiver hydrosystem.. *Pest Manag. Sci.* 65, 651-657.
- A5** - LEHOURS A.C., BARDOT C., PELISSON P.F., GUEDON A., PESCE S., DEMEURE G., SARGOS D., FONTY G., 2009. Successionnal changes in bacterial community assemblages following anoxia in the hypolimnion of an eutrophic lake. *Aquat. Microb. Ecol.* 54, 71-82.
- A4** - PESCE S., BARDOT C., LEHOURS A.C., BATHISSON I., BOHATIER J., FAJON C., 2008. Effects of diuron in microcosms on natural riverine bacterial community composition: new insight into phylogenetic approach using PCR-TTGE analysis. *Aquat. Sci.* 70, 410-418.
- A3** - PESCE S., FAJON C., BARDOT C., BONNEMOY F., PORTELLI C., BOHATIER J., 2008. Longitudinal changes in microbial planktonic communities of a French river in relation to pesticide and nutrient inputs. *Aquat. Toxicol.* 86, 352-360.
- A2** - BATHISSON I., PESCE S., BESSE-HOGGAN P., SANCELME M., BOHATIER J., 2007. Isolation and characterization of diuron-degrading bacteria from lotic surface water. *Microb. Ecol.* 54, 761-770.
- A1** - PESCE S., FAJON C., BARDOT C., BONNEMOY F., PORTELLI C., BOHATIER J., 2006. Effects of the phenylurea herbicide diuron on natural riverine microbial communities in an experimental study. *Aquat. Toxicol.* 78, 303-314.

Articles soumis ou en révision (4)

- A24** - ARTIGAS J., PASCAULT N., BOUCHEZ A., CHASTAIN J., DEBROAS D., HUMBERT J.F., LELOUP J., TADONLEKE R, TER HALLE A., HUMBERT J.F., PESCE S. Comparative sensitivity to the fungicide tebuconazole of biofilm and planktonic microbial communities in freshwater ecosystems. *Sci. Total Environ.* (en révision)
- A25** - LARRAS F., LAMBERT A.S., PESCE S., RIMET F., BOUCHEZ A., MONTUELLE B., Interactive effects between herbicide mixture and temperature on acclimated freshwater periphytic community. *Ecotox. Environ. Saf.* (en révision)
- A26** – KIM TIAM S., MORIN S., PESCE S., FEURTET-MAZEL A., MOREIRA A., GONZALEZ P., MAZZELLA N. Effects of environmental realistic mixture of pesticides on natural biofilms communities with different exposure history. *Plos One* (soumis)
- A27** – FOULQUIER A., ARTIGAS J., PESCE S., DATRY T., Increasing river drying and organic matter processing: response of microbial decomposers, invertebrate detritivores and litter decomposition to emersion frequency. *Global change biol.* (soumis)

Articles en préparation (3)

- A28** - PESCE S., LAMBERT A.S., MONTUELLE B., Effects of temperature on microbial communities in surface waters: A review.
- A29** - DEVERS M., PESCE S., MARTIN-LAURENT F., Characterization of two members of a diuron degrading bacterial consortium isolated from the Beaujaulais vineyard: evidence for cooperative catabolic pathways.

- A30** - LAMBERT A.S., DABRIN A., MORIN S., FOULQUIER A., COQUERY M., PESCE S.
Influence of temperature increase on the response of river phototrophic biofilms to a chronic exposure to copper.

Chapitre d'ouvrage (1)

- CO1** - VILLENEUVE A., MONTUELLE B., PESCE S., BOUCHEZ A., 2013. Environmental river biofilms as biological indicators of the impact of chemical contaminants. *In* Encyclopedia of aquatic ecotoxicology. Féraud, J.F. and Blaise, C., Eds. (DOI 10.1007/978-94-007-5704-2), p. 443-456

IV.2. Publications nationales et rapports d'études

Articles publiés (4)

- AN4** - MARTIN-LAURENT F., DEVERS M., PESCE S., 2013. Influence de la biodégradation dans l'atténuation des pesticides sur un bassin versant viticole : potentialité des différents éléments du paysage et rôle des zones tampons . *Innovations Agronomiques* 28, 35-48.
- AN3** - PESCE S., 2011. Biodégradation et bioremédiation de la chlordécone – Approches de recherche possibles. *Les cahiers du PRAM* 9-10, 45-47.
- AN2** - PESCE S., TLILI A., MONTUELLE B., 2008. Les biofilms aquatiques: dans quelle mesure permettent-ils de comprendre l'effet des pesticides sur le fonctionnement des cours d'eau ? *Ingénieries EAT* 55-56, 79-91.
- AN1** - LEHOURS A-C., BARDOT C., GUEDON A., PESCE S., DEMEURE G., SARGOS D., FONTY G., 2006. Successions des communautés bactériennes en réponse à l'anoxie dans l'hypolimnion d'un lac eutrophe : Le Lac d'Aydat (Auvergne). *Bulletin de la Société Française de Microbiologie*. 22.

Chapitre d'ouvrage (1)

- CON1** - MONTUELLE B., BOUCHEZ A., VILLENEUVE A., PESCE S., 2011. Les microorganismes travaillent pour nous, Rhône Alpes et l'Environnement: 100 questions pour la recherche, Ed Cluster Environnement R-A & CNRS, pp 162-163.

Principaux rapports d'études (4)

- RE1** - PESCE S., LAMBERT A.S., FOULQUIER A., VOLAT B., NEYRA M., MONTUELLE B., 2013. Thermie et processus microbiens dans le Rhône. Rapport Irstea-INRA, Programme Microtherm (Etude Thermique du Rhône, Phase 4), 46 p.
- RE2** - PESCE S., LAMBERT A.S., NEYRA M., MONTUELLE B., 2013. 2013. Influence de la thermie sur les communautés microbiennes aquatiques, Rapport Irstea-INRA, Programme Microtherm (Etude Thermique du Rhône, Phase 4), 23 p.
- RE3** - MARTIN-LAURENT F., DEVERS M., PESCE S., 2012. Amélioration de l'efficacité des zones tampons vis-à-vis des pesticides et influence de la biodégradation naturelle, Rapport INRA-Irstea, Convention ONEMA « Evaluation et remédiation des effets des pesticides »
- RE4** - PESCE S., BOUCHEZ A., MONTUELLE B., 2010. Effets des herbicides sur les communautés microbiennes aquatiques phototrophes: synthèse bibliographique, Rapport Irstea-INRA, Convention ONEMA « Evaluation et remédiation des effets des pesticides »

IV.3. Congrès et colloques

Conférences invitées (2)

PESCE S., 2011. The use of biofilms for monitoring ecological recovery following chemical pollution.

Séminaire « Biofilms », INRA Thonon-les-bains, France

PESCE S., 2011. Comment établir les liens entre exposition et effets biologiques en milieu contaminé?

4ème Séminaire d'Ecotoxicologie de l'INRA, Saint-Lager, France

Communications orales en congrès internationaux (14)

FOULQUIER A., **ARTIGAS J.**, **PESCE S.**, **DATRY T.**, 2013. Effects of emersion and immersion cycles on leaf litter decomposition and associated biotic communities.

4th International Multidisciplinary Conference on Hydrology and Ecology, "Emerging patterns, breakthroughs and challenges", Rennes, France.

MORIN S., **LAMBERT A.S.**, **ARTIGAS J.**, **COQUERY M.**, **PESCE S.**, 2012. Diatom immigration drives biofilm recovery after chronic copper exposure.

22nd International Diatom Symposium, Ghent, Belgique

MARTIN-LAURENT F., **DEVERS-LAMRANI M.**, **ROUARD N.**, **PESCE S.**, 2011. Evidence for filtering capabilities of grass buffer strips: key parameters favoring natural attenuation of pesticides in vineyard area.

Euraqua-PEER Scientific Conference, "Innovative approaches for the management of environmental risks from plant protection products", Montpellier, France

PESCE S., **KIM-TIAM S.**, **LISSALDE S.**, **MARGOUM C.**, **MORIN S.**, **NEYRA M.**, **ROUBEIX V.**, **MAZZELLA N.**, 2011. Combining polar organic chemical integrative samplers (POCIS) with toxicity testing to evaluate pesticide mixture effects on natural phototrophic biofilms.

Euraqua-PEER Scientific Conference, "Innovative approaches for the management of environmental risks from plant protection products", Montpellier, France

ARTIGAS J., **PASCAULT N.**, **CHASTAIN J.**, **VOYARD G.**, **TER HALLE A.**, **BOUCHEZ A.**, **TADONLEKE R.**, **PESCE S.**, 2011. Sensibility of aquatic bacterial communities to contaminants in wine-producing watersheds: Approach in rivers and lakes.

7th Symposium for European Freshwater Sciences, Girone, Espagne

ARTIGAS J., **PASCAULT N.**, **MARECHAL M.**, **CHASTAIN J.**, **VOYARD G.**, **TER HALLE A.**, **PESCE S.**, 2011. Effects of tebuconazole on the structure and metabolism of stream microbial communities.

SETAC Europe 21th Annual Meeting, Milan, Italie

LAMBERT A.S., **MORIN S.**, **ARTIGAS J.**, **VOLAT B.**, **COQUERY M.**, **NEYRA M.**, **PESCE S.**, 2011. Perte de tolérance de communautés phototrophes périphytiques suite à une diminution du niveau d'exposition au cuivre : Influence des migrations d'espèces.

5ème Colloque de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne, Hammamet, Tunisie

ROUBEIX V., **PESCE S.**, **MAZZELLA N.**, **COSTE M.**, **DELMAS F.**, 2011. Variations in periphytic diatom tolerance to agricultural pesticides in a contaminated river: An analysis from community to population level.

Society of Ecotoxicology and Environmental Safety (SECOTOX) conference, Skiathos island, Grèce

MONTUELLE B., **DORIGO U.**, **BOUCHEZ A.**, **PESCE S.**, **TLILI A.**, **MARGOUM C.**, **COQUERY M.**, **VILLENEUVE A.**, **BÉRARD A.**, 2009. Use of pollution-induced community tolerance (PICT) approach based on river biofilms for assessing environmental toxicant impact and remediation.

36th Aquatic Toxicity Workshop, La Malbaie, Québec

- MONTUELLE B., DORIGO U., BOUCHEZ A., **PESCE S.**, TLILI A., MARGOUM C., COQUERY M., VILLENEUVE A., BÉRARD A., 2009. Use of pollution-induced community tolerance (PICT) approach based on river biofilms for assessing environmental toxicant impact and remediation.
14th International Symposium on Toxicity Assessment, Metz, France.
- PESCE S.**, MARGOUM C., ROUARD N., MARTIN-LAURENT F., MONTUELLE B., 2009. Adaptation microbienne à l'exposition aux pesticides dans un cours d'eau situé en zone viticole.
Journée Internationales de Limnologie, Luxembourg, Luxembourg.
- PESCE S.**, MARTIN-LAURENT F., ROUARD N., MONTUELLE B., 2008. Variability in the potential for microbial diuron mineralisation in a small vineyard watershed: from a treated parcel to the receiving river.
Interdisciplinary Congress: Interactions between physico-chemical and microbiological processes in the environment, Clermont-Ferrand, France.
- PESCE S.**, MARTIN-LAURENT F., ROUARD N., DEVERS M., MONTUELLE B., 2008. Microbial diuron-mineralization potential in a small watershed from treated vineyard to lotic system.
SETAC Europe 18th Annual Meeting, Varsovie, Pologne.
- PESCE S.**, FAJON C., BARDOT C., BONNEMOY F., PORTELLI C., BOHATIER J., 2006. Ecotoxicité du diuron en milieu lotique : la réponse du compartiment bactérien d'un cours d'eau récepteur. Etude expérimentale en microcosmes.
8^{ème} Conférence Internationale des Limnologues d'Expression Française. Hammamet, Tunisie

Communications affichées en congrès internationaux (17)

- PESCE S.**, DEVERS M., ROUARD N., MARTIN-LAURENT F., 2013. Evidence for filtering capabilities of different elements of the landscape: key parameters favouring natural attenuation of pesticides in vineyard areas.
Pesticide behaviour in soils, water and air, York, UK
- LAMBERT A.S., DABRIN A., MORIN S., FOULQUIER A., GAHOU J., NEYRA M., PESCE S., 2012. Influence of temperature increase on the response of river phototrophic biofilms to a chronic exposure to copper.
Journées Internationales de Limnologie et d'Océanographie, Clermont-Ferrand
- KIM TIAM S., **PESCE S.**, FEURTET-MAZEL A., MAZZELLA N., MORIN S., GONZALEZ P., 2012. Use of passive samplers extracts for toxicity assessment of environmental realistic mixtures of pesticides on natural biofilms communities.
6th SETAC World Congress, Berlin, Allemagne
- PESCE S.**, MORIN S., LISSALDE S., MAZZELLA N., MONTUELLE B., 2011. Couplage de capteurs passifs et de tests de toxicité pour évaluer l'effet de mélanges de pesticides organiques sur des biofilms naturels.
Colloque ECOBim, Mont-Joli, Québec
- PASCAULT N., ARTIGAS J., ROUX S., TADONLEKE R., TER HALLE A., MAILHOT G., **PESCE S.**, HUMBERT J.F., DEBROAS D., BOUCHEZ A., 2011. Assessment of the impact of tebuconazol (fungicide) on lake and stream bacterial communities using a 16S rRNA pyrosequencing method.
12th Symposium on Aquatic Microbial Ecolog, Rostck, Allemagne
- PESCE S.**, MARGOUM C., MONTUELLE B., 2010. Linking spatio-temporal variations of diuron contamination to biofilm induced tolerance in a river.
Workshop "Emerging and Priority Pollutants: Bringing science into River Management Plans", Girone, Espagne.
- PESCE S.**, MARGOUM C., MONTUELLE B., 2009. Linking spatio-temporal variations of diuron contamination to biofilm induced tolerance in a river.
36th Aquatic Toxicity Workshop, La Malbaie, Québec
- MORIN S., **PESCE S.**, TLILI A., COSTE M., MONTUELLE B., 2009. Résilience et capacité de récupération de communautés périphytiques dans une rivière impactée par un bassin versant viticole.
Journée Internationales de Limnologie, Luxembourg, Luxembourg

- BATISSON I., **PESCE S.**, BESSE-HOGGAN P., SANCELME M., BOHATIER J., 2008. Diversity analysis, isolation and characterization of diuron-degrading bacteria from lotic surface water. *SETAC Europe 18th Annual Meeting, Varsovie, Pologne*
- PESCE S.**, MARTIN-LAURENT F., MONTUELLE B., 2007. Building up an experimental approach for assessing diuron-degrading potential of microbial communities in a watershed: transect from pollution source (treated vineyard) to lotic receiving system (sediment and biofilms). *10th Symposium on Aquatic Microbial Ecology, Faro, Portugal*
- PESCE S.**, FAJON C., BARDOT C., BONNEMOY F., PORTELLI C., MONTUELLE B., BOHATIER J., 2007. Longitudinal changes in microbial planktonic communities of a French river in relation to nutrients and pesticides inputs. *10th Symposium on Aquatic Microbial Ecology, Faro, Portugal*
- BATISSON I., **PESCE S.**, GUYOT S., BOHATIER J., 2006. Etude de la diversité bactérienne aquatique soumise à l'impact de pesticides : isolement et identification de souches « adaptées » au diuron. *8^{ème} Conférence Internationale des Limnologues d'Expression Française. Hammamet, Tunisie*
- PESCE S.**, FAJON C., BARDOT C., BONNEMOY F., PORTELLI C., BATISSON I., BOHATIER J., 2006. Effects of diuron on natural riverine phytoplanktonic and bacterial communities in experimental study. *9th Symposium on Aquatic Microbial Ecology, Helsinki, Finlande*
- BATISSON I., **PESCE S.**, GUYOT S., BOHATIER J., 2006. TTGE analysis of aquatic bacterial diversity exposed to pesticides in laboratory microcosm conditions. *9th Symposium on Aquatic Microbial Ecology, Helsinki, Finlande*
- LEHOURS A.C., BARDOT C., PELISSON P.F., GUEDON A., **PESCE S.**, DEMEURE G., SARGOS D., FONTY G., 2006. Successionnal changes in bacterial community assemblages in response to anoxia in the hypolimnion of an eutrophic lake.: Lake Aydat (France). *International Symposium of Microbial Ecology, Vienne, Autriche*
- PESCE S.**, FAJON C., BARDOT C., BONNEMOY F., PORTELLI C., BOHATIER J., 2006. Ecotoxicology of the herbicide diuron : the response of natural riverine microbial communities in aquatic microcosms. *Workshop "Analytical Chemistry and Ecotoxicology", Genève, Suisse*
- PESCE S.**, FAJON C., MAILHOT G., BARDOT C., BONNEMOY F., BOHATIER J., 2003. Effects of Diuron on physiological activity and structure of natural bacteria community determined by fluorescent *in situ* hybridization and TTGE analysis in experimental study. *7th International Conference of the Aquatic Ecosystem Health and Management Society, Lyon, France*

Communications orales en congrès nationaux (16)

- PESCE S.**, MARTIN-LAURENT F., 2013. Structurer l'écotoxicologie microbienne en France : Retour sur les journées thématiques. *VI^{ème} Colloque de l'AFEM "Microbiologie environnementale : du gène à l'écosystème" – Parent, France*
- LAMBERT A.S., MORIN S., DABRIN A., COQUERY M., **PESCE S.**, 2013. Influence d'une hausse de température sur la réponse de communautés microbiennes périphytiques phototrophes à une exposition au cuivre. *VI^{ème} Colloque de l'AFEM "Microbiologie environnementale : du gène à l'écosystème" – Parent, France*
- MARTIN-LAURENT F., **PESCE S.**, 2013. Retour sur les journées d'écotoxicologie microbienne. *Colloque de la Société Française d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée, Thionville, France*
- PESCE S.**, MARGOUM C., ROUARD N., FOULQUIER A., MARTIN-LAURENT F., 2013. Utilisation du potentiel de biodégradation de sédiments de rivière comme indicateur d'une diminution du niveau d'exposition à l'herbicide diuron suite à son interdiction. *Colloque de la Société Française d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée, Thionville, France*

- LAMBERT A.S.**, FOULQUIER A., GAHOU J., DABRIN A., **PESCE S.**, 2012. Influence d'une hausse de température sur la réponse de biofilms phototrophes de rivière à une exposition chronique au cuivre.
Colloque de la Société Française d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée, Lyon, France.
- MORIN S.**, ROUBEIX V., BATHISSON I., WINTERTON P., **PESCE S.**, 2012. Caractérisation des communautés de diatomées d'eau douce: comparaison des approches taxonomiques et de fingerprinting.
31ème Colloque de l'Association des Diatomistes de Langue Française, Le Mans, France.
- LAMBERT A.S.**, MORIN S., ARTIGAS J., VOLAT B., COQUERY M., NEYRA M., **PESCE S.**, 2011. Dynamique de récupération de biofilms microbiens suite à une diminution du niveau d'exposition au cuivre : Influence des migrations d'espèces
Journées Thématiques du Groupement des Protistologues de Langue Française, Clermont-Fd, France.
- LAMBERT A.S.**, **MORIN S.**, ARTIGAS J., VOLAT B., COQUERY M., NEYRA M., **PESCE S.**, 2011. Importance des migrations d'espèces pour la récupération des communautés périphtiques après une exposition chronique au cuivre.
30ème Colloque de l'Association des Diatomistes de Langue Française, Boulogne-sur-Mer, France.
- KIM-TIAM S.**, DELMAS F., FEURTET-MAZEL A., MAZELLA N., MORIN S., **PESCE S.**, GONZALEZ P., 2011. Acquisition de tolérance par les biofilms périphtiques exposés aux pesticides en mélange.
30ème Colloque de l'Association des Diatomistes de Langue Française, Boulogne-sur-Mer, France
- MONTUELLE B.**, BERTHON V., BOUCHEZ A., DELMAS F., MORIN S., **PESCE S.**, RIMET F., ROUBEIX V., TLILI A., 2010. Biofilms et évaluation d'impact chimique en milieux aquatiques.
Colloque national d'écologie scientifique, Ecologie 2010, Montpellier, France
- PESCE S.**, MARGOUM C., ROUARD N., MARTIN-LAURENT F., MONTUELLE B., 2009. Adaptation des communautés microbiennes autotrophes et hétérotrophes aux changements spatio-temporels d'exposition aux pesticides en cours d'eau.
4ème Colloque de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne, Lyon, France
- PESCE S.**, MARGOUM C., ROUARD N., MARTIN-LAURENT F., MONTUELLE B., 2009. Adaptation microbienne aux changements spatio-temporels d'exposition aux pesticides en cours d'eau.
XXXIXème Congrès du Groupe Français des Pesticides, Toulouse, France
- LEHOURS A.C.**, BARDOT C., GUEDON A., GUEDON A., **PESCE S.**, DEMEURE G., SARGOS D., FONTY G., 2006. Succession des communautés bactériennes en réponse à l'anoxie dans l'hypolimnion d'un lac eutrophe et dimictique : le lac d'Aydat.
Congrès « Anaerobe » de la Société Française de Microbiologie, Lille, France..
- PESCE S.**, FAJON C., BARDOT C., BONNEMOY F., PORTELLI C., BOHATIER J., 2005. Impact du diuron sur l'activité et la structure de communautés microbiennes issues d'un milieu aquatique lotique récepteur : le Jauron (Puy-de-Dôme).
7èmes Journées d'Ecologie Fonctionnelle, Super-Besse, France..
- PESCE S.**, FAJON C., BARDOT C., BONNEMOY F., PORTELLI C., BOHATIER J., 2004. Influence de produits phytosanitaires sur les communautés microbiennes planctoniques au sein d'un milieu aquatique lotique récepteur : le Jauron (Puy de Dôme, France).
47ème Congrès de l'Association Française de Limnologie, Besançon.
- PESCE S.**, FAJON C., MAILHOT G., BARDOT C., PORTELLI C., 2003. Impact du diuron et de ses produits de transformation sur l'activité et la diversité des communautés phytoplanctoniques et bactériennes : approche expérimentale en microcosmes.
41ème Réunion du Groupement des Protistologues de Langue Française, Clermont-Ferrand, France.

Communications affichées en congrès nationaux (2)

LAMBERT A.S., MORIN S., GAHOU J., COQUERY M., NEYRA M., **PESCE S.**, 2011. Importance des migrations d'espèces pour la récupération de communautés phototrophes périphytiques après une exposition chronique au cuivre.

Colloque de la Société Française d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée, Thionville, France.

PESCE S., MORIN S., LISSALDE S., MAZZELLA N., **MONTUELLE B.**, 2010. Couplage de capteurs passifs et de tests de toxicité pour évaluer l'effet de mélanges de pesticides organiques sur des biofilms naturels.

2^{ème} Journée Internationales de Limnologie, Thonon-les-bains, France

PESCE S., MARTIN-LAURENT F., **MONTUELLE B.**, 2007. Variabilité du potentiel de dégradation du diuron par les communautés microbiennes d'un bassin versant viticole de la source de pollution (parcelle) au milieu lotique récepteur (biofilms et sédiments).

Troisième Colloque d'Ecologie Microbienne, La Grande Motte, France

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Acuña V, Wolf A, Uehlinger U, Tockner K, 2008. Temperature dependence of stream benthic respiration in an Alpine river network under global warming. *Freshwater Biol* 53, 2076-2088.
- Alix A, Barriuso E, Bedos C, Bonicelli B, Caquet T, Dubus I, Gascuel C, Gril JJ, Voltz M, 2005. Devenir et transfert des pesticides dans l'environnement et impacts biologiques, *in* Aubertot JN, Barbier JM, Carpentier A, Gril JJ, Guichard L, Lucas P, Savary S, Savini I, Voltz M (Eds) Pesticides, Agriculture et Environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. Rapport d'expertise scientifique collective, INRA et CEMAGREF, France.
- Alvarez DA, Cranor WL, Perkins SD, Clark RC, Smith SB. 2008. Chemical and toxicologic assessment of organic contaminants in surface water using passive samplers. *J Environ Qual* 37, 1024-1033.
- Amalfitano S, Fazi S, Zoppini AM, Caracciolo AB, Grenni P, Puddu A, 2008. Responses of benthic bacteria to experimental drying in sediments from Mediterranean temporary rivers. *Microb Ecol* 55, 270-279.
- Argüello JM, Eren E, González-Guerrero M, 2007. The structure and function of heavy metal transport PIB-ATPases. *Biometals* 20, 233-248.
- Arini A, Feurtet-Mazel A, Maury-Brachet R, Coste M, Delmas F, 2012. Field translocation of diatom biofilms impacted by Cd and Zn to assess decontamination and community restructuring capacities. *Ecol Indic* 18, 520-531.
- Barra Caracciolo A, Giuliano G, Grenni P, Guzzella L, Pozzoni F, Bottoni P, Fava L, Crobe A, Orrù M, Funari E, 2005. Degradation and leaching of the herbicides metolachlor and diuron: a case study in an area of Northern Italy. *Environ Pollut* 134, 525-534.
- Battin TJ, Kaplan LA, Newbold JD, Hansen CME, 2003. Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms. *Nature* 426, 439-442.
- Bérard A, Benninghoff C, 2001. Pollution-induced community tolerance (PICT) and seasonal variations in the sensitivity of phytoplankton to atrazine in nanocosms. *Chemosphere*. 45, 427-437.
- Besaury L, Bodilis J, Delgas F, Andrade S, De la Iglesia R, Ouddane B, Quillet L, 2013. Abundance and diversity of copper resistance genes *cusA* and *copA* in microbial communities in relation to the impact of copper on Chilean marine sediments. *Mar Pollut Bull* 67, 16-25.
- Blanck H, Wängberg SA, Molander S, 1988. Pollution-induced community tolerance – a new ecotoxicological tool. In: Cairns J, Pratt JR (Eds), *Functional testing of aquatic biota for estimating hazards of chemicals*, Philadelphia, ASTM STP 988, 219-230.
- Blanck H, 2002. A critical review of procedures and approaches used for assessing pollution-induced community tolerance (PICT) in biotic communities. *Hum Ecol Risk Assess* 8, 1003-1034.
- Blanck H, Eriksson KM, Gronvall F, Dahl B, Guijarro KM, Birgersson G, Kylin H, 2009. A retrospective analysis of contamination and periphyton PICT patterns for the antifoulant irgarol 1051, around a small marina on the Swedish west coast. *Mar Pollut Bull* 58, 230-237.
- Boivin MEY, Massieux B, Breure AM, Greve GD, Rutgers M, Admiraal W, 2006. Functional recovery of biofilm bacterial communities after copper exposure. *Environ Pollut* 140, 239-246.
- Brack W, 2003. Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures? *Anal Bioanal Chem* 377, 397-407.
- Brack W, Klamer HJ, Lopez de Alda M, Barcelo D (2007) Effect-directed analysis of key toxicants in European river basins. A review. *Environ Sci Pollut Res* 14, 30-38.
- Brown LS, Lean DRS, 1995. Toxicity of selected pesticides to lake phytoplankton measured using photosynthetic inhibition compared to maximal uptake rates of phosphate and ammonium. *Environ Toxicol Chem* 14, 93-98.
- Bruins MR, Kapil S, Oehme FW, 2000. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf* 45, 198-207.
- Bundschuh M, Zubrod JP, Kosol S, Maltby L, Stang C, Duyster L, Schulz R, 2011. Fungal composition on leaves explains pollutant-mediated indirect effects on amphipod feeding. *Aquat Toxicol* 104, 32-37.

- Caquet T, Lagadic L, Sheffield SR, 2000. Mesocosms in ecotoxicology (1): Outdoor aquatic systems. *Rev Environ Contam Toxicol* 165, 1-38.
- Changey F, Devers-Lamrani M, Rouard N, Martin-Laurent F, 2011. In vitro evolution of an atrazine-degrading population under cyanuric acid selection pressure: Evidence for the selective loss of a 47kb region on the plasmid ADP1 containing the *atzA*, *B* and *C* genes. *Gene* 490, 18-25.
- Chapman PM, 2002. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. *Mar Pollut Bull* 44, 7-15.
- Chèvre N, Loepfe C, Singer H, Stamm C, Fenner K, Escher BI, 2006. Including mixtures in the determination of water quality criteria for herbicides in surface water. *Environ Sci Technol* 40, 426-435.
- Claver A, Ormad P, Rodríguez L, Ovelleiro JL, 2006. Study of the presence of pesticides in surface waters in the Ebro river basin (Spain). *Chemosphere* 64, 1437-1443.
- Clements WH, Rohr JR, 2009. Community responses to contaminants: using basic ecological principles to predict ecotoxicological effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1789-1800.
- DCE, 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for the Community action in the field of water policy (Water Framework Directive) adopted on 23.10.2000, published in the Official Journal (OJ L 237) on 22.12.2000.
- Debenest T, Pinelli E, Coste M, Silvestre J, Mazzella N, Madigou C, Delmas F, 2009. Sensitivity of freshwater periphytic diatoms to agricultural herbicides. *Aquat Toxicol* 93, 11-17.
- De la Iglesia R, Valenzuela-Heredia D, Pavissich JP, Freyhoffer S, Andrade S, Correa JA, Gonzalez B, 2010. Novel polymerase chain reaction primers for the specific detection of bacterial copper P-type ATPases gene sequences in environmental isolates and metagenomic DNA. *Lett Appl Microbiol* 50, 552-562.
- Dellamatrice PM, Monteiro RTR, 2004. Isolation of diuron-degrading bacteria from treated soil. *Braz Arch Biol Technol* 47, 999-1003.
- DeLorenzo ME, Scott GI, Ross PE, 2001. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: A review. *Environ Toxicol Chem* 20: 84-98.
- Devers M, Azhari NE, Kolic NU, Martin-Laurent F, 2007a. Detection and organization of atrazine-degrading genetic potential of seventeen bacterial isolates belonging to divergent taxa indicate a recent common origin of their catabolic functions. *FEMS Microbiol Lett* 273, 78-86.
- Devers M, Rouard N, Martin-Laurent F, 2007b. Genetic rearrangement of the *atzAB* atrazine-degrading gene cassette from *pADP1::Tn5* to the chromosome of *Variovorax* sp. MD1 and MD2. *Gene* 392, 1-6.
- Devers M, Rouard N, Martin-Laurent F, 2008. Fitness drift of an atrazine-degrading population under atrazine selection pressure. *Environ Microbiol* 10, 676-684.
- Dorigo U, Volatier L, Humbert JF, 2005. Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Res* 39, 2207-2218.
- Dorigo U, Leboulanger C, Bérard A, Bouchez A, Humbert JF, Montuelle B, 2007. Lotic biofilm community structure and pesticide tolerance along a contamination gradient in a vineyard area. *Aquat Microb Ecol* 50, 91-102.
- Dorigo U, Bérard A, Rimet F, Bouchez A, Montuelle B, 2010a. In situ assessment of periphyton recovery in a river contaminated by pesticides. *Aquat Toxicol* 98, 396-406.
- Dorigo U, Bérard A, Bouchez A, Rimet F, Montuelle B, 2010b. Transplantation of microbenthic algal assemblages to assess structural and functional recovery after diuron exposure. *Arch Environ Contam Toxicol* 59, 555-563.
- Eggen RIL, Behra R, Burkhardt-Holm P, Escher BI, 2004. Challenges in ecotoxicology. *Environ Sci Technol* 38, 58A-64A.
- Eriksson KM, Clarke AK, Franzen LG, Kuylentierna M, Martinez K, Blanck H, 2009. Community-level analysis of *psbA* gene sequences and irgarol tolerance in marine periphyton. *Appl Environ Microbiol.* 75, 897-906.
- Escher BI, Quayle P, Muller R, Schreiber U, Mueller JF, 2006. Passive sampling of herbicides combined with effect analysis in algae using a novel high-throughput phytotoxicity assay (Maxi-Imaging-PAM). *J Environ Monit* 8, 456-464.

- European Commission, 2009. River basin management in a changing climate. Common implementation strategy for the water framework directive (2000/60/EC) - Guidance document No. 24, Technical Report-2009-040 (134 p.).
- Fechner LC, Versace F, Gourlay-Francé C, Tusseau-Vuillemin MH, 2012. Adaptation of copper community tolerance levels after biofilm transplantation in an urban river. *Aquat Toxicol* 106-107, 32-41.
- Field JA, Reed RL, Sawyer TE, Martinez M, 1997. Diuron and its metabolites in surface water and ground water by solid phase extraction and in-vial elution. *J Agric Food Chem* 45, 3897-3902.
- Filser J, 2008. Ecotoxicology and ecosystems: Relevance, restrictions, research needs. *Basic Appl Ecol* 9, 333-336.
- Gatidou G, Thomaidis NS, 2007. Evaluation of single and joint effects of two antifouling biocides, their main metabolites and copper using phytoplankton bioassays. *Aquat Toxicol* 85, 184-191.
- Geiszinger A, Bonnineau C, Faggiano L, Guasch H, Lopez-Daval J, Proia L, Ricart M, Ricciardi F, Romani A, Rotter S, Muñoz I, Schmitt-Jansen M, Sabater S, 2009. The relevance of the community approach linking chemical and biological analyses in pollution assessment. *Trends Anal Chem* 28, 619-626.
- Guasch H, Ivorra N, Lehmann V, Paulsson M, Real M, Sabater S, 1998. Community composition and sensitivity of periphyton to atrazine in flowing waters: the role of environmental factors. *J Appl Phycol* 10,203-213.
- Guasch H, Sabater S, 1998. Light history influences the sensitivity to atrazine in periphytic algae. *J Phycol* 34, 233-241.
- Guasch H, Admiraal W, Sabater S, 2003. Contrasting effects of organic and inorganic toxicants on freshwater periphyton. *Aquat Toxicol* 64, 165-175.
- Harman C, Allan IJ, Vermeirssen EL, 2012. Calibration and use of the polar organic chemical integrative sampler-a critical review. *Environ Toxicol Chem* 31, 2724-38.
- Hecker M, Hollert H, 2009. Effect-directed analysis (EDA) in aquatic ecotoxicology: state of the art and future challenges. *Environ Sci Pollut Res* 16, 607-613.
- Helander M, Saloniemi I, Saikkonen K, 2012. Glyphosate in northern ecosystems. *Trends Plant Sci* 17, 569-574.
- Heugens EHW, Hendriks AJ, Dekker T, van Straalen NM, Admiraal W, 2001. A review of the effects of multiple stressors on aquatic organisms and analysis of uncertainty factors for use in risk assessment. *Critic Rev Toxicol* 31, 247-284.
- Hjorth M, Dahllöf I, Forbes VE, 2006. Effects on the function of three trophic levels in marine plankton communities under stress from the antifouling compound zinc pyrithione. *Aquat Toxicol* 77, 105-115.
- Holmstrup M, Bindsbøl AM, Oostingh GJ, Duschl A, Scheil V, Köhler HR, Loureiro S, Soares AM, Ferreira AL, Kienle C, Gerhardt A, Laskowski R, Kramarz PE, Bayley M, Svendsen C, Spurgeon DJ, 2010. Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: a review. *Sci Total Environ* 408, 3746-3762.
- IFRES 2013. Initiative française pour la recherche en environnement santé (dans les domaines Toxicologie, Ecotoxicologie, Épidémiologie et sciences sociales). Feuille de route Transition Ecologique. 81 p.
- Imfeld G, Bringel F, Vuillemier S, 2010. Bacterial tolerance in contaminated soil: Potential of the PICT approach in microbial ecology. In: Amiard-Triquet C, Rainbow PS, Roméo M (Eds), *Tolerance to environmental contaminant*, CRC Press, p.335-364.
- IPCC Climate change, 2007. Impact, adaptation and vulnerability. Eds Parry ML, Canziani OF, Palutikof JP, van der Linden PJ, Hanson CE
- Ivorra N, Hettelaar J, Tubbing GMJ, Kraak MHS, Sabater S, Admiraal W, 1999. Translocation of microbenthic algal assemblages used for In situ analysis of metal pollution in rivers. *Arch Environ Contam Toxicol* 37, 19-28.
- Khurana JL, Jackson CJ, Scott C, Pandey G, Horne I, Russell RJ, Herlt A, Easton CJ, Oakeshott JG, 2009. Characterization of the phenylurea hydrolase A and B: founding members of a novel aminohydrolase subgroup. *Biochem J* 418, 431-441.
- Knauer K, Leimgruber A, Hommen U, Knauer S, 2010. Co-tolerance of phytoplankton communities to photosynthesis II inhibitors. *Aquat Toxicol* 96, 256-263.

- Knauert S, Escher B, Singer H, Hollender J, Knauer K, 2008. Mixture toxicity of three photosystem II inhibitors (atrazine, isoproturon, and diuron) toward photosynthesis of freshwater phytoplankton studied in outdoor mesocosms. *Environ Sci Technol* 42, 6424–6430.
- Knauert S, Dawo U, Hollender J, Hommen U, Knauer K, 2009. Effects of photosystem II inhibitors and their mixture on freshwater phytoplankton succession in outdoor mesocosms. *Environ Toxicol Chem* 28, 836–845.
- Kolpin DW, Thurman EM, Lee EA, Meyer MT, Furlong ET, Glassmeyer ST, 2006. Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in United States. *Sci Total Environ* 328, 119-130.
- Langhans SD, Tockner K, 2006. The role of timing, duration, and frequency of inundation in controlling leaf litter decomposition in a river-floodplain ecosystem (Tagliamento, northeastern Italy). *Oecologia* 147, 501-509.
- Larned ST, Detry T, Arscott DB, Tockner K, 2010. Emerging concepts in temporary-river ecology. *Freshwater Biol* 55, 717-738.
- Leboulanger C, Bouvy M, Carré C, Cecchi P, Amalric L, Bouchez A, Pagano M, Sarazin G, 2011. Comparison of the effects of two herbicides and an insecticide on tropical freshwater plankton in microcosms. *Arch Environ Contam Toxicol* 61, 599-613.
- Lejon DP, Nowak V, Bouko S, Pascault N, Mougél C, Martins JM, Ranjard L, 2007. Fingerprinting and diversity of bacterial *copA* genes in response to soil types, soil organic status and copper contamination. *FEMS Microbiol Ecol* 61, 424-437.
- Liscio C, Magi E, Di Carro M, Suter MJF, Vermeirssen ELM, 2009. Combining passive samplers and biomonitors to evaluate endocrine disrupting compounds in a wastewater treatment plant by LC/MS/MS and bioassay analyses. *Environ Pollut* 157, 2716-2721
- López-Doval JC, Ricart M, Guasch H, Romaní AM, Sabater S, Muñoz I, 2010. Does grazing pressure modify diuron toxicity in a biofilm community? *Arch Environ Contam Toxicol* 58, 955-962.
- McClellan K, Altenburger R, Schmitt-Jansen M, 2008. Pollution-induced community tolerance as a measure of species interaction in toxicity assessment. *J Appl Ecol* 45, 1514-1522.
- Miege C, Mazzella N, Schiavone S, Dabrin A, Berho C, Ghestem JP, Gonzalez C, Gonzalez JLL, Lalere B, Lardy-Fontan S, Lepot B, Munaron D, Tixier C, Togola A, Coquery M, 2012. An *in situ* intercomparison exercise on passive samplers for monitoring metals, polycyclic aromatic hydrocarbons and pesticides in surface waters. *TrAC Trend Anal Chem*, 36, 128-143.
- Moiseenko TI, 2008. Aquatic ecotoxicology: Theoretical principles and practical application. *Water Res* 35, 530-541.
- Morin S, Bottin M, Mazzella N, Macary F, Delmas F, Winterton P, Coste M, 2009. Linking diatom community structure to pesticide input as evaluated through a spatial contamination potential (Phytopixal): A case study in the Neste river system (South-West France). *Aquat Toxicol* 94, 28-39.
- Muller R, Tang JYM, Thier R, Mueller JF, 2007. Combining passive sampling and toxicity testing for evaluation of mixtures of polar organic chemicals in sewage treatment plant effluent. *J Environ Monit* 9, 104-109.
- Navarro E, Robinson CT, Behra R, 2008. Increased tolerance to ultraviolet radiation (UVR) and cotolerance to cadmium in UVR-acclimatized freshwater periphyton. *Limnol Oceanogr* 53 1149-1158.
- Neuwoehner J, Zilberman T, Fenner K, Escher BI, 2010. QSAR-analysis and mixture toxicity as diagnostic tools: influence of degradation on the toxicity and mode of action of diuron in algae and daphnids. *Aquat Toxicol* 97, 58-67.
- Nies DH, 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* 51, 730-750.
- Nyström B, Paulsson M, Almgren K, Blank H, 2000. Evaluation of the capacity for development of atrazine tolerance in periphyton from a Swedish freshwater site as determined by inhibition of photosynthesis and sulfolipid synthesis. *Environ Toxicol Chem* 19, 1324-1331.
- Paulsson M, Nyström B, Blanck H, 2000. Long-term toxicity of zinc to bacteria and algae in periphyton communities from the river Gota Alv, based on a microcosm study. *Aquat Toxicol* 47, 243-257.

- Perceval O, Caquet T, Lagadic L, Bassères A, Azam D, Lacroix G, Poulsen V, 2009. Les mésocosmes: des outils pour les gestionnaires de la qualité des milieux aquatiques ? Document de synthèse du séminaire d'écotoxicologie (14-16 octobre 2009, Le Croisic), 71 p.
- Perschbacher PW, Ludwig GM, 2004. Effects of diuron and other aerially-applied cotton herbicides and defoliant on the plankton communities of aquaculture ponds. *Aquaculture* 233,197–203.
- Petty JD, Huckins JN, Alvarez DA, Brumbaugh WG, Cranor WL, Gale RW, Rastall AC, Jones-Lepp TL, Leiker TJ, Rostad CE, Furlong ET, 2004. A holistic passive integrative sampling approach for assessing the presence and potential impacts of waterborne environmental contaminants. *Chemosphere* 54, 695-705.
- Rabiet M, Margoum C, Gouy V, Carluer N, Coquery M, 2010. Assessing pesticide concentrations and fluxes in the stream of a small vineyard catchment – effect of sampling frequency. *Environ Pollut* 158, 737–748.
- Ramade F, 1977. *Ecotoxicologie*, Ed : Masson (1ère édition)
- Rasmussen JJ, Monberg RJ, Baattrup-Pedersen A, Cedergreen N, Wiberg-Larsen P, Strobel B, Kronvang B, 2012. Effects of a triazole fungicide and a pyrethroid insecticide on the decomposition of leaves in the presence or absence of macroinvertebrate shredders. *Aquat Toxicol* 118-119,54-61.
- Relyea R, Hoverman J, 2006. Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems. *Ecol Lett* 9, 1157-1171.
- Relyea RA, 2009. A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia* 159, 363-376.
- Rensing C, Grass G, 2003. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol Rev* 27, 197-213.
- Ricart M, Barceló D, Geiszinger A, Guasch H, Alda MLD, Romaní AM, Vidal G, Villagrasa M, Sabater S, 2009. Effects of low concentrations of the phenylurea herbicide diuron on biofilm algae and bacteria. *Chemosphere* 76, 1392–1401.
- Ricart M, Guasch H, Alberch M, Barceló D, Bonnineau C, Geiszinger A, Farré M, Ferrer J, Ricciardi F, Romaní AM, Morin S, Proia L, Sala L, Sureda D, Sabater S, 2010. Primary and complex stressors in polluted mediterranean rivers: Pesticide effects on biological communities. *J Hydrol* 383, 52-61.
- Rimet F, Cauchie HM, Hoffman L, Ector L, 2005. Response of diatom indices to simulated water quality improvements in a river. *J Appl Phycol* 17, 119-128.
- Rohr JR, Kerby JL, Sih A, 2006. Community ecology as a framework for predicting contaminant effects. *Trends Ecol Evol* 21, 606-613.
- Roig N, Nadal M, Ginebreda A, Schumacher M, Domingo JL, 2011. Novel approach for assessing heavy metal pollution and ecotoxicological status of rivers by means of passive sampling methods. *Environ Inter* 37, 671-677.
- Rotter S, Sans-Piché F, Streck G, Altenburger R, Schmitt-Jansen M, 2011. Active bio-monitoring of contamination in aquatic systems – An *in situ* translocation experiment applying the PICT concept. *Aquat Toxicol* 101, 228-236.
- Sabater S, Guasch H, Ricart M, Romani A, Vidal G, Klünder C, Schmitt-Jansen M, 2007. Monitoring the effect of chemical on biological communities. The biofilm as an interface. *Anal Bioanal Chem* 387, 1425–1434.
- Schmitt-Jansen M, Altenburger R, 2008. Community-level microalgal toxicity assessment by multiwavelength-excitation PAM fluorometry. *Aquat Toxicol* 86, 49-58.
- Schmitt-Jansen M, Veit U, Dudel G, Altenburger R, 2008. An ecological perspective in aquatic ecotoxicology: Approaches and challenges. *Basic Appl Ecol* 9, 337-345.
- Schulz R, 2004. Field studies on exposure, effects, and risk mitigation of aquatic nonpoint-source insecticide pollution. *J Environ Qual* 33, 419-448.
- Segner H, 2007. Ecotoxicology – how to assess the impact of toxicants in a multifactorial environment. In: Mothersill C, Mosse I, Seymour C (Eds.) *Multiple Stressors: A Challenge for the Future*. Springer (NATO Science) 39-56.
- Serra A, Guasch H, 2009. Effects of chronic copper exposure on fluvial systems: Linking structural and physiological changes on fluvial biofilms with the in-stream copper retention. *Sci Total Environ* 407, 5274-5282.

- Shaw M, Negri A, Fabricius K, Mueller JF, 2009. Predicting water toxicity: pairing passive sampling with bioassays on the Great Barrier Reef. *Aquat Toxicol* 95, 108-116.
- Silver S, Phung LT, 1996. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu Rev Microbiol* 50, 753-789.
- Sinclair CJ, Boxall ABA, 2003. Assessing the ecotoxicity of pesticide transformation products. *Environ Sci Technol* 37, 4617-4625.
- Soldo D, Behra R, 2000. Long-term effects of copper on the structure of freshwater periphyton communities and their tolerance to copper, zinc, nickel and silver. *Aquat Toxicol* 47, 181-189.
- Sørensen SR, Bending GD, Jacobsen CS, Walker A, Aamand J, 2003. Microbial degradation of isoproturon and related phenylurea herbicides in and below agricultural fields. *FEMS Microbiol Ecol* 45,1-11.
- Stachowski-Haberkorn, S., Becker, B., Marie, D., Haberkorn, H., Coroller, L. de la Broise, D. 2008. Roundup can impact the marine microbial community, as shown by an in situ microcosm experiment. *Aquat Toxicol* 89, 232-241.
- Steinberg CEW, Ade M, 2005. Ecotoxicology, where do you come from and where do you go? *Environ Sci Pollut Res* 12, 245-246.
- Tadonlélé RD, LeBerre B, Perreau F, Humbert JF, 2009. Responses of lake bacterioplankton activities and composition to the herbicide diuron. *Aquat Toxicol* 94, 103-113.
- Timoner X, Acuña V, Von Schiller D, Sabater S, 2012. Functional responses of stream biofilms to flow cessation, desiccation and rewetting. *Freshwater Biol* 57, 1565-1578.
- Tlili A, Dorigo U, Montuelle B, Margoum C, Carluer N, Gouy V, Bouchez A, Bérard A, 2008. Responses of chronically contaminated biofilms to short pulses of diuron: An experimental study simulating flooding events in a small river. *Aquat Toxicol* 87, 252-263.
- Tlili A, Bérard A, Roulier JL, Volat B, Montuelle B, 2010. PO₄³⁻ dependence of the tolerance of autotrophic and heterotrophic biofilm communities to copper and diuron. *Aquat Toxicol* 98, 165-177.
- Tlili A, Montuelle B, 2010. Microbial pollution-induced community tolerance. In: Amiard-Triquet C, Rainbow PS, Roméo M (Eds), *Tolerance to environmental contaminant*, CRC Press, p.85-108.
- Tlili A, Marechal M, Bérard A, Volat B, Montuelle B, 2011a. Enhanced co-tolerance and co-sensitivity from long-term metal exposures of heterotrophic and autotrophic components of fluvial biofilms. *Sci Total Environ* 409, 4335-4343.
- Tlili A, Corcoll N, Bonnet B, Morin S, Montuelle B, Bérard A, Guasch H, 2011b. In situ spatio-temporal changes in pollution-induced community tolerance to zinc in autotrophic and heterotrophic biofilm communities. *Ecotoxicology* 20, 1823-1839.
- Toräng L, Nyholm N, Albrechtsen HJ, 2003. Shifts in biodegradation kinetics of the herbicide MCPP and 2,4-D at low concentrations in aerobic aquifer materials. *Environ Sci Technol* 37, 3095-3103.
- Turnbull GA, Ousley M, Walker A, Shaw E, Morgan JAW, 2001. Degradation of substituted phenylurea herbicides by *Arthrobacter globiformis* strain D47 and characterization of a plasmid-associated hydrolase gene, puhA. *Appl Environ Microbiol* 67, 2270-2275.
- Van den Brink PJ, Crum SJH, Gylstra R, Bransen F, Cuppen JGM, Brock TCM, 2009. Effects of a herbicide-insecticide mixture in freshwater microcosms: Risk assessment and ecological effect chain. *Environ Pollut* 157, 237-249.
- Van Straalen NM, 2003. Ecotoxicology becomes stress ecology. *Environ Sci Technol* 37, 324A-330A.
- Vera MS, Lagomarsino L, Sylvester M, Pérez GL, Rodríguez P, Mugni H, Sinistro R, Ferraro M, Bonetto C, Zagarese H, Pizarro H, 2010. New evidences of Roundup® (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology* 19, 710-721.
- Vera MS, Di Fiori E, Lagomarsino L, Sinistro R, Escaray R, Iummato MM, Juárez A, Ríos de Molina Mdel C, Tell G, Pizarro H, 2012. Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanor® on freshwater microbial communities. *Ecotoxicology* 21, 1805-1816.
- Vercraene-Eairmal M, Lauga B, Saint Laurent S, Mazzella N, Boutry S, Simon M, Karama S, Delmas F, Duran R, 2010. Diuron biotransformation and its effects on biofilm bacterial community structure. *Chemosphere* 81, 837-843.

- Vermeirssen ELM, Körner O, Schönenberger R, Suter MJF, Burkhardt-Holm P, 2005. Characterization of environmental estrogens in river water using a three pronged approach: active and passive water sampling and the analysis of accumulated estrogens in the bile of caged fish. *Environ Sci Technol* 39, 8191-8198.
- Vermeirssen ELM, Hollender J, Bramaz N, Van der Voet J, Escher BI, 2010. Linking toxicity in algal and bacterial assays with chemical analysis in passive samplers deployed in 21 treated sewage effluents. *Environ Toxicol Chem* 29, 2575-2582.
- Villeneuve A, Montuelle B, Bouchez A, 2010. Influence of slight differences in environmental conditions (light, hydrodynamics) on the structure and function of periphyton. *Aquat Sci* 72, 33-44.
- Vrana B, Mills GA, Allan IJ, Dominiak E, Svensson K, Knutsson J, Morrison G, Greenwood R, 2005. Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water. *Trends Anal Chem* 24, 845-868.
- Wilby RL, Orr HG, Hedger M, Forrow D, Blackmore M, 2006. Risks posed by climate change to the delivery of Water Framework Directive objectives in the UK. *Environ Inter* 32, 1043-1055.
- Wilby RL, Orr H., Watts G., Battarbee RW, Berry PM, Chadd R, Dugdale SJ, Dunbar MJ, Elliott JA, Extence C, Hannah DM, Holmes N, Johnson AC, Knights B, Milner NJ, Ormerod SJ, Solomon D, Timlett R, Whitehead PJ, Wood PJ, 2010. Evidence needed to manage freshwater ecosystems in a changing climate: Turning adaptation principles into practice. *Sci Total Environ* 408, 4150-4164.
- Wipfli MS, Richardson JS, Naiman RJ, 2007. Ecological linkages between headwaters and downstream ecosystems: transport of organic matter, invertebrates, and wood down headwater channels. *J Am Water Res Assoc* 43, 72-85.

ANNEXE

Aperçu des publications internationales



Effects of the phenylurea herbicide diuron on natural riverine microbial communities in an experimental study

Stéphane Pesce, Céline Fajon*, Corinne Bardot, Frédérique Bonnemoy, Christophe Portelli, Jacques Bohatier

Laboratoire de Biologie des Protistes, UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal, 63177 Aubière Cedex, France

Received 16 January 2006; received in revised form 16 March 2006; accepted 19 March 2006

Abstract

The effects of the phenylurea herbicide diuron ($10 \mu\text{g l}^{-1}$) on natural riverine microbial communities were investigated using a three-week laboratory microcosm study. During the first six days, a latency period was observed both in the algal and the bacterial communities despite favorable abiotic conditions and independently of diuron exposure. From the second week, an intense algal bloom (chlorophyll *a* concentrations and cell abundances) was observed in the uncontaminated microcosms but not in the treated microcosms. The bloom stimulated the bacterial community and led to an increase in heterotrophic bacterial production ($[^3\text{H}]$ thymidine incorporation), activity (CTC reduction) and cell abundance. In parallel, shifts in bacterial community composition were recorded by polymerase chain reaction (PCR)–temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) analysis, whereas no major variation was detected using the fluorescent in situ hybridization (FISH) method. In the treated microcosms, the diuron acted not by damaging the initial communities but by inhibiting the algal bloom and indirectly maintaining constant bacterial conditions throughout the experiment. These inhibitory effects, which were recorded in terms of abundance, activity and diversity, suggest that exposure to diuron can decrease the recovery capacities of microbial communities and delay the resumption of an efficient microbial food web despite favorable environmental conditions.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Community analysis; Bacteria; Microalgae; Microcosm; Diuron; Lotic system

1. Introduction

Pollution of aquatic ecosystems by pesticide contamination is a major environmental concern. Numerous studies have been conducted to determine the occurrence of these xenobiotics in European streams and rivers (e.g. Gerecke et al., 2002; Carabias-Martínez et al., 2003; Cerejeira et al., 2003). In France, the Jauron River (Puy de Dôme), a first- and second-order stream located 25 km SE of Clermont-Ferrand, is monitored by a pesticide pollution watch net. This river which is characterized by meso-eutrophic conditions in spring and summer (Fajon et al., unpublished data) is frequently polluted by numerous chemical compounds, especially the phenylurea herbicide diuron (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea). This molecule was detected 20 times between 2000 and 2003 (monthly sampling) in six sam-

pling sites located on the Jauron river with a range from 0.05 to $4.21 \mu\text{g l}^{-1}$ (Phyt'eauvergne, 2004). In French rivers diuron is detected in 38% of surface waters and its concentration ranges from 0.05 to $20.3 \mu\text{g l}^{-1}$ (IFEN, 2000). This substituted urea herbicide used for total control of weeds and mosses inhibits photosynthesis by preventing oxygen production (Wessels and Van der Veen, 1956) and blocks electron transfer at photosystem II of photosynthetic microorganisms and plants. The intensive use of this xenobiotic leads to surface water contamination by soil leaching and overland flow (Garmouma et al., 1997; Louchart et al., 2000; Barra Caracciolo et al., 2005) in agricultural (Thurman et al., 2000; Mitchell et al., 2005) and urban areas (Revitt et al., 2002; Blanchoud et al., 2004). The toxic properties of diuron mean that this contamination poses significant toxicological risk to resident aquatic organisms. Because of their physiological characteristics, planktonic and periphytic microalgae represent potential primary targets for herbicides in lotic ecosystems. Previous studies based on single-species toxicity tests have reported a wide variation in algal sensitivity to

* Corresponding author. Tel.: +33 473407465; fax: +33 473407670.
E-mail address: celine.fajon@univ-bpclermont.fr (C. Fajon).

Isolation and Characterization of Diuron-degrading Bacteria from Lotic Surface Water

Isabelle Batisson¹, Stéphane Pesce¹, Pascale Besse-Hoggan², Martine Sancelme² and Jacques Bohatier¹

(1) Laboratoire de Biologie des Protistes, UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal, Aubière cedex, 63177, France

(2) Laboratoire de Synthèse Et Etude de Systèmes à Intérêt Biologiques, UMR 6504 CNRS, Université Blaise Pascal, Aubière cedex, 63177, France

Received: 20 February 2007 / Accepted: 25 February 2007 / Online publication: 21 April 2007

Abstract

The bacterial community structure of a diuron-degrading enrichment culture from lotic surface water samples was analyzed and the diuron-degrading strains were selected using a series of techniques combining temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) of 16 S rDNA gene V1–V3 variable regions, isolation of strains on agar plates, colony hybridization methods, and biodegradation assays. The TTGE fingerprints revealed that diuron had a strong impact on bacterial community structure and highlighted both diuron-sensitive and diuron-adapted bacterial strains. Two bacterial strains, designated IB78 and IB93 and identified as belonging to *Pseudomonas* sp. and *Stenotrophomonas* sp., were isolated and shown to degrade diuron in pure resting cells in a first-order kinetic reaction during the first 24 h of incubation with no 3,4-DCA detected. The percentages of degradation varied from 25% to 60% for IB78 and 20% to 65% for IB93 and for a diuron concentration range from 20 mg/L to 2 mg/L, respectively. It is interesting to note that diuron was less degraded by single isolates than by mixed resting cells, thereby underlining a cumulative effect between these two strains. To the best of our knowledge, this is the first report of diuron-degrading strains isolated from lotic surface water.

Introduction

Pesticides applied in agricultural and urban areas constitute major sources of surface water and groundwater contamination that are currently causing serious environmental damage. Herbicides are able to reach

surface waters either directly by the herbicidal control of aquatic weeds or indirectly via the discharge of agricultural drainage water from treated land and via runoff after application on hard surfaces [23, 24, 32, 49].

Diuron, *N*-(3,4-dichlorophenyl)-*N,N'*-dimethyl-urea, is a phenylurea herbicide that has been widely used for the selective control of noncultivated areas, annual weeds, and field crops [46]. In France, the use of diuron has been restricted since 1997 (*Journal Officiel* dated 4/07/97) when it was detected in drinking water supplies. However, according to the French Environmental Institute [17], diuron is still detected in 34.6% of all river samples from the national basin system, and this rate changed only slightly between 1997 and 2002. Indeed, partly because of its low solubility in water (40 mg/L at 20°C), diuron is persistent in surface soil (Koc varying from 500 to 700) where it is prone to lateral movement via surface runoff and migration to both surface and groundwater [12, 31, 35]. Diuron can also disseminate by leaching after intensive rainfall, making it one of the main causes of groundwater pollution [21]. Diuron is slightly toxic to mammals and birds and moderately toxic to aquatic invertebrates [14, 27], but its main product of biodegradation, 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA), exhibits a higher toxicity [44], even on natural bacterial communities. Hence, the European Commission (Directive 2000/60/CE) has designated diuron as a priority hazardous substance.

El Fantroussi *et al.* [7] have shown that the structure and metabolic potential of soil microbial communities are both clearly affected by the long-term application of urea herbicides, which promotes accelerated biodegradation. Microbial degradation is the primary vector of diuron dissipation from soil [13, 16], and numerous studies have underlined the diversity of the microorganisms involved [3, 5, 11, 19, 33, 36, 38, 39, 42, 43, 47, 48, 50, 52]. It has also been shown that if diuron penetrates aquatic

Correspondence to: Isabelle Batisson; E-mail: isabelle.batisson@univ-bpclermont.fr



Longitudinal changes in microbial planktonic communities of a French river in relation to pesticide and nutrient inputs

Stéphane Pesce^{a,b,1}, Céline Fajon^{a,*}, Corinne Bardot^a, Frédérique Bonnemoy^a,
Christophe Portelli^a, Jacques Bohatier^a

^a Laboratoire de Biologie des Protistes, Equipe "Ecotoxicologie Microbienne", UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal, 63177 Aubière cedex, France

^b CEMAGREF, Groupement de Lyon, Unité de Recherche "Qualité des Eaux et Prévention des Pollutions", Equipe "Ecologie Microbienne des Hydrosystèmes Anthropisés", 3 quai Chauveau CP 220 69336 Lyon, France

Received 31 July 2007; received in revised form 20 November 2007; accepted 21 November 2007

Abstract

To determine the effects of anthropic activities on river planktonic microbial populations, monthly water samples were collected for 11 months from two sampling sites characterized by differing nutrient and pesticide levels. The difference in trophic level between the two stations was particularly pronounced from May to November. Total pesticide concentrations were notably higher at the downstream station from April to October with a clear predominance of herbicide residues, especially the glyphosate metabolite aminomethylphosphonic acid (AMPA). From spring, algal biomass and density were favored by the high orthophosphate concentrations recorded at the downstream location. However, isolated drops in algal biomass were recorded at this sampling station, suggesting an adverse effect of herbicides on algal communities. No major difference was observed in bacterial heterotrophic production, density, or activity (CTC reduction) between the two sampling stations. No major variation was detected using the fluorescent *in situ* hybridization (FISH) method, but shifts in bacterial community composition were recorded by PCR–TTGE analysis at the downstream station following high nutrient and pesticide inputs. However, outside the main anthropic pollution period, the water's chemical properties and planktonic microbial communities were very similar at the two sampling sites, suggesting a high recovery potential for this lotic system.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: River; Planktonic microbial communities; Pesticides; Water quality; Nutrients

1. Introduction

Numerous studies have underlined the increasing frequency of chronic or acute pollution by pesticides in streams and rivers with a high predominance of herbicide residues, for example in French rivers (IFEN, 2006). Pesticide inputs in aquatic systems are caused by anthropic activities (urban and agricultural) and are generally associated with high levels of inorganic nutrients (Downing et al., 2004).

Algae are very sensitive to chemical conditions, especially nutrient levels (Leira and Sabater, 2005). Because of their physiological similarities with the intended target organisms (e.g.

invasive plants in crops), algae are particularly exposed to herbicide toxicity (DeLorenzo et al., 2001; Dorigo et al., 2004). Co-variation between algae and bacteria is frequently observed in aquatic ecosystems (Gao et al., 2004) mostly reflecting the reliance of bacteria on algae for their organic carbon requirements (Gasol and Duarte, 2000). Furthermore, organic and inorganic pollutants represent nutritive sources for bacteria. It is also conceivable that bacteria can be affected by pesticides but most studies have focused on bacterial degradation of pesticides rather than impacts on natural bacterial communities (DeLorenzo et al., 2001). We therefore hypothesized that pesticide contamination could induce direct or indirect changes in bacterial community activity and composition in natural systems, as reported in experimental studies (Knapp et al., 2005; Pesce et al., 2006).

Given the critical roles played by microorganisms in aquatic ecosystems, significant efforts have been made to develop experimental studies to assess microbial responses following

* Corresponding author. Tel.: +33 473407465; fax: +33 473407670.

E-mail addresses: pesce@lyon.cemagref.fr (S. Pesce),

celine.fajon@univ-bpclermont.fr (C. Fajon).

¹ el.: +33 472208795; fax: +33 478477875.

Research Article

Effects of diuron in microcosms on natural riverine bacterial community composition: new insight into phylogenetic approaches using PCR-TTGE analysis

Stéphane Pesce, Corinne Bardot, Anne-Catherine Lehours, Isabelle Batisson, Jacques Bohatier and Céline Fajon*

Laboratoire "Microorganismes: Génome et Environnement", UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal, 63177 Aubière cedex, France

Received: 8 November 2007; revised manuscript accepted: 10 July 2008

Abstract. We recently demonstrated in a microcosm study using PCR-TTGE analysis that a realistic diuron exposure (10 µg/L) could directly and indirectly affect the diversity of a natural riverine bacterial community. Here we extended our first approach by identifying predominant bacterial phylotypes in diuron and control microcosms by sequencing and phylogenetic analysis of bands excised from the previously obtained PCR-TTGE gel. We found a sharp difference between

phylotypes obtained from the two types of microcosm. Those that appeared or were maintained only in treated microcosms were mainly γ -Proteobacteria, especially the Pseudomonadaceae family, the Verrucomicrobia and the Gemmatimonadetes. In contrast, phylotypes that appeared only in control microcosms belonged to the Chlamydiae. Methodological aspects related to biases encountered after sequence retrieval from fingerprint gels are also discussed.

Key words. TTGE; diuron; bacterial community; phylogenetic analysis.

Introduction

Bacterial communities perform key functions in ecosystem processes, such as nutrient cycling and the decomposition of organic matter. They play a major role in the biodegradation of most contaminants in both soil and aquatic systems. Rapid bacterial response to environmental change can thus influence the whole ecosystem and indirectly affect other communities in the environment. It is now well established that analysis of bacterial communities is important in ecological studies, especially for environ-

mental risk assessment of pollutants (DeLorenzo et al., 2001; Downing et al., 2004).

Pesticides form a significant category of environmental pollutants. For a long time, the response of bacterial communities to pesticides was evaluated using culture methods or quantitative descriptors such as measurements of density, activity and heterotrophic production (Wardle and Parkinson, 1990; DeLorenzo et al., 1999). The use of molecular approaches based on the separation of ribosomal gene sequences directly amplified by PCR from community DNA on denaturing gel according to their melting properties (as DGGE, TTGE or TGGE methods) henceforth allows to monitor the genetic diversity of microbial communities (Muyzer, 1999). However, most studies have focused on soil bacterial communities (see

* Corresponding author phone: +33 473407465; fax +33 473407670; e-mail: celine.fajon@univ-bpclermont.fr
Published Online First: August 21, 2008



Successional changes in bacterial community assemblages following anoxia in the hypolimnion of a eutrophic lake

Anne-Catherine Lehours^{1,2,*}, Corinne Bardot¹, Pierre-François Pelisson¹,
Annie Guedon¹, Stephane Pesce¹, Guy Demeure¹, Denis Sargos¹, Gérard Fonty¹

¹Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement (LMGE), Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand, UMR CNRS 6023, 24 avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France

²Present address: Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, 29680 Roscoff, France

ABSTRACT: Dynamics of bacterial assemblages following anoxia in the hypolimnion of a eutrophic lake (Lake Aydat) were characterized. The sampling started in spring before complete anoxia and was continued weekly until complete mixing of the water column occurred in autumn. Bacterial community patterns at 3 sampled depths (10, 12 and 14 m) were investigated using temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) and terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analyses. Results revealed changes in the structure of the bacterial communities as conditions changed from oxic to anoxic. Once anoxia had been reached, anaerobic bacterial communities continued to change and exhibited gradual successional patterns at the 3 depths. During the anoxic period, bacterial communities at 10 and 12 m were split into 2 groups corresponding to the steps 'until' and 'after' maximum stratification, which occurred on 19 August 2004. While the succession of the bacterial community in the hypolimnion was dynamic and exhibited gradual patterns at the 3 depths, a 'sensitivity gradient' to O₂ depletion was suggested: communities at 10 m appeared to be more affected by the shift in O₂ concentrations than those in deeper water layers.

KEY WORDS: Lake · Bacterial community structure · Succession · Molecular fingerprint methods

Resale or republication not permitted without written consent of the publisher

INTRODUCTION

In the water column of many eutrophic aquatic systems, 3 steps are observed during thermal stratification in regard to O₂ concentrations: (1) in spring, increasing solar radiation leads to vertical stratification, which reduces the rate of O₂ supply while aerobic respiration removes O₂; (2) in summer, the deepest water layers (hypolimnion) are anoxic; and (3) in autumn, decreasing solar radiation leads to cooling of surface waters and the deep penetration of O₂. This overturn of O₂ leads to the reoxygenation of the entire water column. Consequently, in the course of a few days, the microbial community habitat in the hypolimnion shifts from O₂ supersaturation to anoxia (or the opposite), and new

microbial niches are created, filled and destroyed in rapid succession (Finlay et al. 1997).

Lake Aydat in the French Massif Central supports an extensive seasonal anoxic zone (from 6 to 14 m; Michard et al. 2001), which forms every year from May to October (Bettarel et al. 2004). This hypolimnion is populated with living and active communities of bacteria; bacterial abundance averages 5×10^6 cells ml⁻¹ and bacterial production (114.2×10^6 bacteria l⁻¹ h⁻¹) is greater than that in overlying oxic water (Bettarel et al. 2003, 2004). In this anoxic and aphotic water layer, fish, zooplankton and phytoplankton are absent. Grazers such as ciliates and flagellates are rare and grazing rates are low (Bettarel et al. 2003, 2004), as typically noted in anoxic waters (Weinbauer & Holfe 1998).

*Email: lehours@sb-roscoff.fr

Potential for microbial diuron mineralisation in a small wine-growing watershed: from treated plots to lotic receiver hydrosystem

Stéphane Pesce,^{a*} Fabrice Martin-Laurent,^b Nadine Rouard^b and Bernard Montuelle^a

Abstract

BACKGROUND: Since biological degradation processes are known to be a major driver of the natural attenuation of pesticide residues in the environment, microbial communities adapted to pesticide biodegradation are likely to play a key environmental role in reducing pesticide exposure in contaminated ecosystems. The aim of this study was to assess the diuron-mineralising potential of microbial communities at a small-scale watershed level, including a diuron-treated vineyard (pollution source), its associated grass buffer strip (as a river protection area against pesticide runoff) and the lotic receiver hydrosystem (sediments and epilithon), by using radiorespirometry.

RESULTS: Comparison of results obtained at different sampling sites (in both soil and aquatic systems) revealed the importance of diuron exposure in the adaptation of microbial communities to rapid diuron mineralisation in the vineyard but also in the contaminated grass strip and in downstream epilithic biofilms and sediments.

CONCLUSION: This study provides strong suggestive evidence for high diuron biodegradation potential throughout its course, from the pollution source to the final receiving hydrosystem, and suggests that, after microbial adaptation, grass strips may represent an effective environmental tool for mineralisation and attenuation of intercepted pesticides.

© 2009 Society of Chemical Industry

Keywords: diuron; mineralisation; microbial communities; watershed; buffer strip; herbicide biodegradation

1 INTRODUCTION

Cultivated watersheds are heavily impacted by agricultural chemicals.^{1,2} The intensive use of herbicides in grape production means that small streams draining a wine-growing watershed are particularly exposed to these pollutants.^{3,4} Numerous studies have reported the presence of phenylurea herbicides such as diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] in vineyard surface or groundwater,^{4–6} causing serious environmental problems.³ Biological degradation processes are known to be a major driver of the natural attenuation of pesticide residues in the environment.^{7,8} Consequently, microbial communities geared to pesticide biodegradation are likely to play a key environmental role in purifying pesticide-contaminated ecosystems, from pollution source (i.e. treated soils) right through to final receiver waters.

Several laboratory studies have reported various biodegradation rates of diuron in agricultural soils, varying from several weeks to several months.^{9,10} Rapid and extensive mineralisation of diuron or other phenylurea herbicides (i.e. within a few days) has often been observed in soil repeatedly treated with these herbicides, thereby revealing the capability of natural microbial communities to adapt to phenylurea metabolism.^{9,11}

Grass buffer strips have recently been developed as a solution for reducing pesticide transfer by surface runoff from vineyard parcels to streams.¹² In the context of the new policy for

agriculture, the European Community recognised buffer strips as an effective compensatory measure to mitigate the impact of agriculture practices on the environment. Although pesticide interception by grass strips has generally been proven effective, little is known about the fate of intercepted pesticides.^{12–14} This question needs to be addressed to define useful procedures to enable farmers to employ grass strips as a tool for limiting pesticide leaching, promoting pesticide biodegradation, and thus diminishing pesticide build-up in the environment.

Furthermore, although pesticide behaviour has been widely studied in water–sediment systems,⁸ there are still only very limited data on pesticide biodegradation potential in lotic receiver waters.^{1,15,16} There is a need to assess the potential for natural attenuation of contaminated lotic ecosystems through estimates of the ability of aquatic microbial communities to adapt to pesticide biodegradation.¹⁷ In small rivers, most of the heterotrophic microbial activity resides in biofilms on immersed

* Correspondence to: Stéphane Pesce, Cemagref, UR QELY, 3 Quai Chauveau, CP 220, 69336 Lyon, France. E-mail: stephane.pesce@cemagref.fr

a Cemagref, UR QELY, 3 Quai Chauveau, CP 220, 69336 Lyon, France

b INRA-Université de Bourgogne, UMR Microbiologie du Sol et de l'Environnement, 17 Rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France



Contents lists available at ScienceDirect

Ecotoxicology and Environmental Safety

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecoenv

Response of spring and summer riverine microbial communities following glyphosate exposure

Stéphane Pesce^{a,b,*}, Isabelle Batisson^b, Corinne Bardot^b, Céline Fajon^b, Christophe Portelli^b, Bernard Montuelle^a, Jacques Bohatier^b

^a CEMAGREF, UR MALY, 3bis Quai Chauveau CP 220 69336 Lyon, France

^b Laboratoire "Microorganismes: Génome et Environnement", UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal, 63177 Aubière cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 March 2009

Received in revised form

7 July 2009

Accepted 13 July 2009

Available online 30 July 2009

Keywords:

Bacteria

Glyphosate

Microbial communities

Microcosms

Periphyton

Phytoplankton

River

Genetic fingerprinting

Seasonal response

ABSTRACT

Seasonal variation in the response of riverine microbial communities to an environmentally relevant exposure to glyphosate (about $10 \mu\text{g l}^{-1}$) was assessed on natural communities collected in spring and summer, using two 14-day microcosm studies. The two experiments showed no major effect of glyphosate on algal biomass (chlorophyll *a* concentrations), bacterial activity ($[^3\text{H}]$ thymidine incorporation), or bacterial community diversity (16S PCR-TTGE detection). Effects on algal community composition (genus-level taxonomic identification) and eukaryotic community diversity (18S PCR-DGGE on $<100 \mu\text{m}$ organisms) were only detected on the samples collected in summer. This work demonstrates that even if the effects of a short pulse of glyphosate ($10 \mu\text{g l}^{-1}$) on riverine microorganisms seem to be limited, the responses of natural microbial communities to glyphosate exposure (and probably to other pesticide exposures) can clearly vary between the experiments, and can be seasonally dependent.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The systemic non-selective herbicide Glyphosate (N-Phosphonomethylglycine) is the most widely used herbicide in the world, being routinely applied to control weeds in both crop and non-crop areas (Baylis, 2000; Kolpin et al., 2006). Despite a relatively short half-life of a few days in aquatic systems (Mallat and Barceló, 1998; Giesy et al., 2000), glyphosate is frequently detected in many rivers in both agricultural and urban regions (Battaglin et al., 2005; Kolpin et al., 2006; Blanchoud et al., 2007; Pesce et al., 2008a). This contamination can pose significant toxicological risks to resident aquatic organisms. In aquatic environments, microbial assemblages play critical roles, including primary production, nutrient cycling and decomposition of organic matter. The physiological properties of microalgae are likely to make them primary targets for herbicide residues in contaminated waters. Previous single-species studies have reported low toxicity levels of glyphosate for algae (Peterson et al., 1994; Gardner et al., 1997; Sáenz et al., 1997; Wong, 2000;

Tsui and Chu, 2003) and bacteria (Bonnet et al., 2007), with measured toxicity values (effective concentrations generally $>1 \text{ mg l}^{-1}$) being much higher than the glyphosate concentrations detected in natural waters, which rarely exceed a few micrograms per litre (e.g. Kolpin et al., 2006; Pesce et al., 2008a; Botta et al., 2009). Nevertheless, and given the need to enhance the integration of ecology and ecotoxicology (Relyea and Hoverman, 2006), it is now well-established that the microbial community level is a more suitable model than single-species testing to assess pesticide effects on microorganisms (e.g. Brandt et al., 2004; Dorigo et al., 2004).

Studying coastal microbial communities in *in situ* microcosms, Stachowski-Haberkorn et al. (2008) showed that a 7-day exposure to low concentrations of Roundup[®] ($<10 \mu\text{g l}^{-1}$) was able to affect the microbial diversity. Pérez et al. (2007) recently underlined the lack of studies investigating the effects of glyphosate on freshwater microbial communities. Using a mesocosm approach, they showed that high concentrations of the commercial formulation Roundup[®] (6 and 12 mg l^{-1} of the active ingredient glyphosate) led to changes in the structure of planktonic and periphytic microbial assemblages. Schaffer and Sebetich (2004) found that Rodeo[®] treatments (0.125 and 12.5 mg l^{-1} of the active ingredient glyphosate) resulted in significant stimulation of primary productivity of a lake phytoplankton community during a seven hour

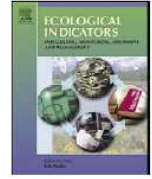
* Corresponding author at: CEMAGREF, UR MALY, 3bis Quai Chauveau CP 220 69336 Lyon, France. Fax: +33 478477875.

E-mail address: stephane.pesce@cemagref.fr (S. Pesce).



Contents lists available at ScienceDirect

Ecological Indicators

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecolind

Recovery potential of periphytic communities in a river impacted by a vineyard watershed

S. Morin^{a,*}, S. Pesce^b, A. Tlili^b, M. Coste^a, B. Montuelle^b

^aCemagref, UR REBX, 50 avenue de Verdun, F-33612 Cestas cedex, France

^bCemagref, UR QELY, 3 bis quai Chauveau – CP 220, F-69366 Lyon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 February 2009

Received in revised form 15 May 2009

Accepted 18 July 2009

Keywords:

River biofilms

Diatoms

Pesticides

Biological Diatom Index

Community analysis

Diuron

Recovery

ABSTRACT

Vineyard areas are important causes of water contamination, especially by pesticides and residues. These compounds can markedly disturb aquatic communities particularly photosynthetic organisms that are targeted by herbicides. Biofilms and diatoms were used as bioindicators for quality assessment in the Morcille watershed, an area impacted by Beaujolais vineyards (SE France), during the pesticide spreading period (April–May 2008). Biofilms were allowed to settle on glass slides for 4 or 8 weeks at three sites along a 7-km long gradient of trophic (mainly orthophosphate) and pesticide pollution. After a 4-week colonization, samples from the two contaminated downstream sites were transferred upstream to the clean site for 4 weeks while others were left in the same place.

In vivo fluorescence measurements indicated that the periphytic communities were dominated by diatoms. Going downstream, biofilm biomass and diatom species richness decreased; normalized diatom indices (including the French standard BDI) expressed the increase in trophic status quite well. The species composition of the assemblages was used to discriminate between the effects of nutrients and toxicants, which increased simultaneously as the river continued downstream.

The way in which the biofilm samples transferred upstream recovered was quite different depending on the location of the original site in the contamination gradient. Most of the quantitative descriptors reached a level comparable to that of the reference communities, but the diatom assemblages (cell density per surface unit, taxonomic composition) varied between dates and along the gradient. These communities did not entirely recover a reference structure but the increase in diversity, associated with the settlement of sensitive species, suggested an elevated recovery potential.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Aquatic life constitutes the ultimate indicator of conditions in aquatic systems, and many studies undertaken to assess the degradation of habitats and water quality have been based on key organisms (primary producers, benthic invertebrates and fishes). In particular, periphytic diatoms are widely used for monitoring purposes because of their value as indicators of organic pollution, eutrophication and acidification (the major diatom-based indices are reviewed in Prygiel et al., 1999). More recently, *in situ* surveys of toxic pollutants like heavy metals (Ivorra et al., 2002; Gold et al., 2003; Morin et al., 2008a) or pesticides (De Jonge et al., 2008; Morin et al., 2009) have provided data in favour of an extension of the application domain of diatoms indices.

Reaching a 'good ecological status' (i.e. close to reference conditions) for most surface waters by 2015, as imposed by the European Water Framework Directive (2000/60/EC), should lead to

the rehabilitation of many impacted sites. In this context, growing interest is now given to studying recovery trajectories and community resilience in aquatic environments. Due to their key ecological role in streams and rivers, studying and understanding biofilm resilience is a matter of importance. Since polluted sites are difficult to remediate and generally necessitate long-term surveillance, the assessment of the consequences of site rehabilitation on periphytic communities could be helped by rapid alternative methods. The use of translocation approaches (from up- to downstream of a point source of contamination and vice versa) has thus been proposed to provide an *in situ* assessment of the impacts on un-exposed microbenthic communities or of the resilience of chronically exposed communities after mimicking a reduction of pollution pressure by biofilm translocation (Ivorra et al., 1999; Tolcach and Gómez, 2002).

Considering the lack of knowledge about the recovery trajectory of microbenthic communities moved from contaminated sites, we propose here an *in situ* survey for studying biofilm and diatom recovery potential in the Morcille River (France) which exhibits increasing pesticide contamination with vineyard pressure (Gouy et al., 1998; Lagacherie et al., 2006; Rabiet et al., 2008),

* Corresponding author. Tel.: +33 557 892721; fax: +33 557 890801.
E-mail address: soizic.morin@cemagref.fr (S. Morin).

Available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/watres

In situ relationships between spatio-temporal variations in diuron concentrations and phototrophic biofilm tolerance in a contaminated river

Stéphane Pesce*, Christelle Margoum, Bernard Montuelle

Cemagref, UR MALY, 3 bis quai Chauveau – CP 220, F-69336 Lyon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 August 2009

Received in revised form

20 November 2009

Accepted 26 November 2009

Available online 22 December 2009

Keywords:

PAM

Pesticides

PICT

Periphyton

Photosynthesis

Stream

ABSTRACT

Microbial biofilms are useful indicators for monitoring the ecological state of rivers. When assessing the effects of toxicants on microbial communities in natural ecosystems, special attention must be paid to the distinction between such effects and those resulting from other environmental variables. The pollution-induced community tolerance (PICT) approach offers the means to partially isolate effects of individual toxicants within a complex ecosystem by studying shifts in community sensitivity. To validate PICT for site-specific risk assessment, we investigated how closely diuron tolerance acquisition by photoautotrophic biofilm communities could reflect their previous *in situ* exposure to this herbicide. To this end, a field survey was conducted for 9 months in a French river contaminated by diuron inputs from adjacent vineyards. Spatio-temporal variations in diuron tolerance capacities of photoautotrophic communities were estimated monthly using short-term photosynthetic bioassays. The biological survey was coupled with intensive physico-chemical monitoring to analyze the environmental factors influencing tolerance induction. We revealed a possible influence of three co-varying environmental variables (nitrates, conductivity and temperature), but statistical analysis clearly demonstrated that the main factor explaining variation in diuron sensitivity was the mean *in situ* diuron exposure level during biofilm colonization periods. A remarkable exponential correlation between EC_{50} values and *in situ* diuron concentrations ($R^2 = 0.90$, $p < 0.0001$) was recorded, confirming that PICT can be a powerful tool for the environmental monitoring of rivers.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

One intention of the European Water Framework Directive (WFD) is to achieve good chemical and ecological status of waters, and further directives have recently been issued in support of this goal (Fuerhacker, 2009). Bioindicators supporting European legislation (invertebrates, fishes and macrophytes) have been defined to characterise trophic

pressure: the macrophytes biological index for rivers (Haury et al., 2006), the biological diatom index (Lenoir and Coste, 1996) and the standardized global biological index (AFNOR, NF T 90 350, 2004). However, research works are in progress to design or propose new bioindicators appropriate for toxic substances. Organic pesticides are one important group of environmental contaminants taken into account by WFD. According to the article 16 of the WFD, a list of 33 priority

* Corresponding author. Tel.: +33 472208795; fax: +33 478477875.

E-mail addresses: stephane.pesce@cemagref.fr (S. Pesce), christelle.margoum@cemagref.fr (C. Margoum), bernard.montuelle@cemagref.fr (B. Montuelle).

0043-1354/\$ – see front matter © 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.watres.2009.11.053

The periphyton as a multimetric bioindicator for assessing the impact of land use on rivers: an overview of the Ardières-Morcille experimental watershed (France)

B. Montuelle · U. Dorigo · A. Bérard ·
B. Volat · A. Bouchez · A. Tlili · V. Gouy ·
S. Pesce

Received: 28 July 2009 / Accepted: 18 January 2010 / Published online: 4 February 2010
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

Abstract Developing new biological indicators for monitoring toxic substances is a major environmental challenge. Intensive agricultural areas are generally pesticide-dependent and generate water pollution due to transfer of pesticide residues through spray-drift, run-off and leaching. The ecological effects of these pollutants in aquatic ecosystems are broad-ranging owing to the variety of substances present (herbicides, fungicides, insecticides, etc.). Biofilms (or periphyton) are considered to be early warning systems for contamination detection and their ability to reveal effects of pollutants led researchers to propose a variety of methods to detect and assess the impact of pesticides. The present article sought to provide new insights into the ecological significance of biofilm

microbial communities and to discuss their bioindication potential for water quality and land use by reporting on 4 years of research performed on the French Ardières-Morcille experimental watershed (AMEW). Various biological indicators have been applied during several surveys on AMEW, allowing the characterisation of (i) the structure and diversity of biofilm communities [community level finger printing (CLFP) such as PCR–DGGE and pigment classes], (ii) functions associated with biofilm [community level physiological profiles (CLPP) such as extracellular enzymes, pesticides biodegradation or carbon sources biodegradation] and (iii) biofilm tolerance assessment (pollution-induced community tolerance, PICT) of the main contaminant in the AMEW (copper and diuron). Approaches based on CLFPs and PICT were consistent with each other and indicated the upstream–downstream impact due to the increasing land use by vineyards and the adaptation of algal and bacterial communities to the pollution gradient. CLPPs gave a contrasted bioindication because some parameters (most of the tested extracellular enzymes activities) did not detect a pollution gradient. Such CLPPs, CLFPs and PICT methods applied to biofilm could constitute the basis for a relevant in situ assessment both for chemical effects and aquatic ecosystem resilience.

Keywords Biofilms · River · Biological indication · Pollution · Community level physiological profile · Finger prints · Pollution-induced community tolerance

Guest editors: R. J. Stevenson, S. Sabater / Global Change and River Ecosystems – Implications for Structure, Function and Ecosystem Services

B. Montuelle (✉) · B. Volat · A. Tlili ·
V. Gouy · S. Pesce
Cemagref, UR MALY, 3 quai Chauveau CP220,
Lyon 69336 Cedex 09, France
e-mail: bernard.montuelle@cemagref.fr

U. Dorigo · A. Bouchez
INRA UMR CARTELE, Laboratoire RITOXE, BP 511,
74203 Thonon Cedex, France

A. Bérard
INRA, UMR INRA/UAPV Climat Sol Environnement,
Site Agroparc, 84914 Avignon Cedex, France

Evidence for adaptation of riverine sediment microbial communities to diuron mineralization: incidence of runoff and soil erosion

Stéphane Pesce • Fabrice Martin-Laurent •
Nadine Rouard • Agnès Robin • Bernard Montuelle

Received: 13 March 2009 / Accepted: 2 February 2010 / Published online: 3 March 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract

Purpose Surface runoff and erosion are major drivers of pesticide transport from soils to rivers draining vineyard watersheds. A recent study showed that applications of diuron on vineyards and diuron dispersal could lead to microbial adaptation to diuron biodegradation from treated soils to the receiving hydrosystem. Given the limited knowledge on microbial adaptation to pesticide degradation in aquatic environments, we conducted a microcosm study designed to assess the impact of runoff and erosion processes on the adaptation of riverine-sediment microbial communities to diuron mineralization.

Materials and methods The experimental laboratory set-up consisted in aquariums filled with natural riverine sediments and water and supplemented or not in triplicate (a) with diuron to simulate surface water runoff and (b) with diuron-treated vineyard soil to simulate erosion following a strong rainfall event. The resulting effects were estimated by assessing and comparing (a) the fate of diuron and diuron partitioning between sediment and water phases, (b)

the evolution of sediment-based bacterial community density and community structure, and (c) the evolution of diuron mineralization potential in sediment samples.

Results and discussion Diuron dissipated rapidly in all the microcosms, with half-life values varying between 1 and 3 weeks. The treated soil (and then soil microbiota) or dissolved diuron inputs to microcosms had no significant effect on sediment bacterial density and community structure. After 2 to 4 weeks, both contamination procedures led to a significant increase in sediment diuron mineralization potential.

Despite the lack of effects on sediment bacterial density and community structure, both diuron runoff and/or diuron-contaminated soil erosion led to sediment community adaptation to diuron mineralization. This confirmed that chronic exposure to diuron may lead riverine sediment communities to adapt to the degradation of this herbicide. The shorter initial lag-phase in mineralization kinetics observed in microcosms treated with diuron-contaminated soil suggests transfer of degradative potential from soil to sediment.

Conclusions Our observations confirmed evidence of a high diuron biodegradation potential by benthic microbial communities in chronically exposed watersheds and highlighted that inter-linkages between soil and sediments may also modify biological functions that regulate aquatic ecosystems.

Microbial communities adapted to pesticide biodegradation are likely to play a key environmental role in reducing pesticide exposure in contaminated ecosystems. To assess this self-purifying function, further research is needed to improve the estimation of real in-field pesticide biodegradation kinetics and processes in both soil and aquatic ecosystems without overlooking the inter-compartments linkages that can occur.

Responsible editor: Thomas Knacker

S. Pesce (✉) • B. Montuelle
Cemagref, UR MALY,
3bis Quai Chauveau CP 220,
69336 Lyon, France
e-mail: stephane.pesce@cemagref.fr

F. Martin-Laurent • N. Rouard
INRA–Université de Bourgogne,
UMR Microbiologie du Sol et de l'Environnement,
17 Rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France

A. Robin
CNRS–Université Blaise Pascal, UMR 6023,
Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement,
63177 Aubière Cedex, France



Contents lists available at ScienceDirect

Aquatic Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquatox

Evaluation of single and joint toxic effects of diuron and its main metabolites on natural phototrophic biofilms using a pollution-induced community tolerance (PICT) approach

Stéphane Pesce^{a,*}, Sophie Lissalde^b, Delphine Lavieille^a, Christelle Margoum^a, Nicolas Mazzella^b, Vincent Roubeix^b, Bernard Montuelle^a

^a Cemagref, UR MALY, 3bis Quai Chauveau - CP 220, F-69336 Lyon, France

^b Cemagref, UR REBX, 50 av. de Verdun, F-33612 Cestas Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 March 2010

Received in revised form 7 June 2010

Accepted 23 June 2010

Keywords:

Biofilms
Diatoms
Pesticides
Metabolites
Mixture toxicity
Photosynthesis
PICT
POCIS

ABSTRACT

This study assessed the single and joint acute toxicity of diuron and two of its metabolites (DCPMU and 3,4-DCA) on natural phototrophic biofilms using a PICT approach with photosynthesis bioassays. River biofilm communities were collected at three sampling stations exhibiting increasing concentrations of diuron, DCPMU and 3,4-DCA from upstream to downstream. Applied individually, the parent compound was more toxic than its metabolites, with DCPMU being more toxic than 3,4-DCA which only inhibited photosynthesis at very high concentrations (EC25 at about 5 mg/l). Sensitivity of biofilm communities to diuron and DCPMU decreased from upstream to downstream, revealing tolerance induction in contaminated sections of the river, as expected from the PICT concept. Nevertheless, PICT was not applicable for 3,4-DCA, which similarly affected upstream, intermediate and downstream biofilm communities. Chemical mixtures of diuron and DCPMU demonstrated additive effects whereas combinations with 3,4-DCA enhanced the observed effects.

Our results reveal that the individual and combined presence of diuron and DCPMU in lotic ecosystems can have both short-term effects (as shown with bioassays) and long-term effects (as shown through the PICT approach) on phototrophic biofilms, whereas environmental concentrations of 3,4-DCA may not affect biofilm photosynthetic activity.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Natural freshwater ecosystems are exposed to chemical mixtures generally composed of multiple potential toxicants, including pesticides. Agriculture is a major source of diffuse contamination of surface waters by pesticides (Schwarzenbach et al., 2006), and streams located in agricultural areas are particularly exposed to this kind of pollution. In these small lotic ecosystems, biofilm microbial communities, which develop on immersed substrates or sediments, play a key ecological role by contributing substantially to energy flow and nutrient cycling (Battin et al., 2003). Strong interactions occurred between biofilms and dissolved substances such as pesticides (Sabater et al., 2007). Their physiological characteristics make photoautotrophic biofilm communities (microalgae and cyanobacteria) potential primary biological targets in lotic ecosystems contaminated by photosynthetic inhibitor herbicides. Among this class of pesticides, the phenylurea herbicide diuron (3-

3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea), which belongs to the list of priority pollutants defined by European Water Framework Directive (WFD, 2000/60/EC), is one of the most frequently detected in freshwater ecosystems. Several recent reports have confirmed the presence of this herbicide in streams and rivers in agricultural regions (e.g. Pesce et al., 2008a; Schuler and Rand, 2008; Stork et al., 2008; Morin et al., 2009).

There is now evidence from several experimental studies that environmentally realistic concentrations of diuron (i.e. a few micrograms per liter) can directly and/or indirectly affect freshwater microbial communities, including the autotrophic and heterotrophic compartments (Perschbacher and Ludwig, 2004; Pesce et al., 2006, 2008b; Francoeur et al., 2007; Tlili et al., 2008, 2010; Ricart et al., 2009; Tadonlélé et al., 2009). Moreover, field studies have also revealed that *in situ* diuron exposure of biofilms in a contaminated stream can induce microbial adaptation processes leading to an increase in diuron mineralization potential (Pesce et al., 2009) and tolerance capacities (Dorigo et al., 2007; Pesce et al., 2010) in exposed periphyton. The acquisition of tolerance by photoautotrophic communities following chronic diuron exposure was previously observed in microcosms studies using marine (Molander and Blanck, 1992) and freshwater (McClellan et

* Corresponding author. Tel.: +33 472208795; fax: +33 478477875.
E-mail addresses: stephane.pesce@cemagref.fr, stephane.pesce@cemagref.fr (S. Pesce).



Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Pollution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envpol

Combining polar organic chemical integrative samplers (POCIS) with toxicity testing to evaluate pesticide mixture effects on natural phototrophic biofilms

Stéphane Pesce^{a,*}, Soizic Morin^b, Sophie Lissalde^b, Bernard Montuelle^{a,c}, Nicolas Mazzella^b

^a Cemagref, UR MALY, 3 bis quai Chauveau - CP 220, F-69336 Lyon, France

^b Cemagref, UR REBX, 50 av. de Verdun, F-33612 Cestas Cedex, France

^c INRA, UMR CARRTEL, 75 av. de Corzent - BP 511, F-74203 Thonon Cedex, France

Pesticide mixtures extracted from POCIS can affect chl a fluorescence, photosynthetic efficiency and community structure of natural biofilms.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 July 2010

Received in revised form

17 November 2010

Accepted 20 November 2010

Keywords:

Biofilms

Mixture

Pesticides

Polar Organic Chemical Integrative Sampler (POCIS)

ABSTRACT

Polar organic chemical integrative samplers (POCIS) are valuable tools in passive sampling methods for monitoring polar organic pesticides in freshwaters. Pesticides extracted from the environment using such methods can be used to toxicity tests. This study evaluated the acute effects of POCIS extracts on natural phototrophic biofilm communities. Our results demonstrate an effect of POCIS pesticide mixtures on chlorophyll *a* fluorescence, photosynthetic efficiency and community structure. Nevertheless, the range of biofilm responses differs according to origin of the biofilms tested, revealing spatial variations in the sensitivity of natural communities in the studied stream. Combining passive sampler extracts with community-level toxicity tests offers promising perspectives for ecological risk assessment.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Monitoring programs throughout the world have reported the widespread occurrence of organic pesticides in freshwater bodies. Agriculture is a major source of diffuse contamination of surface waters by pesticides (Schwarzenbach et al., 2006), and streams located in agricultural areas are particularly exposed to this kind of pollution. In these small lotic ecosystems, microbial biofilm communities, which develop on immersed substrates or sediments, play a key ecological role by contributing substantially to energy flow and nutrient cycling (Battin et al., 2003). Biofilms interact with dissolved substances including pesticides (Sabater et al., 2007), integrate the effects of ecosystem disturbances, and have a strong capacity to adapt to environmental changes (Burns and Ryder, 2001; Montuelle et al., 2010).

In natural ecosystems, biofilms are typically exposed to mixtures of pesticides (Chèvre et al., 2006). Several authors have emphasized the need to consider mixtures when assessing the ecological effects of pesticides (Chèvre et al., 2006; Knauer et al.,

2010) but there is still debate as to the best way to address the issue (Knauer et al., 2008, 2009). One possible approach for identifying the risks posed by mixtures of pollutants in contaminated waters is to combine passive sampling with the assessment of extract toxicity via bioassays (Bopp et al., 2007; Shaw et al., 2009). Among the passive sampling methods available, polar organic chemical integrative samplers (POCIS) are valuable tools for monitoring polar organic pesticides in freshwaters (Alvarez et al., 2004; Mazzella et al., 2008, 2010). POCIS is able to retain a large range of polar organic pollutants with a log *K*_{ow} from 0 to 4, and belonging to different classes (e.g. hormones, non-ionic detergents, polar pharmaceuticals and pesticides) (Alvarez et al., 2004, 2007; Macleod et al., 2007). This passive sampling technique notably offers new possibilities for facilitating the assessment of the relationship between tolerance induction in biofilm communities and mean polar contaminant exposure in pollution-induced community tolerance (PICT) approaches (Pesce et al., 2010b; Rotter et al., 2010).

To date, few studies have combined POCIS with toxicity testing, and the previous effects assessments were performed to evaluate the estrogenic potential of POCIS extracts using the yeast estrogen screen (YES) bioassay (Petty et al., 2004; Vermeirssen et al., 2005; Liscio et al., 2009). Other polar organic samplers (empore™ extraction disks) have been combined with photosynthesis bioassays using microalgae for sample phytotoxicity assessment (Escher

* Corresponding author.

E-mail addresses: stephane.pesce@cemagref.fr (S. Pesce), soizic.morin@cemagref.fr (S. Morin), sophie.lissalde@cemagref.fr (S. Lissalde), bernard.montuelle@cemagref.fr (B. Montuelle), nicolas.mazzella@cemagref.fr (N. Mazzella).

Effects of Organic Herbicides on Phototrophic Microbial Communities in Freshwater Ecosystems

Stéphane Pesce, Agnès Bouchez, and Bernard Montuelle

Contents

1	Introduction.....	87
2	Experimental Studies	88
	2.1 Effects of Single Herbicides	88
	2.2 Effects of Herbicide Mixtures.....	108
3	Field Studies.....	111
	3.1 Effect of In Situ Exposure on Community Structure and Primary Production.....	111
	3.2 PICT Approaches.....	112
	3.3 Recovery Studies	113
4	Potential Future Areas for Research	113
	4.1 Improving Exposure Assessments.....	114
	4.2 Improving Assessment of Biological Effects	115
	4.3 Ecosystem Recovery.....	116
5	Summary	117
	References.....	118

1 Introduction

Pollution of aquatic ecosystems by pesticide contamination is a major environmental concern. Numerous authors have addressed the frequent occurrence of chronic or acute herbicide contamination of freshwater ecosystems in both agricultural and urban areas of the world (Devault et al. 2007; Gilliom 2007; Schuler and Rand 2008; Woudneh et al. 2009). The physiological characteristics of photosynthetic microorganisms make them attractive as targets for herbicides in aquatic ecosystems. Since these primary producers form the basis of trophic structure in many aquatic environments, herbicides may threaten the entire equilibrium of the ecosystems they contaminate.

S. Pesce (✉)

Cemagref, UR MALY, 3bis quai Chauveau, CP 220, Lyon cedex 09 69336, France
e-mail: stephane.pesce@cemagref.fr



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Aquatic Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquatox

Structural and functional recovery of microbial biofilms after a decrease in copper exposure: Influence of the presence of pristine communities

Anne-Sophie Lambert^a, Soizic Morin^b, Joan Artigas^a, Bernadette Volat^a, Marina Coquery^a, Marc Neyra^a, Stéphane Pesce^{a,*}

^a Irstea, UR MALY, 3 bis quai Chauveau - CP 220, F-69336 Lyon, France

^b Irstea, UR REBX, 50 avenue de Verdun, F-33612 Cestas Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 September 2011

Received in revised form 5 December 2011

Accepted 6 December 2011

Keywords:

Bacteria

Diatoms

Immigration

Periphyton

Photosynthesis

PICT

ABSTRACT

The present study aimed at assessing the recovery of phototrophic and heterotrophic biofilm communities after a decrease in copper exposure. An original experiment was designed to evaluate the possible influence of non-exposed (*i.e.* pristine) communities (*e.g.* via immigration processes) in recovery dynamics. Laboratory channels were used to study the structural and functional changes in microbial communities after a 4-week Cu exposure period in the presence and absence of pristine biofilms. When pristine biofilms were present, phototrophic communities recovered within 6 weeks, both in terms of biomass, structure and photosynthetic activity. Recovery processes were also detected using the PICT approach. In contrast, in the absence of pristine communities, all of the Cu-induced changes recorded in the phototrophic communities remained throughout the recovery period.

Regardless of the presence or absence of pristine biofilms, the decrease in Cu exposure did not abolish Cu-induced changes in bacterial community structure, whereas functional recovery (based on beta-glucosidase activity) was complete in both recovery contexts.

These results revealed that microbial community response to a decrease in Cu exposure differs between phototrophic and heterotrophic communities. The presence of pristine communities greatly influences the structural and functional recovery of phototrophic communities, suggesting an important role of microbial immigration processes, but have far less influence on the recovery trajectory of heterotrophic communities.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The restoration of chemically contaminated aquatic ecosystems has become an important concern, especially through environmental policies such as the European Water Framework Directive (2000/60/EC), prompting growing interest in studying recovery trajectories and community resilience in aquatic environments (Depledge, 1999; Ivorra et al., 1999; Tolcach and Gómez, 2002; Dorigo et al., 2010a; Morin et al., 2010). In lotic ecosystems, periphytic biofilms assume key ecological functions such as primary production and nutrient cycling (Battin et al., 2003). These microbial assemblages are formed by phototrophic and heterotrophic communities, both of which are characterized by short generation times. This, together with the fact that they are the first to

interact with dissolved substances, makes biofilms a candidate “early warning system” for detecting the effects of chemicals on aquatic systems (Sabater et al., 2007). Despite an increasing number of studies on the impact of toxicants on biofilm microbial communities, knowledge on their recovery dynamics following a decrease in exposure levels remains scarce (*e.g.* Boivin et al., 2006; Dorigo et al., 2010a,b; Morin et al., 2010; Rotter et al., 2011).

Aquatic environments are highly affected by metal pollution, with copper (Cu) being one of the most commonly detected contaminants in surface waters (Bossuyt and Janssen, 2004; Serra and Guasch, 2009). Chronic exposure to Cu is known to result in structural and functional effects in autotrophic and heterotrophic biofilm microbial communities (Soldo and Behra, 2000; Boivin et al., 2006; Serra and Guasch, 2009). The resulting changes in microbial communities generally lead to an increase in community tolerance to Cu, in line with the pollution-induced community tolerance (PICT) concept introduced by Blanck et al. (1988). The principle of PICT is that chronic contact with a toxicant can result in changes at the community level due to various toxicant-induced effects. These include individual acclimation (physiological or genetic

* Corresponding author at: Irstea, UR MALY, 3 bis quai Chauveau - CP 220, F-69336 Lyon, France. Tel.: +33 472208795; fax: +33 478477875.

E-mail addresses: soizic.morin@irstea.fr (S. Morin), joan.artigas-alejo@irstea.fr (J. Artigas), bernadette.volat@irstea.fr (B. Volat), marina.coquery@irstea.fr (M. Coquery), marc.neyra@irstea.fr (M. Neyra), stephane.pesce@irstea.fr (S. Pesce).

Use of polar organic chemical integrative samplers to assess the effects of chronic pesticide exposure on biofilms

Soizic Morin · Stéphane Pesce · Sandra Kim-Tiam · Xavier Libert · Marina Coquery · Nicolas Mazzella

Accepted: 7 April 2012 / Published online: 25 April 2012
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

Abstract The responses of aquatic organisms to chronic exposure to environmental concentrations of toxicants, often found in mixtures, are poorly documented. Here passive sampler extracts were used in experimental contamination of laboratory channels, to investigate their effects on natural biofilm communities. A realistic mixture of pesticides extracted from Polar Organic Chemical Integrative Samplers was used to expose biofilms in laboratory channels to total pesticide concentrations averaging $0.5 \pm 0.1 \mu\text{g l}^{-1}$. The level of exposure was representative of field conditions in terms of relative proportions of the substances but the exposure concentration was not maintained (decreasing concentrations between contamination occasions). The impact on the structural as well as the functional characteristics of the autotrophic and heterotrophic components was determined, using biofilm grown in uncontaminated conditions (reference site) and in sites exposed to pesticides (contaminated site). The exposure imposed did not significantly modify the structure or functions of reference biofilms, nor did it modify tolerance as measured by mixture EC_{50} (EC_{50} mix). In contrast, the communities from the more contaminated downstream section lost tolerance following decreased dose exposure, but community composition remained fairly stable. Overall, these results indicate that low levels of contamination

did not lead to strong changes in community structure, and 14-day changes in tolerance seemed to depend mainly on physiological adaptation, suggesting that other environmental factors or longer-lasting processes prevailed. This study reports the first attempt to use passive sampler extracts as a realistic composite contaminant for experimental exposure of biofilms, with promising perspectives in further ecotoxicology studies.

Keywords Periphyton · Realistic pesticide mixtures · POCIS extracts · Low dose · Tolerance · Diatoms

Introduction

Pesticide contamination of the environment and the subsequent responses of periphytic communities to pollutants are often studied using the pollution-induced community tolerance (PICT) method. This approach is based upon the assumption that a community that has been previously exposed to a substance or group of substances would acquire tolerance (physiological and/or structural) to these pollutants greater than that of comparable communities which had not suffered such conditions (Blanck et al. 1988). Thus, differences in tolerance, which can be evaluated by short-term bioassays with increasing toxic concentration(s), can reveal a posteriori the exposure history of a biological community. This kind of approach is particularly suitable for dealing with complex entities such as periphytic communities (Tlili and Montuelle 2011). The tolerance acquired by periphytic communities, measured in this way, expresses on the one hand to a physiological adaptation of individuals, but also to a structural modification of communities (Dorigo et al. 2007; Duong et al. 2008; Morin et al. 2010a).

S. Morin (✉) · S. Kim-Tiam · X. Libert · N. Mazzella
Iristea, UR REBX, 50 Avenue de Verdun, 33612 Cestas Cedex,
France
e-mail: soizic.morin@irstea.fr

S. Pesce · M. Coquery
Iristea, UR MALY, 3 Bis Quai Chauveau-CP220, 69336 Lyon,
France

Diatom immigration drives biofilm recovery after chronic copper exposure

SOIZIC MORIN*, ANNE-SOPHIE LAMBERT*, JOAN ARTIGAS*, MARINA COQUERY* AND STÉPHANE PESCE*

*Irstea, UR REBX, 50 avenue de Verdun, Cestas cedex, France

*Irstea, UR MALY, 3 bis quai Chauveau, Lyon cedex, France

SUMMARY

1. The impact of immigration on the recovery of diatom assemblages after chronic exposure to copper was investigated in laboratory microcosms.
2. We examined the recovery trajectories of copper-contaminated biofilms after reducing copper stress and with or without the possibility of immigration from unimpaired communities.
3. The biofilms mixed with unimpaired communities returned to a 'control' assemblage structure within 6 weeks, with recovery patterns depending on the endpoint considered (i.e. 2 weeks for relative abundances of diatom species but 6 weeks for total diatom biomass). In contrast, no recovery was observed in assemblages placed under control conditions without external immigrants.
4. Immigration has important effects on the recovery of quantitative and qualitative characteristics of biofilms.

Keywords: biofilm, copper, diatoms, immigration, recolonisation, recovery

Introduction

In the early 1990s, Stevenson & Peterson (1989, 1991) studied the emigration and immigration of benthic diatoms as determinants of periphytic communities in streams. Since their work, the influence of immigration in freshwater benthic systems has mainly been considered in relation to recovery following sharp changes in flow regime, that is, spate (Stevenson, 1990; Peterson & Stevenson, 1992; Peterson, 1996) or episodes of drought (Benenati, Shannon & Blinn, 1998; Bambakidis, 2009).

Translocation studies are increasingly used to assess the recovery potential of riverine periphytic communities (biofilms). They are generally performed by transferring biofilms from contaminated sites to uncontaminated sites upstream of the contamination source (Tolcach & Gómez, 2002; Dorigo *et al.*, 2010; Morin *et al.*, 2010a; Rotter *et al.*, 2011), but sometimes by transplanting contaminated communities to a neighbouring river with similar environmental conditions (Ivorra *et al.*, 1999). Depending on the study, the time for full recovery of diatom assemblage structure has been estimated at from as little as two

(Tolcach & Gómez, 2002) to over 9 weeks (Dorigo *et al.*, 2010). The contribution of immigration to recovery after the episodes of contamination is often questioned in translocation experiments and ecotoxicological studies in general (e.g. Ivorra *et al.*, 1999; Morin *et al.*, 2010a). However, it remains virtually impossible to discriminate between the effects of regrowth from remaining viable cells and colonisation by new immigrants.

Here, we performed an experimental study designed to assess the relative contribution of drift to the recovery of diatom assemblages from copper exposure. A series of laboratory channels were used to grow biofilms under control and Cu-contaminated conditions, prior to simulating the recovery of exposed assemblages with and without connectivity to unimpaired biofilms (i.e. allowing or not species immigration from a pristine community). Total diatom biomass and species relative abundances were monitored. In addition, a range of descriptors for assessing diatom population dynamics (daily rates of increase in diatom density, estimation of population growth) were determined to identify the ecological importance to the recovery of immigration as distinct from regrowth from remnant cells.



Effects of the fungicide tebuconazole on microbial capacities for litter breakdown in streams

Joan Artigas*, Joy Majerholm, Arnaud Foulquier, Christelle Margoum, Bernadette Volat, Marc Neyra, Stéphane Pesce

Irstea, UR MALY, 3 îles quai Chauveau – CP 220, F-69336 Lyon, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 3 May 2012
Received in revised form 21 June 2012
Accepted 22 June 2012

Keywords:
Alnus glutinosa
Artificial streams
Bacteria
Extracellular enzyme kinetics
Fungi
Populus nigra

ABSTRACT

Streams draining agricultural basins are subjected to the input of fungicides which can affect aquatic microbial communities. We analyzed the effect of the fungicide tebuconazole (TBZ) on *Alnus glutinosa* and *Populus nigra* litter breakdown by aquatic microorganisms. For six weeks, fungal and bacterial responses were analyzed in indoor stream channels subjected to TBZ-contaminated ($33.1 \pm 12.4 \mu\text{g L}^{-1}$) and uncontaminated conditions. Litter breakdown rates decreased in presence of TBZ. The decrease was explained by reductions in microbial biomass development and shifts in community structure. At the same time, TBZ modified the kinetics of β -glucosidase, β -xylosidase and cellobiohydrolase enzymes resulting in lower affinities for cellulose and hemicellulose decomposition in leaves. These alterations were modulated by the litter quality; the greatest structural impairment was observed in *Populus* whereas *Alnus* were more affected in terms of leaf breakdown rate. Our results suggest that chronic exposure to TBZ can affect aquatic microbial communities and their capacity to break down leaf litter in streams.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Litter breakdown, a process involving the activity of fungi and bacteria, plays a central role in the metabolism of forested stream environments (Suberkropp and Klug, 1976). Although a variety of internal and external factors may govern breakdown (Gessner and Chauvet, 2002), the impact of pesticides on leaf microbial communities has been under-researched (Duarte et al., 2008; Piscart et al., 2009). Given the crucial role of fungi in litter degradation, we might expect this microbial process to be impacted by fungicide exposure. Fungicides, used to prevent foliar diseases in a wide range of vegetable, fruit and ornamental crops, are present in many streams (Battaglin et al., 2011), especially in vineyard regions (Montuelle et al., 2010). They can be found either in the flowing water (Rabiet et al., 2010) or accumulated in sediments, where they are found usually at higher concentrations (Bermúdez-Couso et al., 2007). The frequency of fungicide applications in vineyards and the runoff during rainfall episodes regulate their inputs (Bermúdez-Couso et al., 2007). These environmental residues are thus a potential threat to aquatic microbial communities and their ability to degrade organic matter in streams.

Tebuconazole ($\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{ClN}_3\text{O}$) (TBZ) is a broad-spectrum azole fungicide that inhibits the biosynthesis of ergosterol, a key

component of the fungal cell membrane, hampering the development of fungal biomass (Copping and Hewitt, 1998). In recent years, the presence of TBZ in stream water has increased (Montuelle et al., 2010), possibly due to the prohibition of carbendazim in fungicide formulations (EC 1107/2009). TBZ concentrations detected in central European streams range between 0.02 and $9.1 \mu\text{g L}^{-1}$ (Berenzen et al., 2005; Rabiet et al., 2010) but contamination peaks mostly occur during flooding episodes in summer (Rabiet et al., 2010). The impact of TBZ on microbial communities has been evaluated in soils (Cycoń et al., 2006; Muñoz-Leoz et al., 2011), but research in aquatic environments is rather recent (Bundschuh et al., 2011; Zubrod et al., 2011). Despite the lack of information on TBZ effects on aquatic microbial communities, preliminary results suggest that this fungicide can globally reduce fungal biomass development and cause shifts in fungal community composition in submerged leaf litter (Bundschuh et al., 2011). Also, indirect effects on bacterial communities have been documented in soils (Johansen et al., 2001; Cycoń et al., 2006). Other experiments, by contrast, found no impact of TBZ on soil microbial communities (Strickland et al., 2004). This lack of consensus may be explained by differences in exposure times and concentrations of the fungicide utilized between experiments (Muñoz-Leoz et al., 2011).

Extracellular hydrolytic and oxidative enzymes are used by microbial heterotrophs to degrade litter polysaccharides into small monomers (Chamier, 1985; Sinsabaugh et al., 1994). While fungal enzymes are often involved in the breakdown of complex polysaccharides (e.g. cellulose and lignin), bacteria tend to decompose

* Corresponding author. Tel.: +33 0 472 848 748; fax: +33 0 478 477 875.
E-mail address: joan.artigas.alejo@gmail.com (J. Artigas).



VARIATIONS IN PERIPHYTIC DIATOM TOLERANCE TO AGRICULTURAL PESTICIDES IN A CONTAMINATED RIVER: AN ANALYSIS AT DIFFERENT DIVERSITY LEVELS

Vincent Roubeix^{1,*}, Stéphane Pesce², Nicolas Mazzella¹, Michel Coste¹ and François Delmas¹

¹ Irstea, UR REBX, 50 av. de Verdun, 33612 Cestas Cedex, France

² Irstea, UR MALY, 3bis Quai Chauveau - CP 220, 69336 Lyon, France

ABSTRACT

Periphytic diatoms are an important phototrophic component of river biofilm and are used in situ for the bioindication of pollution as well as in laboratory ecotoxicological tests to assess the toxicity of contaminants. In spring 2009, phototrophic biofilm samples mostly composed of diatoms were collected in a small river and their sensitivity to the herbicide diuron was estimated via photosynthesis bioassays. A large difference in tolerance to diuron was demonstrated between two periphytic communities from an upstream unpolluted site and a downstream site subjected to high seasonal contamination by pesticides. The comparison of diatom community structure between sites revealed important variations of the relative abundance of some species which could explain this difference. Consequently, some of these species were isolated from the river in autumn when toxic pressure was low, and kept in culture for more than six months in uncontaminated water. Acute toxicity tests of diuron based on growth inhibition were then performed on each species. Surprisingly the sensitivities of the species as estimated by EC50 were almost the same. However two strains of another species that could be isolated from each site of the river showed significant differences in tolerance to diuron and copper, another contaminant of the river. These results suggest the importance of adaptation at the intraspecific level in the induction of periphytic community tolerance to toxicants. Thus, they portend difficulties to fairly assess toxic pollution effects in situ with classical bioindication field methods at the community level.

KEYWORDS:

diatom; tolerance; pesticide; adaptation; bioindication.

1. INTRODUCTION

Pesticides contaminate rivers draining agricultural areas via spray drift and runoff and can generate toxic stress to aquatic organisms. According to the PICT concept [1], periphytic communities exposed to one toxicant may increase their tolerance to this toxicant. Thus, the increase in tolerance of a community to a pesticide should reveal the contamination of the river. Tolerance acquisition in communities may result either from the replacement of sensitive species by more tolerant ones, or from the development of more tolerant populations in the communities without change in species composition.

Diatoms are a major component of lotic periphyton and are commonly used as bioindicators of river eutrophication. Although little is known about their response to toxicants, diatom communities may be altered by exposure to pesticides and therefore also used for the bioindication of river contamination. Ecotoxicological studies with diatom communities have resulted in the identification of rather tolerant or sensitive species. In a community under toxic pressure, tolerant species may develop at the expense of sensitive ones. However, the capacity of adaptation at the species level has been little investigated and may contribute to a large extent to community tolerance acquisition [2-4].

From the observation of a high increase in periphytic community tolerance to the herbicide diuron in a contamination gradient (Morcille River, France), the possible ways communities can adapt were examined in this study using ecotoxicological tests on monoclonal diatom cultures. Tolerance variations between species were compared to variations between genetically differentiated populations of the same species and within the same monoclonal population.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Study area

Periphyton samples were collected at two sites along the Morcille River (Beaujolais, France) which presents a

* Corresponding author

CHARACTERIZATION OF FRESHWATER DIATOM COMMUNITIES: COMPARING TAXONOMIC AND GENETIC-FINGERPRINTING APPROACHES¹

Soizic Morin,² Vincent Roubeix

Irstea, UR REBX, 50 avenue de Verdun, F-33612, Cestas Cedex, France

Isabelle Batisson

Clermont Université, Université Blaise Pascal, LMGE, F-63000, Clermont Ferrand, France
 Laboratoire Microorganismes Génome et Environnement, UMR 6023, CNRS, F-63177, Aubière, France

Peter Winterton

Université Paul Sabatier Toulouse III, 118 route de Narbonne, F-31062, Toulouse Cedex 4, France

and Stéphane Pesce

Irstea, UR MALY, 3bis Quai Chauveau-CP 220, F-69336, Lyon, France

Benthic diatom assemblages from five sampling sites located on two rivers were characterized simultaneously by means of traditional microscopic observations and PCR-DGGE fingerprinting with primers specifically designed for Bacillariophyceae. Community structure, richness, and diversity assessed by both methods were compared. Diatom lists obtained from morphological identification were separated into subsets, depending on (i) the taxonomic level considered (genus, species, variety) and, for each of them, (ii) the relative abundance (RA) of each component (the whole data set, RA > 1%, RA > 2%). These data were then compared to genetic fingerprinting data. Clusters based on taxonomic composition and DGGE banding patterns were very similar, showing good correspondence of community structure between the two methods. Data were compared by linear regressions between indices (richness, diversity) and by Mantel tests on dissimilarity matrices generated for each community composition data set. Statistical analysis indicated that the most reliable correlations with fingerprinting were obtained for genera representing more than 1% RA or species representing more than 2% RA. The results reveal that the PCR-DGGE protocol described here offers a satisfactory alternative for performing preliminary screening of coarse differences in diatom global community structure between samples. It can be regarded as a good complement to taxonomic analyses, which still remain necessary to detect precise changes in richness and diversity, especially when considering species with low abundance in natural assemblages.

Key index words: Bacillariophyceae; community structure; diversity; genetic fingerprinting; taxonomic approaches

Abbreviations: ARISA, automated ribosomal intergenic spacer analysis; DGGE, denaturing gradient gel electrophoresis

Diatoms are widely used as indicators of water quality (Kelly and Whitton 1995, Dell'Uomo 2004, Lavoie et al. 2006, Coste et al. 2009). The criteria used for diatom identification have evolved following technological improvements in both microscopy and in the performance of molecular tools. Identification of diatom species and/or varieties based on frustule morphology, which is still the most common method, requires certain taxonomic skills and is quite time-consuming. For this reason, there is an increasing demand to extend the use of molecular-based methods for monitoring purposes or for biodiversity assessments. Diatom classification using molecular tools is still in development, and the results of different molecular analyses often do not agree with one another (e.g., Theriot et al. 2009). Recently, Valiente Moro et al. (2009) developed sets of PCR primers for the amplification of microalgal genes from environmental samples. They designed species-specific primers, with diatoms as the specific target group. Primer sets based on 18S rDNA sequences were tested on natural lacustrine planktonic diatoms, and were found to be highly specific. In their study, diatom diversity in the environmental samples originating from two different freshwater ecosystems (in France) was studied using cloning and sequencing. The authors highlighted the usefulness of this method for studying freshwater microalgal communities and even for developing molecular

¹Received 25 January 2011. Accepted 5 June 2012.

²Author for correspondence; e-mail soizic.morin@irstea.fr.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Ecological Indicators

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecolind

Short Communication

Freshwater sediment pesticide biodegradation potential as an ecological indicator of microbial recovery following a decrease in chronic pesticide exposure: A case study with the herbicide diuron

Stéphane Pesce^{a,*}, Christelle Margoum^a, Nadine Rouard^b, Arnaud Foulquier^a, Fabrice Martin-Laurent^b^a Irstea UR MALY, 5 rue de la Doua, CS 70077, 69626 Villeurbanne Cedex, France^b INRA, UMR 1347 Agroécologie, 17 rue Sully, B.P. 86510, 21065 Dijon Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 July 2012

Received in revised form

10 December 2012

Accepted 12 December 2012

Keywords:

Biological monitoring

Microbial communities

Mineralization

Vineyard

Water Framework Directive

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the use of freshwater sediment biodegradation potential as an ecological indicator for monitoring microbial recovery following a decrease in chronic pesticide exposure. For this purpose, a four-year case study (2008–2011) was conducted in a small stream (Morcille river) long exposed to high diuron concentrations, increasing from upstream to downstream. Our results show that the ban on diuron in December 2008 resulted in a progressive decrease in its concentrations in the Morcille river over the survey period. However, diuron remained present in the water three years after the ban. The spatio-temporal variations in the sediment biodegradation potential were assessed by radiorespirometry using [ring-U-¹⁴C] diuron to estimate diuron mineralization potentials. Between autumn 2008 and autumn 2011, mean diuron mineralization percentage after 15 weeks of incubation decreased by 65% downstream and by 82% in the intermediate sector, and mean 10% diuron dissipation time values increased between 143% (downstream) and 210% (intermediate). Thus the decrease in the level of chronic diuron exposure in the river also caused a fall in sediment diuron-mineralizing capacities, revealing a corresponding recovery of microbial communities. Our results show that the use of freshwater sediment biodegradation potential may be useful for assessing microbial recovery after a decrease in chronic exposure to pollutants, opening prospects for developing a new class of ecological indicator to monitor the recovery of biological quality of water resources. In this way, the use of molecular approaches based on direct extraction of nucleic acids from environmental matrices and their subsequent analysis by PCR-based approaches to quantify the abundance of pesticide-degrading communities could represent a promising alternative.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Water resources and aquatic ecosystems are an essential concern of any policy for sustainable development. European Water Framework Directive (WFD, 2000) is aiming to achieve good chemical and ecological status of waters by 2015. The European Commission was required to come forward with specific legislation regulating in more detail the general requirements of the Water Framework Directive in relation to chemical pollutants. In accordance with Article 16 of the WFD, the European Union drawn up a list of 33 priority substances representing a significant risk to or via the aquatic environment. Most of these substances are synthetic contaminants, including pesticides (Coquery et al.,

2005). Nearly all of the pesticides listed have since then been prohibited for use in several European states. For example, the herbicide diuron (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea, Bayer CropScience) was banned in France in December 2008 (French Republic Official Journal No. 204; 04.09.2007) in application of the EC directive 2007/417/EC.

Diuron is a phenylurea herbicide used for total control of weeds and mosses. This pesticide inhibits photosynthesis by blocking electron transfer in photosystem II of plants and photosynthetic microorganisms (Wessels and Van der Veen, 1956). Its intensive use in urban and agricultural areas during the recent decades has led to frequent surface water contamination, as confirmed by several recent studies highlighting the presence of diuron in various rivers draining agricultural watersheds (e.g. Pesce et al., 2008a; Schuler and Rand, 2008; Stork et al., 2008). There is now evidence from many experimental studies that environmentally realistic concentrations of diuron (i.e. a few micrograms per liter) can affect freshwater microbial communities, including the autotrophic (see for review, Pesce et al., 2011a) and heterotrophic (Pesce et al.,

* Corresponding author. Tel.: +33 472208795; fax: +33 478477875.

E-mail addresses: stephane.pesce@irstea.fr (S. Pesce),christelle.margoum@irstea.fr (C. Margoum), Nadine.Rouard@dijon.inra.fr (N. Rouard), Fabrice.Martin@dijon.inra.fr (F. Martin-Laurent).

Response of a diuron-degrading community to diuron exposure assessed by real-time quantitative PCR monitoring of phenylurea hydrolase A and B encoding genes

Stéphane Pesce · Jérémie Beguet · Nadine Rouard · Marion Devers-Lamrani · Fabrice Martin-Laurent

Received: 17 April 2012 / Revised: 10 July 2012 / Accepted: 17 July 2012 / Published online: 2 August 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract A real-time quantitative PCR method was developed to detect and quantify phenylurea hydrolase genes' (*puhA* and *puhB*) sequences from environmental DNA samples to assess diuron-degrading genetic potential in some soil and sediment microbial communities. In the soil communities, mineralization rates (determined with [ring-¹⁴C]-labeled diuron) were linked to diuron-degrading genetic potentials estimated from *puhB* number copies, which increased following repeated diuron treatments. In the sediment communities, mineralization potential did not depend solely on the quantity of *puhB* copies, underlining the need to assess gene expression. In the sediment samples, both *puhB* copy numbers and mineralization capacities were highly conditioned by whether or not diuron-treated soil was added. This points to transfers of degradative potential from soils to sediments. No *puhA* gene was detected in soil and sediment DNA extracts. Moreover, some sediments exhibited high diuron mineralization potential even though *puhB* genes were not detected, suggesting the existence of alternative diuron degradation pathways.

Keywords Biodegradation · Microbial communities · Mineralization · Pesticides · Phenylurea hydrolases · qPCR

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00253-012-4318-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

S. Pesce (✉)
Irstea, UR MALY,
3 bis quai Chauveau-CP 220,
69336 Lyon, France
e-mail: stephane.pesce@irstea.fr

J. Beguet · N. Rouard · M. Devers-Lamrani · F. Martin-Laurent
INRA, UMR 1347 Agroécologie,
17 rue Sully, B.P. 86510, 21065 Dijon Cedex, France

Introduction

Agriculture is a major source of diffuse contamination of surface waters by pesticides (Schwarzenbach et al. 2006). The phenylurea herbicide diuron (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea, Bayer CropScience), listed as a priority pollutant by the European Water Framework Directive (2000/60/EC), is one of the pesticides most frequently detected in freshwater ecosystems. Several recent studies have shown the presence of this herbicide in various rivers draining agricultural watersheds (e.g., Schuler and Rand 2008; Stork et al. 2008; Pesce et al. 2010a). Microbial degradation is considered to be a major driver of the natural attenuation of diuron in the environment (Khurana et al. 2009; Sharma and Suri 2011).

We know that natural soil and aquatic microbial communities can adapt to the degradation of diuron following prolonged exposure in both field and experimental systems (e.g., Dellamatrice and Monteiro 2004; Sørensen et al. 2003; Pesce et al. 2009, 2010b). Specific information on the potential of biodegradation can be obtained by examining functional genes encoding enzymes involved in degradation pathways (Bombach et al. 2010; Smith and Osborn 2009). One prerequisite for such an approach is knowledge of the degradation pathway and its underlying genetics. The only genetic characterizations of hydrolytic diuron-degrading enzymes published to date were performed by Tumbull et al. (2001) and by Khurana et al. (2009), who described two phenylurea hydrolase (*puh*) genes from *Arthrobacter globiformis* (*puhA* gene) and *Mycobacterium brisbanense* (*puhB* genes), respectively. These two genes share 79 % nucleotide identity and 83 % (382/461) amino acid identity being related to the metal-dependent hydrolase A subfamily (CD01299) of the amidohydrolase superfamily. Interestingly, both PuhA