HAL open science

Apports de la modélisation des interactions pour une compréhension fonctionnelle d'un écosystème. Application à des bactéries nitrifiantes en chemostat

Maxime Dumont

To cite this version:

Maxime Dumont. Apports de la modélisation des interactions pour une compréhension fonctionnelle d'un écosystème. Application à des bactéries nitrifiantes en chemostat. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Montpellier 2 (Sciences et Techniques), 2008. Français. NNT : . tel-02818077

HAL Id: tel-02818077

https://hal.inrae.fr/tel-02818077v1

Submitted on 6 Jun 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.

UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

T H E S E

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Section ***: Biotechnologie et Microbiologie***
Ecole Doctorale ***: Sciences des Procédés – Sciences des aliments***

présentée par

Maxime Dumont

APPORTS DE LA MODELISATION DES INTERACTIONS POUR UNE COMPREHENSION FONCTIONNELLE D'UN ECOSYSTEME,

APPLICATION A DES BACTERIES NITRIFIANTES EN CHEMOSTAT

soutenue le 18 décembre 2008

JURY

M. Philippe Lemenceau	directeur de recherche INRA, rapporteur
M. Jean-Christophe Poggiale	professeur UMR CNRS 6117, rapporteur
M. Jean-Jacques Godon	directeur de recherche INRA, directeur de thèse
M. Jérôme Harmand	chargé de recherche INRA, directeur de thèse
M. Antoine Sciandra	directeur de recherche UMR 7093, examinateur
Mme Tatiana Vallaeys	professeur UMR 5119 Ecolag, présidente du jury
M. Denis Dochain	professeur Université de Louvain, examinateur

UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

T H E S E

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Section ***: Biotechnologie et Microbiologie***
Ecole Doctorale ***: Sciences des Procédés – Sciences des aliments***

présentée par

Maxime Dumont

APPORTS DE LA MODELISATION DES INTERACTIONS POUR UNE COMPREHENSION FONCTIONNELLE D'UN ECOSYSTEME,

APPLICATION A DES BACTERIES NITRIFIANTES EN CHEMOSTAT

soutenue le 18 décembre 2008

JURY

M. Philippe Lemenceau	directeur de recherche INRA, rapporteur
M. Jean-Christophe Poggiale	professeur UMR CNRS 6117, rapporteur
M. Jean-Jacques Godon	directeur de recherche INRA, directeur de thèse
M. Jérôme Harmand	chargé de recherche INRA, directeur de thèse
M. Antoine Sciandra	directeur de recherche UMR 7093, examinateur
Mme Tatiana Vallaeys	professeur UMR 5119 Ecolag, présidente du jury
M. Denis Dochain	professeur Université de Louvain, examinateur

REMERCIEMENTS

Voilà !! Nous y sommes !... La thèse achevée, la soutenance effectuée… Une page se tourne, l'aventure narbonnaise touche à sa fin et avec elle les huit années d'études qui ont conduit à ce manuscrit…

Puisqu'on parle d'études, je voudrais tout d'abord remercier les profs (au sens large) qui m'ont tant apporté durant toutes ces années (non, non, cela n'a rien à voir avec le fait que je sois un fils de profs !!).

• Merci à cette prof de bio dont je ne connais ni le nom ni le prénom et que j'ai détesté durant de nombreuses semaines, voir de nombreux mois, pour m'avoir recalé d'un point au bac ! Sa clairvoyance m'étonnera toujours, sans elle cette thèse n'existerait pas.

• Merci à Bernard Calvez et à tous les profs de l'IUT Génie Biologique de Lyon pour leurs enseignements si passionnants même s'il est vrai que j'en ai raté quelques' un ! Quelle idée aussi de mettre des cours le vendredi matin alors que les soirées étudiantes sont le jeudi soir !!!...

• Merci à Jérôme Boissier, Olivier Vernaux, André Théron, Guillaume Mitta, Anne Rognon, Hélène Moné, Richard Galinier, Jean-François Allienne et Claude Combes du Centre de Biologie et d'Ecologie Tropicale et Méditerranéenne de Perpignan. Les deux stages de six mois passés à vos côtés ont été extraordinaires ! Je sais tout ce que je vous dois et vous en serais éternellement reconnaissant.

• Merci à Jean-Jacques Godon, Jérôme Harmand, Alain Rapaport, Claude Lobry, Patrice Loisel, Jean-Philippe Steyer, Jérôme Hamelin, Nicolas Bernet, Valérie Bru, Eric Latrille, Emmanuelle Zumstein, Eric Trably, Nathalie Wery et Frédéric Mazenc, pour toutes les connaissances que vous m'avez apporté durant ces trois années passées au Laboratoire des Biotechnologies de l'Environnement de Narbonne.

• Merci à Sylvie Farine, Nadine Le Thinh, Annie Vidal et Véronique Maugenet pour votre bonne humeur permanente et pour avoir su me guider à travers les méandres de l'administration !!

Toutes ces années n'auraient pas été si agréables et si enrichissantes sans les nombreux liens d'amitiés qui se sont noués au fil du temps.

• Merci aux Mâconnais : Marco, Matthieu, Paul, Yann… Depuis le collège, que de chemin parcouru !! Finalement, on ne s'en sort pas si mal pour les cancres qu'on était !!!...

• Merci à Aurélie et Yann pour les deux années passées à vos côtés… Je garderai éternellement en mémoire toutes nos virées lyonnaises ainsi que la magnifique rue Paul Ricard des Saintes Marie de la Mer !!...

• Merci à mes amis de la licence pro de Reims : Jérôme, Willy, Mama, Laure qui m'ont permis de garder le cœur au chaud malgré la froideur du nord ! Sans vous, il n'aurait pas été possible de tenir toute une année là-haut !!!...

• Merci aux trois mousquetaires du DEA de Parasitologie de Montpellier : Tit Math, Bertrand, Paulo pour toutes ces soirées passées à parler Ecologie et Evolution en y mêlant la politique bien évidement !! Merci également à Anne et Arthur pour votre douceur et votre gentillesse incomparable.

• Merci aux amis du LBE : Guérémite (vive l'anarchie !!), Matthieu M. (prends soin des belles affiches de notre bureau !!), Maialen (Aloha !!! Ce mot te va si bien !), Alexis (arrête le sport, c'est trop dangereux !!), Matthieu L. (Merci d'être là, somewhere in the world !! hein ?!!! Quoi ?!!!!), Bruno (vive rue89, les algues et les bactéries !!), Brunéo (courage l'ami !!!), Sarah (courage à toi aussi !!), Olivier Z. (prochain road trip au Chili mais toujours sur fond de Joe Dassin !!!), Olivier L.G. (à quand la Bretagne libre ?!!!), Romy-Alice et Seb (c'est fou !!! Avoir une ludothèque pareille et ne pas avoir fait un seul jeu en un an !!! D'un autre côté, boire et manger c'est bien aussi !!!), sans oublier l'inénarrable Magalou (continue d' « envoyer du lourd » !!!!) et le toujours fatigué Yannis (quand c'est que tu prends ta carte camarade ?!!!)…

• Un grand merci aux Camarades narbonnais qu'ils soient au PCF, au NPA, à la Ligue, au PG, à la CGT, à Sud, au Planning ou nul part… En particulier, un grand merci à Patric et Véro (nos longues discussions passionnantes vont me manquer et vive le calvados des copains !!), à Carmen et Jojo (il n'y a pas de mots suffisamment forts pour vous exprimer toute mon admiration), à Charles et Jeanine (on vous attend au Chili avec votre camping-car !), à Laurent (à quand un Luxembourg rouge ?!!), à Bastosse (tu as fais le bon choix…), à Roland (tes blagues continuent de résonner dans la salle de réunion !!), à Denise et Jean-Pierre (vous n'imaginez sans doute pas tout ce que vous m'avez apporté), à Luc et Manu (on se retrouvera rue Santa Fe ?!), à Marie-Pierre et Matthias (vive le Pays-Basque, les tites brebis et les olives !), à Jean-Louis (l'infatigable !), à Domi (hasta siempre !!), à Francis (« du passé faisons table rase » !...), à Alain V. (je suis sur que même à l'autre bout de la terre on entendra le son de ta voix au mégaphone !!), à Alain et Simone (la bonne humeur permanente, un rayon de soleil qui réchauffe

en toutes circonstances), à Christine et Yvan (merci pour les bouquins, les sourires, les clins d'œil), à Thierry (je compte sur toi pour convertir JJ et Jéjé !!!)… Je vous souhaite à tous tout plein de luttes victorieuses ! Unis par un maillage d'interactions positives, je ne doute pas que vous puissiez contribuer à faire émerger des propriétés nouvelles faites de Paix, de Solidarité, de Fraternité pour un monde meilleur !...

• Un grand merci à nos chers colocs du trois cour de la Pomme ! Gros bisous à toi Cathy, durant quelque temps ça sera dur de venir frapper à ta porte pour te piquer des œufs, de la farine, du lait, du sucre !!!... Mais gardes en sous la main car on n'a pas fini de t'en demander !!!! Merci pour tes sourires, ta complicité et ta joie de vivre… Je te souhaite tout le bonheur du monde, tu le mérite tant !... Gros bisous à toi Romain ! Tu es un mec bien, faut juste que tu descotches un peu de l'ordi !!! lol !! Allé, c'était juste pour t'embêter !!... Mes meilleures pensées de Gauche à Cloclo et à mon camarade banquier Doude (en fait, tu aurais du faire agriculteur en Bourgogne !!! Le bleu de travail t'irait si bien !!!!...). Un grand merci aussi à tous ceux qui sont venu à l'appart et qui ont marqué leur passage d'une petite création en fil de fer !!...

Le meilleur pour la fin !

Un immense merci à mes parents, Dominique et Jean-Pierre… Que dire sinon que je vous aime… Vous êtes extraordinaires !

Merci à ma frangine Alexandra, à Nico, Milo et Lilou dont le bonheur sert de phare au milieu du brouillard.

Merci à mon tit Ange, Coralie, pour tout ce que tu m'as apporté et continuera de m'apporter. La vie à tes côtés est un enchantement quotidien. Te quiero mi amor. Merci également à ta famille qui m'a si bien accueilli : Françoise pour toutes tes douces attentions, Loic, Julie et Marine (en vous souhaitant plein de bonnes choses en Guadeloupe), Philippe pour tous tes bons petits plats, Lilette et Pierre pour votre gentillesse, Jean-François pour toutes nos discussions politique…

Merci à tous !!!

Je vous laisse maintenant à la lecture de ce manuscrit sur ces belles paroles de Pierre Bourdieu :
« *Pour répondre aux défis qui nous font faces, il faut que chaque chercheur soit militant, chaque militant soit chercheur et que chaque citoyen soit militant* »

SOMMAIRE

Remerciements

Sommaire

Communications scientifiques liées à la thèse

Avant-propos

DE LA COMPLEXITE DU VIVANT ET DU FONCTIONNEMENT DES ECOSYSTEMES

I. DE LA COMPLEXITE DU VIVANT AU SEIN DES ECOSYSTEMES

I.1. Les écosystèmes et la science qui les étudie…….....…..…….21

I.1.1. La définition d'un écosystème

I.1.2. L'écologie, science des écosystèmes

I.2. La biodiversité et les interactions : la complexité du vivant…….....…..….....….25

I.2.1. La notion de diversité du vivant

I.2.2. La richesse spécifique

I.2.3. Les indices de diversité

I.2.3.1. L'indice de diversité de Shannon-Weaver

I.2.3.2. L'indice de diversité de Simpson

I.2.3.3. L'indice de diversité de Hill

I.2.4. Le lien entre la diversité et les interactions du vivant

I.3. La diversité des interactions du vivant……....…….....……29

I.3.1. La description phénoménologique des interactions

I.3.2. La description mécaniste des interactions

I.3.3. Les réseaux trophiques

I.3.3.1. La description des réseaux trophiques

I.3.3.2. Le flux de matière et d'énergie au sein des réseaux trophiques

I.4. Les théories sur la complexité du vivant….....32

I.4.1. Les prémices d'une théorie globale

I.4.2. La théorie darwinienne

I.4.3. La double interprétation de la théorie darwinienne

I.4.3.1. La coopération comme moteur de l'évolution des espèces

I.4.3.2. La compétition comme moteur de l'évolution des espèces

I.4.4. Et demain, quelle théorie de la complexité du vivant ?

II. DE LA MODELISATION DE LA COMPLEXITE DU VIVANT

II.1. Les différentes approches de la modélisation en écologie.....39

II.1.1. L'approche stochastique de la modélisation du vivant

II.1.2. L'approche déterministe de la modélisation du vivant

II.1.2.1. La définition du déterminisme

II.1.2.2. Les équations différentielles, outils de la modélisation déterministe

II.2. Les modèles déterministes historiques en écologie.....43

II.2.1. Le modèle malthusien ou de croissance exponentielle d'une espèce

II.2.2. Le modèle logistique ou de croissance bornée d'une espèce

II.2.2.1. La présentation du modèle logistique

II.2.2.2. La stratégie « r » et la stratégie « k »

II.2.2.3. Le chaos déterministe

II.2.3. Le modèle de Lotka-Volterra ou modèle proie-prédateur

II.2.3.1. L'historique du modèle de Lotka-Volterra

II.2.3.2. Les hypothèses du modèle de Lotka-Volterra

II.2.3.3. La description du modèle de Lotka-Volterra

II.2.4. Le modèle de Lotka-Volterra comme modèle de compétition

II.2.4.1. La présentation du modèle

II.2.4.2. Le principe d'exclusion compétitive

II.2.4.3. Le concept de niche écologique

III. DU FONCTIONNEMENT DES ECOSYSTEMES

III.1. La complexité du vivant et les fonctions des écosystèmes.....57

III.1.1. La notion de fonctions des écosystèmes

III.1.2. L'étude de la productivité des écosystèmes

III.1.2.1. L'approche expérimentale

III.1.2.2. L'approche théorique

III.1.2.3. Une synthèse des études expérimentales et théoriques

III.2. La complexité du vivant et la stabilité des écosystèmes.....64

III.2.1. La notion de stabilité des écosystèmes

III.2.2. L'étude de la stabilité des écosystèmes

III.2.2.1. L'approche expérimentale

III.2.2.2. L'approche théorique

III.2.2.3. Une synthèse des études expérimentales et théoriques

III.3. Les limites des approches expérimentales et théoriques.....70

III.3.1. Les limites de l'approche expérimentale classique en écologie

III.3.2. Les limites de l'approche théorique

DE L'INTERET DU MONDE MICROBIEN POUR LA COMPREHENSION DES ECOSYSTEMES COMPLEXES

IV. DU MONDE MICROBIEN ET DES OUTILS D'ANALYSE DE SA DIVERSITE

IV.1. A la découverte du monde microbien.....75

IV.1.1. La naissance de l'écologie microbienne

IV.1.2. La diversité du monde microbien

IV.1.2.1. La présentation générale de la diversité du monde microbien

IV.1.2.2. La diversité des organismes procaryotes

IV.1.3. La formidable odyssée du monde microbien

IV.2. Les outils d'analyse de la diversité du monde microbien.....82

IV.2.1. Les outils d'analyse classique de la diversité microbienne

IV.2.2. Les outils d'analyse moléculaire de la diversité microbienne

IV.2.2.1. L'amplification de l'ADN

IV.2.2.2. L'analyse de l'ADN ribosomique

IV.2.2.3. Les techniques d'empreintes moléculaires

IV.2.2.3.1. Les gels d'électrophorèse à gradient de dénaturation

IV.2.2.3.2. L'analyse de polymorphisme de conformation secondaire

IV.2.2.3.3. L'analyse de fragments de restriction terminaux

V. DU MONDE MICROBIEN COMME MODELE D'ETUDE EN ECOLOGIE

V.1. La pertinence du monde microbien en écologie.....93

V.2. Les réacteurs biologiques, des microcosmes sous contrôle.....94

V.2.1. Le principe des réacteurs biologiques

V.2.2. Le fonctionnement des réacteurs biologiques

V.2.2.1. Le fonctionnement discontinu des réacteurs biologiques

V.2.2.2. Le fonctionnement semi-continu des réacteurs biologiques

V.2.2.3. Le fonctionnement continu des réacteurs biologiques

V.3. La modélisation des systèmes microbiens en chémostat.....96

V.3.1. L'importance du schéma réactionnel et du bilan de matière

V.3.2. La modélisation d'une population microbienne dans un chemostat

V.3.2.1. La présentation du modèle proposé par Monod

V.3.2.2. Les fonctions de croissance des microorganismes

V.3.2.3. L'analyse du modèle proposé par Monod

V.3.3. La modélisation de plusieurs populations microbiennes dans un chémostat

DE L'ETUDE D'UN ECOSYSTEME MICROBIEN COMPLEXE : DES BACTERIES NITRIFIANTES EN CHEMOSTAT

VI. DE LA MISE EN PLACE ET DU SUIVI DE BACTERIES NITRIFIANTES EN CHEMOSTAT

VI.1. La nitrification et les bactéries nitrifiantes.....107
VI.1.1. La nitrification
VI.1.2. Les bactéries nitrifiantes
VI.1.2.1. Les bactéries nitrifiantes lithotrophes
VI.1.2.1.1. La taxonomie des bactéries nitrifiantes lithotrophes
VI.1.2.1.2. Le métabolisme des bactéries nitrifiantes lithotrophes
VI.1.2.2. Les bactéries nitrifiantes hétérotrophes
VI.1.3. Les facteurs influant le processus de nitrification
VI.1.3.1. Le taux d'oxygène dissous
VI.1.3.2. Le pH
VI.1.3.3. La température
VI.2. La mise en place de chémostats nitrifiants.....112
VI.2.1. Les caractéristiques physiques des chémostats nitrifiants
VI.2.2. Le milieu de culture des chémostats nitrifiants
VI.2.3. Le choix du temps de séjour hydraulique
VI.2.4. L'inoculation des chémostats nitrifiants
VI.3. Le suivi fonctionnel et populationnel des chémostats nitrifiants.....115
VI.3.1. Le suivi fonctionnel des chémostats nitrifiants
VI.3.2. Le suivi populationnel des chémostats nitrifiants
VI.3.2.1. La quantification de la biomasse totale des chémostats
VI.3.2.2. La détermination des phylotypes composant la biomasse totale
VI.3.2.2.1. La méthode de prélèvement et de conservation des échantillons
VI.3.2.2.2. La méthode d'extraction des ADN totaux
VI.3.2.2.3. L'amplification de la région V3 de l'ADNr 16S
VI.3.2.2.4. La discrimination par SSCP des brins d'ADN amplifiés
VI.4. La perturbation des chémostats nitrifiants.....119
VI.4.1. Les perturbations abiotiques des chémostats nitrifiants
VI.4.2. Les perturbations biotiques des chémostats nitrifiants
VI.4.2.1. La perturbation biotique globale des chémostats nitrifiants
VI.4.2.2. La perturbation biotique ciblée des chémostats nitrifiants

VII. DE LA DETERMINATION DU ROLE FONCTIONNEL DES DIFFERENTES ESPECES PRESENTES DANS UN ECOSYSTEME MICROBIEN COMPLEXE

VII.1. Résumé de la problématique et de l'approche mise en œuvre.....123

VII.2. Toward functional molecular fingerprints.....125

VIII. DE LA MODELISATION DU MAILLAGE D'INTERACTIONS ENTRE LES ESPECES PRESENTES DANS UN ECOSYSTEM MICROBIEN COMPLEXE

VIII.1. Résumé de la problématique et de l'approche mise en œuvre.....143

VIII.2. Coexistence in a nitrifying chemostat: a model of microbial interaction…..…...145

IX. DE L'INFLUENCE DE PERTURBATIONS BIOTIQUES SUR LA DIVERSITE ET LE FONCTIONNEMENT DE BACTERIES NITRIFIANTES EN CHEMOSTAT

IX.1.L'influence de la perturbation biotique globale.....161

XIX.1.1. L'influence populationnelle de la perturbation biotique globale

XIX.1.2. L'influence fonctionnelle de la perturbation biotique globale

IX.2.L'influence de la perturbation biotique ciblée.....163

IX.2.1. L'influence populationnelle de la perturbation biotique globale

IX.2.2. L'influence fonctionnelle de la perturbation biotique globale

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

X.1. Le potentiel des chémostats en écologie microbienne 169

X.2. La difficulté de la modélisation des systèmes microbiens 170

X.2.1. La question du chaos déterministe

X.2.2. La question de la neutralité

X.2.3. La question du niveau d'intégration de la diversité biologique dans les modèles mathématiques

X.2.3.1. Le niveau de diversité spécifique

X.2.3.2. Le niveau de diversité métabolique

X.3. La pertinence des approches transdisciplinaires.....178

Références bibliographiques

Liste des figures

Liste des tables

Annexes

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES LIÉES À LA THÈSE

ARTICLES

Dumont M., Godon J.J., Rapaport A., Benyahia B., Harmand J. (2008)

New observers for microbial ecology, How including molecular data into bioprocess modeling.
Proceeding of the 16th Mediterranean conference on control and automotion.

Dumont M., Harmand J., Godon J.J. (sous presse)

Toward functional molecular fingerprint.
Environmental microbiology.

Dumont M., Harmand J., Godon J.J. (en préparation)

Coexistence in nitrifying chemostat: a model of microbial interactions.

CONFERENCES

Dumont M., Godon J.J., Harmand J. (2007)

De la modélisation des écosystèmes microbiens, entre hypothèses simples et réalité complexe : l'interface des fingerprints.
5ième congrès de l'Association Française d'Ecologie Microbienne, La Grande Motte, France.

Dumont M., Godon J.J., Harmand J. (2008)

How automatic control may help to investigate ecological questions.
International Symposium on Biotechnology, Sfax, Tunisie.

Dumont M., Godon J.J., Rapaport A., Benyahia B., Harmand J. (2008)

New observers for microbial ecology: How including molecular data into bioprocess modeling.
16th Mediterranean conference on control and automotion, Ajaccio, France.

POSTERS

Dumont M., Harmand J., Godon J.J. (2008)

Functional assignation of molecular species in a complex microbial ecosystem using mathematical tools and molecular fingerprints.
12th congress of International Society of Microbial Ecology, Cairns, Australia.

Hamelin J., Dumont M., Harmand J., Godon J.J., Haegeman B. (2008)

Microbial diversity and the neutral chemostat
12th congress of International Society of Microbial Ecology, Cairns, Australia.

Harmand J., Rapaport A., Dumont M., Dochain D., Godon J.J. (2008)

How taking into account biodiversity into anaerobic digestion models ?
9th Latin-American worshop and Symposium on anaerobic digestion, Easter Island, Chile.

AVANT-PROPOS

Les travaux développés dans cette thèse ont été menés au sein du Laboratoire des Biotechnologies de l'Environnement de Narbonne[1] (11) et ont fait l'objet d'une approche transdisciplinaire faisant intervenir l'écologie microbienne, le génie des procédés, l'automatisme et la modélisation mathématique. La convergence de ces différents champs disciplinaires a été rendue possible par une collaboration étroite avec différents chercheurs issus de ces domaines, le soutien de trois départements de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) : MICA (MIcrobiologie et Chaînes Alimentaires), MIA (Mathématiques et informatique Appliquées) et EA (Environnement et Agronomie) ainsi que le soutien de l'Institut National de Recherche en Informatique et en Automatique (INRIA) à travers le projet MERE (Modélisation Et Ressource en Eau). Ces acteurs ont pu être réunis par la conviction commune de l'importance de l'étude du monde microbien dans le développement humain (par son implication dans les systèmes de dépollution et de production alternative d'énergie notamment) ainsi que sa pertinence comme modèle biologique pour répondre à des questions d'écologie générale.

Au cours de ce manuscrit, rédigé avec le souci d'être compréhensible par l'ensemble des spécialistes de chaque discipline, nous synthétiserons dans une première partie les connaissances relatives à l'écologie générale : sa définition et ses principes suivant le contexte historique, les grandes interrogations qui préoccupent les écologues et comment ils tentent d'y répondre. Nous montrerons les limites des travaux classiquement réalisés en écologie sur des macroécosystèmes et la nécessité d'étudier d'autres types d'écosystèmes. Dans une seconde partie, nous soulignerons l'intérêt du monde microbien comme modèle biologique pour la compréhension des écosystèmes complexes. Nous aborderons également les difficultés rencontrées limitant grandement l'utilisation des microorganismes en écologie générale. Dans une troisième partie, nous présenterons le travail effectué durant la thèse visant à dépasser ces difficultés par une approche transdisciplinaire du suivi fonctionnel et populationnel de bactéries nitrifiantes en chémostat. Nous proposerons une méthode générique de détermination du rôle fonctionnel de différentes « espèces » assemblées dans un écosystème donné. Nous proposerons également un modèle d'interactions pouvant s'établir entre ces différentes « espèces ». Enfin, nous discuterons de quelques résultats complémentaires relatifs à l'influence de perturbations biotiques sur la résistance et la résilience des systèmes que nous avons étudiés avant de proposer des perspectives et de conclure.

En vous souhaitant une bonne lecture.

[1] Site internet du LBE : http://www.montpellier.inra.fr/narbonne/

De la complexité du vivant et du fonctionnement des écosystèmes

Où il sera question :

- *De la complexité du vivant au sein des écosystèmes*
- *De la modélisation de la complexité du vivant*
- *Du fonctionnement des écosystèmes*

I. DE LA COMPLEXITÉ DU VIVANT AU SEIN DES ÉCOSYSTÈMES

« L'écologie est une science générale, qui ne s'enferme pas dans un domaine donné mais traite des rapports entres sciences particulières et tente de synthétiser leurs résultats. Ainsi, l'écologie n'est pas une discipline scientifique de plus mais une science de convergence des autres sciences »

J. H. Woodger.

I.1. Les écosystèmes et la science qui les étudie

I.1.1. La définition d'un écosystème

Un écosystème est « une unité écologique formée d'un biotope correspondant à l'ensemble des paramètres abiotiques (ou physico-chimiques) et d'une biocénose correspondant à l'ensemble des organismes y vivant » (Frontier, Pichod-Viale et al. 2004). Ces deux ensembles, qui constituent chaque écosystème, entretiennent de nombreux types d'interactions différentes (Fig. 1).

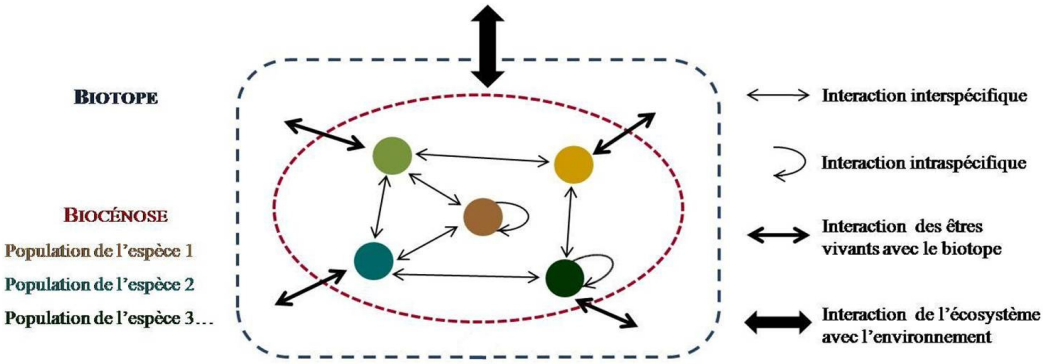


Figure 1 : Schéma représentant les interactions s'établissant dans un écosystème donné.

Ainsi, un écosystème inclut :

- Le biotope, facteurs physico-chimiques du milieu (structure physique, température, intensité lumineuse, humidité, teneur en éléments chimiques…).
- La biocénose, ensemble des êtres vivants.
- Les relations entre les êtres vivants (interactions inter et intraspécifiques).
- Les relations entre les êtres vivants et leur biotope.
- Les relations entre la biocénose, le biotope et l'environnement.

L'agencement plus ou moins complexe de ces interactions crée un ensemble qui présente les caractéristiques d'une entité nouvelle manifestant des propriétés émergentes par rapport à celles des éléments qui la composent, d'où l'aphorisme bien connu : « Le tout est supérieur à la somme des parties ». L'ensemble ainsi constitué agit, en retour, sur les propriétés, le fonctionnement et

l'évolution des éléments qui le composent. En d'autres termes, les propriétés qui émanent d'un élément ne sont pas les mêmes selon que cet élément est isolé (à supposer qu'il puisse être isolé ce qui n'est bien souvent pas le cas) ou lorsqu'il est inclus dans un système plus ou moins complexe. Chaque élément pouvant être considéré comme un sous-système, il s'ensuit que chaque système est doublement piloté : par l'action des sous-systèmes qui le composent et par le système plus vaste dans lequel il s'insère.

De plus, les écosystèmes:

- Sont des systèmes ouverts et dissipatifs, c'est-à-dire ayant des échanges d'énergie et de matière avec leur environnement.
- Sont composés d'un très grand nombre d'éléments différents.
- Sont fondés sur de très grands nombres d'interactions montrant des délais de réponses divers, et réalisant de fréquentes boucles rétroactives.
- Présentent une hétérogénéité spatio-temporelle importante à toutes les échelles.
- Ont une histoire et une évolution non réversible.
- Présentent une succession de niveaux d'organisations hiérarchisés (ou niveaux d'intégration).
- Sont caractérisés par des propriétés émergentes.

Ainsi, les écosystèmes apparaissent comme des systèmes complexes difficiles à aborder (Frontier, Pichod-Viale et al. 2004). L'Ecologie, science des écosystèmes, tente d'en améliorer la compréhension.

I.1.2. L'écologie, science des écosystèmes

L'Ecologie est une discipline extrêmement récente. Signifiant étymologiquement « Science de l'habitat » (de « oïkos » : habitat et « logos » : science), elle n'a, en effet, été élevée au rang de discipline académique que vers la fin du XIXième siècle. Ceci fut possible grâce à une prise de conscience du fait que les organismes vivants et les populations ne sont pas gouvernés par le hasard mais, au contraire, organisés de façon à former des « communautés » ou « associations » dont la structure et la fonction ne peuvent être comprises en en examinant séparément les parties. Victor Shelford (1877-1968), grand pionnier de l'Ecologie aux Etats-Unis, l'a définie alors assez logiquement comme « la science des communautés » (Shelford and Clements 1939). Attention cependant, ne nous y trompons pas, Shelford ne parlait pas de l'étude des différentes communautés mais de l'étude de l'ensemble des communautés. En effet, les premiers écologues étaient fortement marqués par une vision holistique (i.e. très générale, globale) de leur discipline. La Terre étant un habitat, l'Ecologie est la science de la Terre et de tous ses habitants. Il s'agit donc pour eux d'une « superscience », d'une science unificatrice, d'une science de synthèse

essentielle à la compréhension de la structure et du fonctionnement de la biosphère. Ils considéraient, en effet, que ni l'écosphère ni aucun de ses processus constitutifs ne pouvait être expliqué par aucune des disciplines indépendantes en lesquelles le savoir moderne s'était divisé. Alfred North Whitehead (1861-1947) refusait même d'admettre qu'une barrière fondamentale puisse séparer la physique de la biologie, selon lui : « la physique est l'étude des petits organismes, la biologie celle des grands organismes et l'Ecologie est l'étude de tout les organismes » (Whitehead 1922). Plus encore, les premiers écologues voyaient l'ensemble des communautés comme un organisme à part entière constitué de différentes entités agissant de concert à l'instar des différentes cellules, flore bactérienne et autres qui constituent un être vivant. Il s'agit là du premier paradigme de l'Ecologie auquel sont rattachés trois grands principes :

- Le tout est supérieur à la somme des parties.
- La Nature est en équilibre constant.
- La diversité est source de stabilité.

Cette vision holistique des premiers écologues fut, par la suite, dédaignée au profit d'une vision réductionniste où il s'agit alors d'étudier séparément les différents éléments qui composent les systèmes. Deux considérations principales peuvent être vues comme à l'origine de ce revirement conceptuel.

La première considération porte sur un aspect que l'on pourrait qualifier de philosophique et qui concerne la place de l'Homme dans le système. Concernant les tenants de la vision holistique, Richard Saint Barbe-Baker (1889-1943) résume assez bien la pensée générale des pionniers de l'écologie de la manière suivante : « Presque partout dans le monde, en méconnaissant les lois de la nature, l'Homme a travaillé à sa propre perte. Dans son orgueil, il s'est livré à toutes sortes d'actes de violence partout sur la scène terrestre, <u>oubliant qu'il n'était qu'un des acteurs</u> destinés à jouer un rôle dans l'harmonie et l'unité avec tous les autres êtres vivants ». Or il convient de garder à l'esprit que la fin du XIXième et le début du XXième siècle sont marqués par des effervescences idéologiques extrêmement fortes et opposées notamment en France. La lutte des classes vit alors, sans aucun doute, ses heures les plus féroces (répression sanglante de la Commune de Paris, massacres de Fourmille, Narbonne, Carmaux...). L'Ecologie et les écologues vont, dans ce contexte, concentrer sur eux les conceptions inconciliables qui s'affrontent alors dans la société : laïcité versus religion, capitalisme versus socialisme. En effet, proclamer que l'Homme n'est « qu'un des acteurs » parmi tant d'autres ne va pas sans conséquences !... Cela est totalement opposé aux dogmes religieux qui proclament : « Faisons l'Homme à notre image, selon notre ressemblance, et qu'il <u>domine</u> sur les poissons de la mer, sur les oiseaux du ciel, sur le bétail, sur toute la terre, et sur tous les reptiles qui rampent sur la

terre »… L'affrontement idéologique qui en résulta fut d'une certaine manière comparable à celui qui opposa, en son temps, les tenants du géocentrisme aux tenants de l'héliocentrisme après les travaux effectués par Copernic (1473-1543). L'horreur et le barbarisme des guerres mondiales du XXième siècle porteront, de plus, un rude coup à la vision d'harmonie et d'unité entre les êtres vivants au profit de la vision de domination.

La seconde considération pouvant expliquer le revirement de la conception holistique vers la conception réductionniste en Ecologie concerne l'amélioration des moyens d'analyse du vivant. En effet, l'essor de la génétique à partir des années 1930 engendra un intérêt grandissant envers les génomes des organismes vivants et, parallèlement, diminua l'importance des études relatives à leurs traits de vie ou aux interactions qu'ils établissent entre eux. C'est notamment à partir de cette période que s'achève l'épopée des grands naturalistes. De plus, le développement des outils d'analyses moléculaires à partir des années 1970-1980 conduisit à une course au séquençage de l'ADN des êtres vivants. La grande majorité des études s'intéressaient alors (et continuent de s'intéresser) plus particulièrement à quelques gènes pouvant être exploités par l'Homme, que se soit au niveau agricole ou médical, plutôt que d'essayer de comprendre le fonctionnement global de la biosphère.

Néanmoins, depuis la fin du XXième siècle, un retour sur le devant de la scène de la conception holistique s'amorce. Ainsi, l'hypothèse Gaïa développée par James Lovelock à partir des années 1980 et qui suggère que la planète réagit comme un organisme à part entière (reprenant le point de vue des premiers écologues) est aujourd'hui largement reconnue dans le domaine scientifique après avoir été ardemment critiquée (Lovelock 1979). Ce retour à la conception holistique peut s'expliquer par le fait que la communauté scientifique ressent de plus en plus la nécessité d'une méta-analyse des énormes quantités de données générées par le développement des outils d'analyse et qu'ainsi une cohérence leur soit donnée. De plus, la vision réductionniste a conduit à une déconnection de la société humaine moderne de son environnement se traduisant aujourd'hui par une pression anthropique (i.e. d'origine humaine) sans précédent sur l'ensemble des écosystèmes. Cette pression a notamment pour conséquence un dérèglement climatique brutal menaçant de modifier gravement l'ensemble des cycles biogéochimiques et par là-même les équilibres écologiques. Le caractère généralisé de ce changement nécessite une vision holistique pour mettre en place des moyens de lutte efficaces contre les causes de ces modifications climatiques. Aussi, ce défi majeur que l'humanité a à relever permettra-t-il à l'Homme de trouver sa place dans la biosphère et d'entretenir des interactions avec tous les autres êtres vivants dans l'harmonie et l'unité ?!... Encore faut-il pour ce faire avoir les connaissances nécessaires à la compréhension de la complexité du vivant et du fonctionnement des écosystèmes

car : « comprendre les principes de l'Ecologie est essentiel pour comprendre la condition humaine » (Margulis and Sagan 2002).

I.2. La biodiversité et les interactions : la complexité du vivant

I.2.1. La notion de diversité du vivant

Selon la Convention[2] sur la diversité biologique qui s'est tenue du 3 au 14 juin 1992 à Rio de Janeiro lors de la conférence des Nations Unies sur l'environnement et le développement regroupant 157 pays signataires, la diversité biologique correspond à : « la variabilité des organismes vivants de toute origine y compris, entre autres, les écosystèmes terrestres, marins et autres écosystèmes aquatiques et les complexes écologiques dont ils font partie; cela comprend la diversité au sein des espèces et entre espèces ainsi que celle des écosystèmes. »

La diversité est en générale subdivisée en trois niveaux :

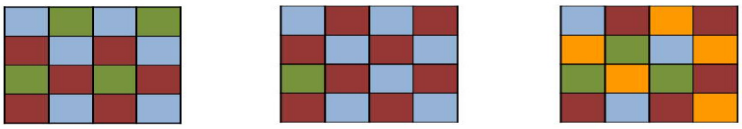
- La diversité génétique qui se définit par la variabilité des gènes au sein d'une même espèce ou d'une population. On parle aussi de diversité intraspécifique qui se caractérise par la différence de deux individus d'une même espèce ou sous-espèce.
- La diversité spécifique, appelée aussi diversité interspécifique qui correspond à la diversité des espèces. Ce niveau est le plus couramment utilisé par les écologues.
- La diversité écosystèmique, qui correspond à la diversité des écosystèmes présents sur Terre, des interactions des populations naturelles et de leur environnement physique.

Ces trois niveaux de diversité sont reliés entre eux, mais sont suffisamment distincts pour que chacun puisse être étudié en soi. Il ne peut donc y avoir une mesure unique et objective de la diversité, mais uniquement des mesures relatives à des tendances ou objectifs précis d'utilisation ou d'application. La plupart des études s'intéressent plus particulièrement à la diversité spécifique car elle constitue le palier le plus abordable tant au niveau conceptuel que pratique. Néanmoins, celle-ci peut également être étudiée selon différentes considérations du fait que la diversité biologique présente au moins deux dimensions dans un environnement donné : la composition représentant le nombre d'espèces présentes et la structure représentant l'organisation des espèces présentes en termes de nombre d'individus. Cette différenciation conduit à l'existence de différents outils de mesure de la diversité spécifique.

I.2.2. La richesse spécifique

Une première mesure de la diversité spécifique consiste en l'étude de sa richesse, notée « r ». Elle désigne le nombre total d'espèces qui coexistent dans un espace considéré (Fig. 2).

[2] Le texte intégral de la convention est disponible sur internet à l'adresse : http://www.cbd.int/doc/legal/cbd-fr.pdf



r = 3 r = 3 r = 4

Figure 2 : Valeurs de la richesse spécifique correspondant au nombre d'espèces coexistant dans un espace considéré. Les individus sont représentés ici par des carrés et les espèces par des couleurs, l'ensemble de chaque damier constituant le peuplement considéré.

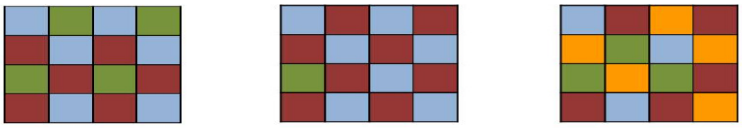
Cette première approche dépend de la taille des échantillons et de la surface échantillonnée et ne considère pas l'abondance relative des différentes espèces. Ainsi, une forte richesse résulte d'une accumulation d'espèces par habitat et d'une grande spécialisation de celles-ci. Généralement, dans de tels écosystèmes, chaque espèce utilise peu d'habitat ce qui se traduit par des abondances faibles en termes d'effectif populationnel de chaque espèce (Mac Arthur 1967).

I.2.3. Les indices de diversité

Une autre approche de la diversité consiste à tenir compte à la fois du nombre d'espèces présentes et de l'abondance de celles-ci. Il existe plusieurs indices mathématiques, qui constituent à proprement parler les indices de la diversité spécifique, fournissant des informations relatives à cette double considération de la richesse spécifique et de l'abondance.

I.2.3.1. L'indice de diversité de Shannon-Weaver

L'indice de diversité de Shannon-Weaver est défini par : $H' = -\sum_{i=1}^{S}\left[\frac{N_i}{N} \times log_2\left(\frac{N_i}{N}\right)\right]$ où N_i correspond au nombre d'individus d'une espèce donnée, i allant de 1 à S (nombre total d'espèces) et N au nombre total d'individus (Shannon and Weaver 1962) (Fig. 3).



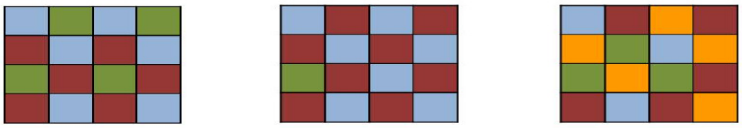
H' = 1,56 H' = 1,27 H' = 1,95

Figure 3 : Valeurs de l'indice de Shannon-Weaver pour différents types de peuplement. Les individus sont représentés ici par des carrés et les espèces par des couleurs, l'ensemble de chaque damier constituant le peuplement considéré.

L'indice de Shannon-Weaver est donc minimal (H'=0) quand tous les individus du peuplement appartiennent à une seule et même espèce. Il est également minimal si, dans un peuplement, chaque espèce est représentée par un seul individu, excepté une espèce qui compte l'ensemble des autres individus du peuplement. A l'inverse, l'indice est maximal quand tous les individus sont répartis de façon équivalente entre toutes les espèces présentes (Frontier, Pichod-Viale et al. 2004).

I.2.3.2. L'indice de diversité de Simpson

L'indice de Simpson mesure la probabilité que deux individus sélectionnés au hasard appartiennent à la même espèce (Simpson 1949). Il est défini par : $D = \sum_{i=1}^{S} \frac{N_i(N_i-1)}{N(N-1)}$ où N_i correspond au nombre d'individus d'une espèce donnée, i allant de 1 à S (nombre total d'espèces) et N au nombre total d'individus (Fig. 4).



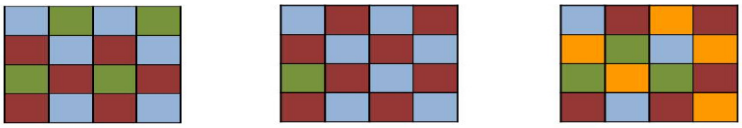
S = 0,70 S = 0,59 S = 0,78

Figure 4 : Valeurs de l'indice de diversité de Simpson (i.e. égale à 1-D) pour différents types de peuplement. Les individus sont représentés ici par des carrés et les espèces par des couleurs, l'ensemble de chaque damier constituant le peuplement considéré.

Cet indice a une valeur nulle pour indiquer le maximum de diversité (i.e. lorsque la probabilité est faible que deux individus tirés au hasard appartiennent à la même espèce) et une valeur de 1 pour indiquer le minimum de diversité (i.e. lorsque la probabilité est forte que tous les individus appartiennent à la même espèce). En pratique, dans le but d'obtenir des valeurs « plus intuitives », l'indice de diversité de Simpson, noté S, déterminé par 1-D est très généralement préféré à l'indice de Simpson, D. Ainsi, le maximum de diversité est représenté par la valeur 1 et le minimum de diversité par la valeur nulle. Il est important de noter également que cet indice donne plus de poids aux espèces abondantes qu'aux espèces rares. En effet, le fait d'ajouter des espèces rares au peuplement considéré ne modifie pratiquement pas la valeur de l'indice de diversité.

I.2.3.3. L'indice de diversité de Hill

L'indice de diversité de Hill, noté H, permet d'obtenir une mesure de l'abondance proportionnelle liant les indices de Shannon-Weaver et de Simpson. En effet, l'indice de Hill est défini par : $H = \frac{1/D}{e^{H'}}$ (Fig. 5)



H = 0,70 H = 0,68 H = 0,64

Figure 5 : Valeurs de l'indice de diversité de Hill pour différents types de peuplement. Les individus sont représentés ici par des carrés et les espèces par des couleurs, l'ensemble de chaque damier constituant le peuplement considéré.

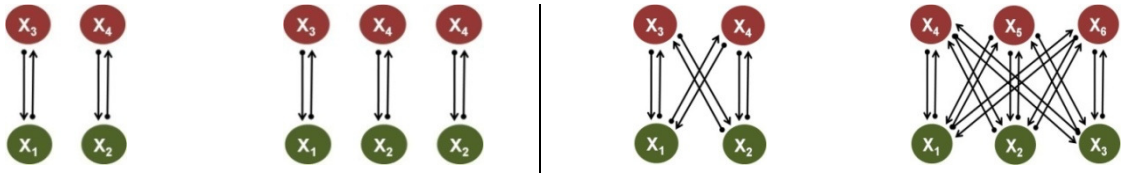
Ainsi, l'indice de Hill donne une vue encore plus précise de la diversité d'un peuplement donné. La composante 1/D va permettre de tenir compte des espèces présentant des abondances en individus élevées tandis que la composante $e^{H'}$ va permettre de tenir compte des espèces rares.

Selon sa formulation, plus l'indice de Hill est proche de 1 et plus la diversité sera faible. De la même manière que pour l'indice de Simpson, l'indice 1-H est préféré pour une lecture plus « intuitive » des valeurs fournies.

I.2.4. Le lien entre la diversité et les interactions du vivant

Si la diversité du vivant tient compte du nombre d'espèces présentes et de l'abondance de chacune d'elles dans un environnement donné, un autre facteur de la complexité du vivant consiste à prendre en compte le nombre d'interactions qu'entretiennent les individus entre eux ou connectance (ou connectivité). La connectance, notée « c », est définie comme le rapport entre le nombre de liaisons existant effectivement entre les organismes et le nombre total de liaisons possibles (Frontier, Pichod-Viale et al. 2004). Si n espèces coexistent dans un environnement donné, il y a $n(n\text{-}1)/2$ couples possibles ou $n(n\text{-}1)$ interactions possibles si le sens des interactions est distingué (i.e. si l'interaction de l'espèce ou de l'individu A sur B est différent de l'interaction de l'espèce ou de l'individu B sur A) et la connectance est alors le rapport du nombre d'interactions effectives sur ce total.

La relation entre diversité spécifique et connectance dans les réseaux trophiques peut être abordée selon deux hypothèses (Fig. 6).



L = 1	L = 1	L = 2	L = 3
$c = \frac{4}{12} = \frac{1}{3}$	$c = \frac{6}{30} = \frac{1}{5}$	$c = \frac{8}{12} = \frac{2}{3}$	$c = \frac{18}{30} = \frac{3}{5}$

Figure 6 : Relation entre la diversité (en termes de nombre d'espèces) et la connectance selon deux modalités d'interactions : spécifiques (figures de gauche où chaque espèce entretient une relation particulière avec une autre espèce) ou généralistes (figures de droite où chaque espèce entretient des relations avec plusieurs autres espèces). Le nombre d'interactions par espèce est désigné par « L », la connectance au niveau de la communauté par « c ».

Une première hypothèse suggère que le nombre de liens par espèce, noté « L », est constant et donc que la connectance diminue de manière hyperbolique quand la richesse spécifique augmente (Cohen, Briand et al. 1990; Martinez 1992). Selon une deuxième hypothèse, la connectance est constante lorsque la richesse spécifique varie, et le nombre de liens par espèce augmente donc linéairement avec la richesse spécifique (Martinez 1992). Enfin, d'autres études prédisent une variation du nombre de liens par espèce, hypothèse intermédiaire entre les deux précédentes (Havens 1992; Martinez 1994).

Il est vraisemblable que la relation entre richesse spécifique et connectance dans un réseau trophique dépend du niveau de richesse spécifique. La forme de la relation peut également dépendre du degré de généralisme des prédateurs : en présence de prédateurs plutôt spécialistes, le nombre de liens par espèce a tendance à rester invariant, tandis qu'en présence de prédateurs plus généralistes le nombre de liens par espèce a tendance à augmenter avec le nombre.

Si le nombre d'interactions participe, avec la diversité, à la complexité du vivant, la diversité des interactions qui peuvent s'établir entre organismes vivants y contribue aussi grandement.

I.3. La diversité des interactions du vivant

Une interaction biologique (ou biotique) désigne un processus impliquant des échanges ou relations réciproques entre deux ou plusieurs éléments (espèces, groupes, biocénoses) dans un écosystème. Les interactions constituent un ensemble complexe de phénomènes biologiques hétérogènes dont la classification s'est avérée nécessaire. Si une interaction biologique a lieu entre deux individus ou populations issus d'espèces différentes alors l'interaction sera qualifiée d'interspécifique. Si une interaction concerne deux individus ou plusieurs individus d'une même population alors elle sera qualifiée d'intraspécifique. Les effets des interactions sur des individus ou sur des populations ont pu être étudiés bien avant que leurs mécanismes ne soient expliqués. C'est pourquoi, historiquement, les interactions ont été caractérisées par leurs effets apparents (description phénoménologique) avant qu'elles ne le soient en fonction du mécanisme biologique impliqué (description mécaniste).

I.3.1. La description phénoménologique des interactions

En 1953, Odum proposa une description phénoménologique des interactions considérant que chaque individu ou population peut avoir un effet positif (facilitation, mutualisme), négatif (inhibition, compétition, prédation) ou neutre (absence d'effet) sur la croissance d'un autre individu ou d'une population (Odum 1953). La nature de l'interaction bidirectionnelle établie entre deux partenaires dépend du signe des effets unidirectionnels de chacun des deux partenaires sur l'autre partenaire (Fig. 7).

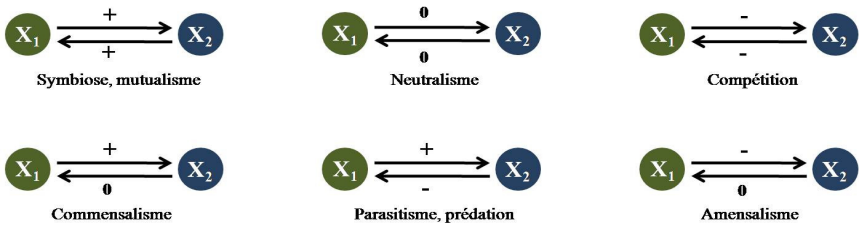


Figure 7 : Schéma représentant la classification phénoménologique des interactions biotiques pouvant s'établir entre deux ou plusieurs individus d'espèces identiques ou différentes (représentées par les cercles colorés nommés X_1 et X_2 suivant la nomenclature mathématique usuelle) dans un écosystème donné (Odum 1953).

Ainsi, la classification d'Odum n'est pas fondée sur les mécanismes biologiques mis en jeu mais uniquement sur les effets observables qu'elles induisent.

I.3.2. La description mécaniste des interactions

En 1977, Fredrickson proposa une classification des interactions en fonction du mécanisme biologique impliqué (Fredrickson 1977). Il distingua notamment les interactions directes des interactions indirectes (Fig. 8).

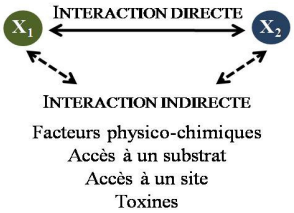


Figure 8 : Schéma représentant la classification mécaniste des interactions biotiques pouvant s'établir entre deux ou plusieurs individus d'espèces identiques ou différentes (représentées par les cercles colorés nommés X_1 et X_2 suivant la nomenclature mathématique usuelle) dans un écosystème donné (Fredrickson 1977).

Les interactions directes impliquent obligatoirement un contact physique entre les individus ou populations concernés. Fredrickson limite donc ce type d'interactions au parasitisme et à la prédation. Les interactions indirectes sont, quant à elles, réalisées via une modification du biotope comme par exemple la variation de ses paramètres physico-chimiques. Une majorité de ces interactions indirectes font intervenir la production d'une substance particulière. Si cette substance n'apparait pas métabolisable par une des populations présentes dans l'écosystème donné et qu'elle a un effet positif ou négatif sur la croissance d'une de ces populations alors il s'agira d'une interaction de type « interférence ». Si cette substance apparait comme un substrat du métabolisme d'au moins une des populations présentes alors il s'agira d'une interaction dite « trophique ».

I.3.3. Les réseaux trophiques

I.3.3.1. La description des réseaux trophiques

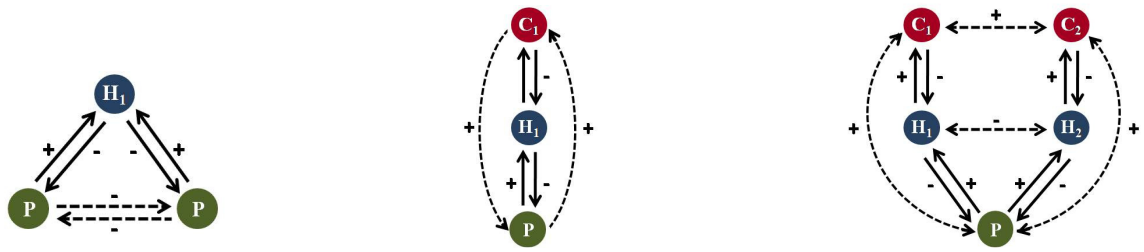
Selon leur principale source de nourriture, les espèces présentes dans un écosystème se répartissent en niveaux trophiques dépendant tous de celui des producteurs primaires ou organismes autotrophes, notés « P ». La plupart de ces producteurs sont des organismes photosynthétiques qui, à l'aide de l'énergie lumineuse, synthétisent des glucides et d'autres composés organiques qui serviront de combustible à leur respiration cellulaire et de matériaux à leur croissance. Il est à noter que dans les communautés qui vivent près de sources thermales, dans les fonds océaniques, les producteurs primaires ne sont pas des organismes photosynthétiques (la lumière ne parvenant pas à les atteindre) mais des bactéries chimioautotrophes qui obtiennent leur énergie en oxydant le sulfure d'hydrogène (Sibuet and

Olu 1998; Tunnicliffe, Mac Arthur et al. 1998). Tous les autres organismes d'un écosystème sont des consommateurs, ou hétérotrophes, qui se nourrissent directement ou indirectement de produits issus des producteurs primaires. Ces organismes se décomposent en différents niveaux trophiques :

- Les consommateurs primaires, généralement appelés herbivores (notés « H ») qui se nourrissent des producteurs primaires et/ou des produits de leur métabolisme.

- Les consommateurs secondaires et plus, généralement appelés carnivores (notés « C ») qui se nourrissent des consommateurs primaires et/ou des produits de leurs métabolismes.

L'ensemble de ces organismes s'organisent donc en un réseau représentant les différents liens trophiques qui les unissent et mettant en évidence des interactions indirectes par interférences (Fig. 9).



Interactions dans un réseau trophique comprenant deux producteurs et un consommateur

Interactions dans un réseau trophique comprenant un producteur primaire, un consommateur primaire et un consommateur secondaire

Interactions dans un réseau trophique comprenant un producteur primaire et plusieurs consommateurs primaires et secondaires

Figure 9 : Schéma représentant différents réseaux trophiques ainsi que les interactions directes (représentées par les flèches continues) et indirectes (représentées par les flèches discontinues) s'établissant entre les différents organismes qui composent les différents niveaux trophiques : producteurs primaires (P), consommateurs primaires (H) et consommateurs secondaires (C).

Tous les écosystèmes, qu'ils soient terrestres ou aquatiques, peuvent être représentés par une telle structuration trophique qui détermine la circulation de l'énergie et de la matière.

I.3.3.2. Le flux de matière et d'énergie au sein des réseaux trophiques

Les réseaux trophiques sont caractérisés par une structure pyramidale liée au flux d'énergie et de matière le long des niveaux trophiques (Fig. 10).

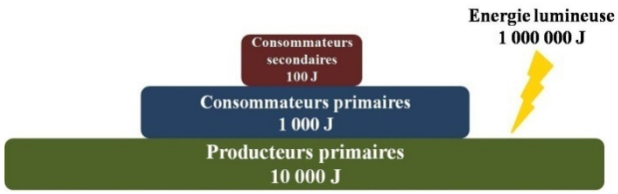


Figure 10 : Schéma représentant les pertes énergétiques le long d'un réseau trophique à partir de 1 000 000 joules d'énergie solaire reçus au cours d'une période donnée.

La structure pyramidale des réseaux trophiques tient au fait que la productivité décline à chaque transfert d'énergie dans la hiérarchie trophique. Cette diminution est une conséquence

des lois de la thermodynamique. En effet, pour une quantité d'énergie constante donnée (première loi de la thermodynamique), les organismes convertissent inévitablement une partie de l'énergie qu'ils consomment en chaleur qui se dissipe dans l'écosystème (deuxième loi de la thermodynamique). D'après la loi de Raymond Laurel Lindeman (1942), la quantité d'énergie passant d'un maillon à l'autre de la chaîne trophique n'est seulement que de 10% (Lindeman 1942). Autrement dit, 90% environ de l'énergie disponible à un niveau trophique ne se rend jamais au niveau suivant. Cette perte d'énergie le long de la chaîne alimentaire limite radicalement la biomasse totale des consommateurs secondaires et supérieurs qui peuvent vivre dans un écosystème. C'est pourquoi les réseaux trophiques comprennent rarement plus de quatre à cinq niveaux. Aussi, les populations de superprédateurs, au sommet de la chaîne, sont généralement de petite taille et sont donc très vulnérables à l'extinction et aux risques évolutifs en cas de perturbations de leur écosystème.

Conceptualiser, quantifier, comprendre l'influence des différents types d'interactions sur les espèces assemblées dans des réseaux trophiques, la diversité de la biocénose, le fonctionnement des biotopes et l'évolution de l'ensemble des différents écosystèmes constituent certainement un des plus complexes et des plus importants challenge pour l'Homme qui trône au sommet de la chaine et qui est donc sensible aux événements atteignant les niveaux trophiques inférieurs… Bien que la route de la connaissance semble encore excessivement longue pour y parvenir, des pas importants ont été franchis au cours des siècles passés et notamment à partir du XIXième siècle avec les travaux de Charles Darwin et sa théorie de la sélection naturelle.

I.4. Les théories sur la complexité du vivant

I.4.1. Les prémices d'une théorie globale

Si l'Ecologie est une science récente, la compréhension du lien entre les espèces et leur organisation est une préoccupation très ancienne. Certains philosophes grecs y avaient déjà beaucoup réfléchi. Il est étonnant de constater que leur philosophie était essentiellement transformiste (i.e. qui explique la diversité des espèces par des transformations au cours du temps). Ainsi, Epicure (341-270 avant J.C.) émit une réflexion qui sera reprise avec éclat par Lamarck quelque vingt siècles plus tard : suggérer que les organes des animaux se développent par l'usage et s'affaiblissent par inaction (concept d'usage et non-usage développé par Lamarck en 1809 dans sa théorie de l'Evolution). Aristote (382-922 avant J.C.), dans le livre IX de *Partibus Animalium* énonça le principe même de la lutte pour l'existence : « *Les animaux sont en guerre les uns contre les autres, quand ils habitent les mêmes lieux et qu'ils usent de la même nourriture. Si la nourriture n'est pas assez abondante, ils se battent, fussent-ils de la même espèce* ». Il se demande même « *si de cette lutte n'auraient pas pu résulter l'extinction des*

formes insuffisamment adaptées aux conditions d'existence et la conservation des formes bien adaptées, d'où l'apparente finalité que nous observons ». Cependant, il repousse aussitôt cette idée considérant que les ressources de la nature sont assez grandes pour rendre impossible la destruction d'une de ses « œuvres » (Perrier 1996). Malheureusement, ces prémices d'une théorie sur la complexité du vivant furent longtemps ignorées. Il faudra attendre la Renaissance, l'ère des grands navigateurs et des grandes découvertes, pour de nouveau voir poindre de la curiosité pour le monde vivant. Dès lors, de nombreuses classifications des espèces animales et végétales sont élaborées. Dans les années 1550, le français Pierre Belon (1517-1564) publie deux ouvrages de classification : un sur les poissons (1553) l'autre sur les oiseaux (1555). Dans ce dernier, Belon, comparant les squelettes d'un homme et d'un poulet, fait remarquer un certain nombre d'analogies. Il s'agissait là d'une idée tellement originale pour l'époque qu'elle fut oubliée pendant près de trois siècles avant de ressurgir avec Etienne Geoffroy Saint Hilaire (1772-1844). Au tout début du XIXième siècle, Jean-Baptiste Pierre Antoine Monnet, Chevalier de Lamarck (1744-1829), élabora pour la première fois, dans son livre *Philosophie Zoologique* (1809), une théorie globale et cohérente pour expliquer les mécanismes de l'évolution biologique. La philosophie de Lamarck était profondément déterministe, ainsi écrit-il dans son ouvrage : « *La Nature, en produisant successivement toutes les espèces d'animaux et en commençant par les plus imparfaits ou les plus simples pour terminer son ouvrage par les plus parfaits, a compliqué graduellement leur organisation. Ces animaux se répandant généralement dans toutes les régions habitables du globe, chaque espèce a reçu, de l'influence des circonstances dans lesquelles elle s'est rencontrée, les habitudes que nous lui connaissons et les modifications dans ses parties que l'observation nous montre en elle* ». Selon lui l'évolution est unidirectionnelle et repose sur trois principes fondamentaux :

- L'action directe du milieu qui contraint le vivant au changement.
- Le rôle de l'usage et du non-usage, les organes ou fonctions utiles pour un organisme dans un environnement donné se développent tandis que les non-utiles s'atrophient.
- La transmission à la descendance des transformations acquises au contact avec le milieu, ce que l'on traduira par l'hérédité des caractères acquis.

Lamarck fut l'objet d'effroyables attaques des derniers grands naturalistes adeptes du fixisme (i.e. créationnisme), tel Georges Cuvier (1769-1832), qui parvinrent à minorer la portée de sa théorie en la maintenant ignorée par une conspiration du silence (Chaline, 2006). Lamarck meurt en 1829, aveugle et oublié. Même si elle est aujourd'hui largement dépassée, sa théorie a constitué une étape fondamentale dans l'élaboration de la théorie darwinienne et il convient de reconnaître le mérite et l'audace de Lamarck, à qui l'on doit également la création du terme

« biologie » signifiant étymologiquement « Science du Vivant », ce qui ne fut pas fait en son temps.

I.4.2. La théorie darwinienne

La formidable aventure de Darwin commença véritablement en décembre 1831 lorsqu'il fut recommandé par l'un de ses professeurs auprès du capitaine du Beagles Fitz-Roy (1805-1865) pour effectuer une mission de cartographie du continent sud américain. Ce voyage, qui dura cinq années, permit à Darwin d'observer les adaptations des organismes qui peuplaient des milieux aussi divers que la jungle brésilienne, la pampa argentine, les étendues désertiques de la Terre de Feu, les sommets vertigineux des Andes… Darwin fut très frappé de constater que la faune et la flore des régions tempérées de l'Amérique du Sud étaient plus proches, d'un point de vue taxonomique, des espèces des régions tropicales de ce continent que des espèces des régions tempérées d'Europe. En observant plus particulièrement des populations de pinsons installées sur l'archipel des Galápagos, Darwin comprit peu à peu que l'origine de nouvelles espèces et l'adaptation constituent des processus étroitement liés.

A son retour en Angleterre, en octobre 1836, Darwin commença à rassembler ses notes et à en rédiger une synthèse. En 1838, il prit connaissance du livre de l'économiste anglais Thomas Robert Malthus (1766-1834), *Le principe de population* (1798), qui pose la nécessité d'une lutte pour l'existence. Finalement, c'est en novembre 1859 que Darwin publie *L'origine des espèces* et expose alors sa théorie de l'évolution. Cette grande théorie regroupe deux idées maîtresses **(i) Toutes les espèces ont un lien de parenté, un ancêtre commun (ii) La sélection naturelle, ou lutte pour l'existence, est le moteur de l'évolution des espèces**.

L'affirmation d'une origine commune des espèces provoqua un véritable choc notamment dans les milieux bourgeois et religieux. En effet, Darwin niait une conception du monde qui avait été enseignée pendant des siècles (et qui continue de l'être…) : le créationnisme, qui veut que la Terre ne soit âgée que d'environ 6 000 ans et que les formes vivantes aient été individuellement et immuablement créées par Dieu en six jours ! Freud dira d'ailleurs, à propos du choc provoqué par Darwin, qu'il s'agit là de la deuxième humiliation de l'humanité tout entière : la Terre n'est pas le centre de l'Univers et l'Homme n'est pas au centre de la création… Ceci peut certainement expliquer le fait qu'en France, pays fortement catholique, le nom de Darwin resta pratiquement inconnu du grand public jusqu'en 1862, ne fut reconnu qu'en 1878 à l'occasion de son admission comme membre correspondant de l'Académie des Sciences (dans la section botanique comme spécialiste des plantes et non comme évolutionniste !) et enseigné seulement vers la fin du XIXième siècle.

Concernant l'idée de la sélection naturelle, Ernst Mayr (1904-2005), qui proposa en 1942 le concept biologique de l'espèce, a décomposé les travaux de Darwin en partant de cinq observations majeures :

- Toutes les espèces ont une telle fertilité potentielle que leur effectif s'accroîtrait de manière exponentielle si tous les descendants engendrés se reproduisaient.
- En dehors des fluctuations saisonnières, la plupart des populations ont normalement une taille stable.
- Les ressources naturelles sont limitées.
- Les caractéristiques des individus d'une population varient énormément, il n'existe pas deux individus identiques.
- Les variations sont en grande partie héréditaires.

Ces observations conduisent à trois inférences formant la théorie darwinienne :

- La production d'un nombre d'individus trop élevé pour les ressources du milieu entraîne une lutte pour l'existence entre les membres d'une population, et une fraction seulement des descendants survit à chaque génération.
- Dans la lutte pour l'existence, la survie n'est pas laissée au hasard : elle dépend en partie de la constitution héréditaire. Les individus qui, grâce à des caractères dont ils ont hérité, sont les plus aptes à affronter leur milieu produisent vraisemblablement plus de descendants que les individus moins aptes.
- Les individus n'ayant pas les mêmes aptitudes à la survie et à la reproduction, la population se modifie graduellement, et les caractères favorables s'accumulent au fil des générations.

Il est à noter que si l'idée d'une origine commune des espèces fut assez rapidement acceptée par une très grande majorité des biologistes, l'idée de la sélection naturelle le fut bien moins. Il manquait pour cela une théorie de la génétique qui aurait rendu compte des variations dues au hasard tout en expliquant la précision avec laquelle les caractères des parents sont transmis à leur progéniture. En somme, il manquait à Darwin les travaux, pourtant contemporains, de Gregor Mendel (1822-1884) qui sont restés longtemps méconnus. Ce n'est qu'en 1930, avec l'essor de la génétique des populations que les travaux des deux chercheurs seront mis en relation.

I.4.3. La double interprétation de la théorie darwinienne

Si l'idée de la sélection naturelle mit du temps à être acceptée, c'est également du fait que les notions de « lutte pour l'existence » et de « survie du plus apte » qui y sont développées faisaient (et continuent de faire) largement débat selon l'interprétation qui en est faite. En effet, ces notions peuvent être perçues au sens le plus étroit : celui d'une « lutte » violente et perpétuelle

entre les individus d'une même espèce pour leur propre « survie » ou être perçues au sens large : celui de la coopération entre individus d'une même espèce pour la « lutte » contre la pression de sélection et la « survie » du plus grand nombre. Cette double interprétation qui peut paraître subtile prend tout son sens lorsqu'il s'agit de savoir « qui est le plus apte à survivre » : celui qui est le plus belliqueux avec ses congénères ou, au contraire, celui qui coopère le plus ?...

I.4.3.1. La coopération comme moteur de l'évolution des espèces

Si Darwin se rendait compte de l'importance de la conception de « lutte pour l'existence » qu'il introduisait en science, il prévoyait également que cette expression puisse perdre sa signification philosophique si elle était employée exclusivement dans son sens étroit. Dans les premiers chapitres de *l'Origine des espèces*, il insistait déjà pour que la conception de lutte pour l'existence soit prise dans son « *sens large et métaphorique, comprenant la dépendance des êtres vivants entre eux, et comprenant aussi non seulement la vie de l'individu mais aussi le succès de sa progéniture* » (*Origine des espèces*, ch. III). Bien que lui-même, pour les besoins de sa théorie, ait employé surtout le terme dans son sens étroit, il mettait ses continuateurs en garde contre l'erreur d'exagérer la portée d'une signification restreinte de l'expression. Dans *The Descent of Man*, il écrivit quelques pages pour en expliquer le sens étroit et le sens large. Il y signale comment, dans d'innombrables sociétés animales, la lutte pour l'existence entre les individus isolés disparait, comment la lutte est remplacée par la coopération et comment cette substitution aboutit à l'émergence de propriétés nouvelles qui assurent à l'espèce de meilleures conditions de survie. Il déclare ainsi que les plus aptes ne sont pas les plus forts physiquement, ni les plus adroits mais ceux qui apprennent à s'unir de façon à se soutenir mutuellement pour la prospérité de la communauté. « *Les communautés*, écrit-il, *qui renferment la plus grande proportion de membres les plus sympathiques les uns aux autres, prospèrent le mieux et élèvent le plus grand nombre de rejetons* ». Ainsi, l'idée de concurrence entre chacun et tous, née de l'étroite conception malthusienne, perdait son étroitesse dans l'esprit d'un observateur qui connaissait la Nature. De nombreux auteurs se sont, en effet, attachés à démontrer, à l'aide d'exemples, que la compétition au sein d'une même espèce est un phénomène marginal au sein des écosystèmes naturels et qu'à l'inverse l'entraide, la facilitation, le mutualisme prédominent. Parmi eux peuvent être cités notamment le zoologiste russe Karl Fedorovitch Kessler (1815-1881) qui proposa « *La loi de l'entraide réciproque* » et Pierre Kropotkine (1842-1921) qui publia en 1902 « *L'entraide, un facteur de l'évolution* ».

I.4.3.2. La compétition comme moteur de l'évolution des espèces

Néanmoins, au lieu d'élargir sa théorie selon ses propres indications et en tenant compte des remarques précédentes, la grande majorité (tout du moins en termes d'influence) des

continuateurs de Darwin la restreignit encore. Ils en vinrent à concevoir le monde animal comme un monde de lutte perpétuelle entre des individus affamés de sang. Ils firent retentir la littérature moderne du cri de guerre « Malheur aux vaincus » comme si c'était là le dernier mot de la biologie moderne. Ainsi, Huxley, considéré comme l'un des meilleurs interprètes de la théorie de l'évolution, décrète dans son article « *Struggle for existence and its bearing upon Man* » que : « jugé au point de vue moral, le monde animal est à peu près au niveau d'un combat de gladiateurs […] Les plus faibles et les plus stupides étaient écrasés, tandis que survivaient les plus résistants et les plus malins […] La guerre dont parle Hobbes de chacun contre tous est l'état normal de l'existence » (Huxley 1888).

Plus saisissante encore est la préface par Clémence Royer d'une édition française de *l'Origine des espèces* (1866) : « *La loi de sélection naturelle, appliquée à l'humanité, fait voir avec surprise, avec douleur, combien jusqu'ici ont été fausses nos lois politiques et civiles, de même que notre morale religieuse. Il suffit d'en faire ressortir ici un des vices le moins souvent signalé, mais non pas l'un des moins graves. Je veux parler de cette charité imprudente et aveugle pour les êtres mal constitués où notre ère chrétienne a toujours cherché l'idéal de la vertu sociale et que la démocratie voudrait transformer en une source de solidarité obligatoire, bien que sa conséquence la plus directe soit d'aggraver et de multiplier dans la race humaine les maux auxquels elle prétend porter remèdes […] Que résulte-t-il de cette protection inintelligente accordée exclusivement aux faibles, aux infirmes, aux incurables, enfin à tous les disgraciés de la nature ? C'est que les maux dont ils sont atteints tendent à se perpétuer indéfiniment ; c'est que le mal augmente au lieu de diminuer* ». Ainsi donc fut théorisé le darwinisme social et par là même légitimées les atrocités qui feront du XXième siècle l'un, si ce n'est le plus, sanglant de l'histoire de l'humanité.

Nul doute que Darwin aurait été consterné de constater la déformation de ses idées. L'adaptation, en termes d'évolution, est synonyme de fécondité. Le point important n'est pas d'infliger la mort, qui est inévitable, mais de propager la vie, ce qui l'est beaucoup moins.

I.4.4. Et demain, quelle théorie de la complexité du vivant ?

Les théories relatives à la complexité du vivant ont grandement évolué au cours de l'histoire de l'humanité. Durant de nombreux siècles, la vision fixiste (i.e. créationniste) prédomina et avec elle une perception caricaturale de l'harmonie de la Nature au service des joies et profits de l'Homme. Cette perception se retrouve tout particulièrement dans le fameux texte de Bernardin de Saint-Pierre (1737-1814) : « *Les harmonies de la nature* » écrit à la toute fin de sa vie. Dans celui-ci, l'auteur expose entre autres idées et sans plaisanteries que si les melons ont des dessins de tranches c'est pour être mangés en famille… Cette vision statique fut par la suite balayée par

la perception étroite de la théorie darwinienne. L'allégorie de la Reine rouge illustre parfaitement la vision évolutionniste actuelle. Celle-ci fait référence à un passage du livre « *De l'autre côté du miroir* », suite d'Alice au pays des merveilles, écrit en 1871 par Lewis Caroll (1832-1898) : « *Alice et la Reine Rouge se mirent à courir […] la Reine allait si vite que la fillette avait toutes les peines du monde à se maintenir à sa hauteur. […] Ce qu'il y avait de plus curieux dans l'aventure c'est que les arbres et les autres objets qui les entouraient ne changeaient pas du tout de place. Si vite qu'elles courussent, il semblait qu'elles ne dépassassent jamais rien.* » Puis, lorsqu'Alice demanda à la Reine rouge pourquoi elles couraient, celle-ci lui répondit : *« Il faut courir de toute la vitesse de ses jambes pour simplement rester là où l'on est* ». La perception actuelle de la Nature est ainsi un système dans lequel toutes les espèces, tous les gènes courent aussi vite que possible, parce que celui qui se laisse distancer est irrémédiablement perdu ou plus exactement parce que ne restent que ceux qui ont couru plus vite que les autres…

Mais alors que penser des espèces dites fossiles telles que les limules, euarthropodes marins dont le groupe semble ne pas avoir évolué depuis plus de 500 millions d'années ? Plus troublant encore est le paradoxe des mutations. En effet, les mutations aléatoires apparaissent extrêmement rares car les systèmes naturels mettent au point des méthodes extrêmement sophistiquées pour éviter leur apparition ou réduire leur fréquence au maximum… Voilà qui conduit à nous poser une question fondamentale : s'il faut sans cesse courir pour conserver sa place, si les mutations génétiques jouent un rôle aussi important dans le changement évolutif alors pourquoi les systèmes vivants ont-ils acquis des processus de correction aussi perfectionnés ? Richard Dawkins écrit : « *Pouvons-nous concilier l'idée que la duplication d'erreurs est une condition* sine qua non *de l'Evolution avec l'affirmation que la sélection naturelle favorise une fidélité extrême de la copie ?* ». Ainsi, entre un fixisme rigide et une course frénétique, nul doute que notre perception de la Nature va continuer à évoluer, à se modifier. Encore faut-il pour cela que nous ne nous focalisions pas sur quelques dimensions de la complexité du vivant telles que la richesse spécifique et les interactions trophiques, comme ce fut longtemps le cas, mais que nous abordions la complexité dans tous ces aspects et notamment dans les études théoriques relatives à la modélisation du vivant.

II. DE LA MODÉLISATION DE LA COMPLEXITÉ DU VIVANT

« Homme qui marche, il n'y a pas de chemin,
le chemin se dessine en marchant »
Antonio Machado.

II.1. Les différentes approches de la modélisation en écologie

D'une manière générale, les modèles mathématiques en écologie constituent des outils de représentation, de compréhension du fonctionnement de systèmes naturels et/ou de prédiction de leur évolution. Selon que la modélisation est abordée uniquement à partir de données réelles ou en tenant compte également des connaissances de lois fondamentales censées régir le phénomène à modéliser, deux grands types de modèles peuvent être distingués : les modèles de comportement et les modèles phénoménologiques. Les premiers, également appelés « boîtes noires », ont pour seul objectif de reproduire le comportement du système étudié. Si ces modèles sont largement utilisés en automatique pour synthétiser des lois de commandes, comme nous le verrons par la suite, ils sont relativement peu utiles lorsque l'objectif de la modélisation est une meilleure compréhension du système ou lorsqu'il s'agit de tester des hypothèses relatives à sa dynamique. Les modèles phénoménologiques sont construits à partir de la connaissance et des hypothèses réalistes qui peuvent être faites sur le phénomène étudié que l'on souhaite modéliser. Ils font intervenir les principes premiers de la physique et notamment les lois relatives à la conservation de la masse et au transfert de la matière et de l'énergie entre plusieurs compartiments. C'est à ce type de modélisation que nous avons travaillé au cours de cette thèse.

Un second niveau de classification des différentes approches théoriques fait intervenir la relation du phénomène étudié au temps. En effet, il est possible de considérer que le phénomène est susceptible d'avoir une valeur continue dans le temps ou, à l'inverse, qu'il ne prend qu'un nombre fini de valeurs. Dans le premier cas, il s'agira de modèles dits continus, dans le second cas, il s'agira d'un modèle dit discret ne décrivant le phénomène étudié qu'en un nombre déterminé d'instants (c'est le cas par exemple de la pullulation d'espèces, l'effectif de ce type de population restant pratiquement constant entre deux instants de multiplication). Bien que n'ayant utilisé en pratique que des modèles continus, nous aborderons brièvement le cas des modèles discrets dans cette partie bibliographique, ceux-ci ayant joué un rôle particulièrement important en écologie concernant l'hypothèse chaotique du comportement de certains écosystèmes.

Enfin, le dernier niveau de classification pertinent à souligner ici est le caractère déterministe ou stochastique des modèles. Dans le domaine de l'automatique, cette distinction est souvent liée à la manière dont les incertitudes du modèle ou celles entachant les données sont prises en

compte. Par exemple, ne disposant pas d'informations fines sur les processus menant d'une procédure d'échantillonnage à l'établissement d'une grandeur physique (par exemple la mesure de la masse d'un échantillon) et au regard de la disparité des sources d'erreurs émanant de la procédure en elle-même (liée par exemple ici à la prise d'échantillon), les modélisateurs ont coutume de considérer que toute mesure est entachée d'une erreur modélisée par une variable aléatoire pourvue de propriétés statistiques connues (voire inconnues dans certaines approches sophistiquées). Lorsqu'il n'est pas possible de quantifier ni même de qualifier les erreurs et incertitudes liées à la modélisation d'un phénomène donné ou lorsque l'on suppose que ces erreurs sont négligeables, on peut s'en remettre, pour décrire le phénomène, à une approche purement déterministe dont l'objet est la description des liens entre des causes et des effets. A l'inverse, si les liens de causalité dans un phénomène ne sont pas établis ou ignorés alors il s'agira d'une approche purement stochastique faisant appel à des calculs de probabilités. Dans cette thèse, c'est l'approche déterministe qui prévaut et que nous développerons de façon plus détaillée ci-après. Concernant l'approche stochastique, nous nous contenterons simplement d'en rappeler les grands principes sans rentrer dans davantage de détails.

Quelle que soit l'approche choisie, il ne faut pas oublier que la modélisation induit l'étude des propriétés du modèle mathématique et non véritablement celle du système naturel étudié. Un modèle permet d'aller au bout des conséquences logiques de ses hypothèses initiales, et il ne sera acceptable que dans certains intervalles de valeurs des variables introduites. Aussi, d'un champ d'application à un autre il devra être modifié même s'il semble à première vue décrire un même type de processus. De plus, les modèles doivent être « validés » par la confrontation de leurs résultats avec ceux d'expériences réalisables (Fig. 11).

Figure 11 : Comparaison d'un modèle de variations périodiques temporelles avec les variations réellement obtenues à partir d'observations réalisées dans le temps avec une fréquence élevée.

Si ces nouvelles expériences corroborent les prédictions du modèle, alors la validation de celui-ci est confirmée et la connaissance du domaine modélisé est réellement augmentée. Cette dynamique de construction est la seule valable pour l'étude du vivant car « seule l'expérience est capable de nous aider à nous faire une idée sur la vérité ou la fausseté des énoncés portant sur des faits » (Popper 1972). Néanmoins, nous verrons que bien souvent cette étape est négligée notamment du fait de la séparation persistante entre approche théorique et approche expérimentale.

II.1.1. L'approche stochastique de la modélisation du vivant

Une modélisation est dite stochastique si des variables aléatoires interviennent dans la définition du système. La sortie du modèle n'est alors pas une valeur mais une distribution de valeurs. Notons que cette dernière approche a récemment pris une plus grande importance en écologie depuis la publication du modèle neutre (Hubbell 2001). Dans un premier temps, cette approche pourrait paraître provocatrice pour une très grande majorité d'écologues et d'évolutionnistes car elle repose sur le postulat que toutes les espèces sont équivalentes et ont la même capacité de reproduction contredisant, ainsi la théorie de la sélection naturelle (Bell 2001).

En fait, le mécanisme qui sous-tend le modèle neutre est la limitation de la dispersion et du recrutement d'individus au sein d'un écosystème. La limitation de dispersion est réalisée lorsqu'une espèce ne parvient pas à un site qui lui serait favorable tandis que la limitation du recrutement est réalisée lorsqu'une espèce ne parvient pas à se développer dans un site favorable (Nathan and Muller-Landau 2000; Muller-Landau 2002). Ces mécanismes permettent, au moins en théorie, à des espèces moins compétitives que d'autres de s'installer et de se développer. Néanmoins, si un tel modèle parvient à reproduire la dynamique de populations d'arbres dans des écosystèmes forestiers, domaine de prédilection de Hubbell et ce pour quoi il a élaboré ce modèle, son utilisation dans d'autres écosystèmes s'avère plus délicate.

II.1.2. L'approche déterministe de la modélisation du vivant

II.1.2.1. La définition du déterminisme

Le déterminisme est une théorie selon laquelle les phénomènes sont causés par leurs antécédents. Pour expliquer le principe de causalité, le savant français Pierre-Simon de Laplace recourait à une métaphore qui par la suite a été appelée le « démon de Laplace ». Il affirmait « *Nous devons envisager l'état présent de l'univers comme l'effet de son état antérieur, et comme la cause de celui qui va suivre. Une intelligence qui, pour un instant donné, connaîtrait toutes les forces dont la nature est animée et la situation respective des êtres qui la composent, si d'ailleurs elle était assez vaste pour soumettre ces données à l'analyse, embrasserait dans la même formule les mouvements des plus grands corps de l'univers et ceux du plus léger atome : rien ne serait incertain pour elle, et l'avenir, comme le passé, seraient présents à ses yeux. L'esprit humain offre, dans la perfection qu'il a su donner à l'astronomie, une faible esquisse de cette intelligence. Ses découvertes en mécanique et en géométrie, jointes à celles de la pesanteur universelle, l'ont mis à portée de comprendre dans les mêmes expressions analytiques les états passés et futurs du système du monde. En appliquant la même méthode à quelques autres objets de ses connaissances, il est parvenu à ramener à des lois générales les phénomènes observés, et*

à prévoir ceux que les circonstances données doivent faire éclore » (Essai philosophique sur les probabilités[3], 1886).

Le principe du déterminisme est, en quelque sorte inné dans la science, puisqu'il confère un sens à la recherche scientifique. Ce sens consiste, en définitive, dans l'idée qu'il existe des lois qu'il est possible et significatif de déterminer. Autrement dit, la science est une connaissance rationnelle parce qu'elle démontre les connexions réelles entre les causes et les effets, et qu'elle n'a pas recours dans ses explications à des éléments ésotériques ou mystiques.

II.1.2.2. Les équations différentielles, outils de la modélisation déterministe

La modélisation déterministe des systèmes dynamiques fait intervenir des équations différentielles dont les précurseurs sont les méthodes de calcul développées par Newton (1642-1727) lors de ses études sur la gravitation et les orbites des planètes qu'il développa dans son ouvrage majeur : « *Principes mathématiques de la philosophie naturelle* » publié en 1687. L'utilisation de ces équations différentielles fut ensuite généralisée et largement employée pour la modélisation de la dynamique des populations et notamment lorsqu'il s'agit de prédire l'effectif futur d'une population à partir d'informations sur son effectif initial et sur les « lois » qui régissent son évolution.

Une équation différentielle est une équation du type :

$$y' = F[y] \quad \text{qui peut également s'écrire} \quad \frac{dy}{dt} = F[y(t)].$$

Cette seconde notation permet de mieux percevoir que « y » et « y' » sont des fonctions du temps. Une telle équation a pour solution une fonction « y(t) » dérivable qui vérifie cette relation en tout point « t ». La condition initiale de la solution « y(t) », notée « y(0) », est une constante à préciser. L'aspect déterministe des équations différentielles a des implications fortes et se concrétisent mathématiquement par le théorème de Cauchy-Lipschitz. Néanmoins, la plupart des équations différentielles ne peuvent pas être résolues explicitement.

Le mathématicien français Henri Poincaré (1854-1912) proposa, dans son ouvrage « *Mémoires sur les courbes définies par une équation différentielle* » (1881), des outils permettant de connaître l'allure globale des courbes intégrales. Pour visualiser l'allure de ces courbes, Poincaré définit un point dans un repère, ou espace, caractérisant l'état du système à un instant « t ». Lorsque le temps s'écoule, le point figurant l'état du système décrit, en général, une courbe ou orbite dans cet espace qualifié d'espace des phases. Poincaré a mis en évidence que ces orbites ne pouvaient prendre qu'un nombre restreint de formes (Fig. 12).

[3] L'ensemble de cet ouvrage est disponible gratuitement sur internet à l'adresse : http://www.vigdor.com/index.html

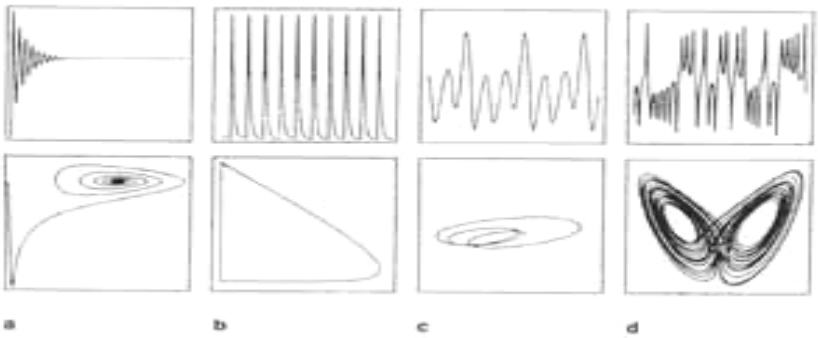


Figure 12 : Schéma représentant les différentes allures globales ou orbites des courbes intégrales. Les graphiques du haut représentent la dynamique d'un système en visualisation classique tandis que les graphiques du bas représentent les mêmes dynamiques visualisées dans l'espace des phases où « y » est représenté en abscisse et « » en ordonnée. (a) L'orbite converge vers un point d'équilibre. (b) L'orbite s'accumule autour d'une orbite périodique. (c) L'orbite présente plusieurs boucles périodiques. (d) L'orbite prend la forme d'une aile de papillon (Gleick 1999).

Le système décrit par des équations différentielles peut, entre autres, converger vers un état d'équilibre après maintes oscillations, ce qui correspond dans l'espace des phases à des boucles qui convergent vers un point (Fig. 12, a). Le système peut également se répéter périodiquement, ce qui correspond dans l'espace des phases à une orbite cyclique (Fig. 12, b). Le système peut également présenter un mouvement périodique plus complexe tel que ne se répéter seulement qu'après trois oscillations différentes : on dit qu'il possède un cycle de période trois. Cela correspond à des boucles plus compliquées dans l'espace des phases (Fig. 12, c). Enfin, le système peut présenter une dynamique chaotique, et présente alors une forme en aile de papillon dans l'espace des phases (Fig. 12, d).

II.2. Les modèles déterministes historiques en écologie

II.2.1. Le modèle malthusien ou de croissance exponentielle d'une espèce

La construction d'un modèle mathématique en écologie nécessite de faire des hypothèses préalables sur les traits de vie des organismes. Celles-ci ont pour rôle de préserver certaines caractéristiques essentielles de la réalité et de la simplifier suffisamment pour qu'elle puisse être étudiée par les mathématiques. Un cas relativement classique est de poser l'hypothèse, H_0, suivante : « Le taux de variation de la population est proportionnel, en tout temps « t », à la densité de population X(t) présente au temps « t ». Cela se traduit à l'aide d'une équation différentielle par :

—

où « r » est une constante pouvant être positive et dans ce cas la taille de la population augmente ou négative et dans ce cas la taille de la population diminue au cours du temps. Ainsi, « r » constitue en fait le taux de croissance intrinsèque spécifique de la population considérée. Ce modèle fut proposé en 1798 par Malthus qui s'alarmait du fait que la production de ressources

suivait, selon lui, une croissance arithmétique tandis que les populations suivaient une croissance exponentielle.

II.2.2. Le modèle logistique ou de croissance bornée d'une espèce

II.2.2.1. La présentation du modèle logistique

Le modèle malthusien peut être considéré comme prédictif pour des pas de temps raisonnables. En effet, si l'on considère « r » comme positif alors la population ne cessera d'augmenter ce qui, biologiquement, traduirait un contexte de ressources non-limitantes rarement réalisé dans les écosystèmes naturels. Aussi pour tenir compte de ce réalisme biologique, le modèle malthusien peut être modifié par l'introduction d'un substrat limitant, noté « S », conduisant au système d'équations suivant :

$$\dot{X} = rSX \quad avec \quad X_{(0)} = X_0$$
$$\dot{S} = -rSX \quad avec \quad S_{(0)} = S_0$$

Une autre manière de l'exprimer consiste en l'introduction d'un facteur rétroactif limitant la hausse de la population quand sa densité devient élevée par rapport à l'environnement. Pour cela, la notion de capacité biotique du milieu, notée « k », correspondant à la quantité d'organismes vivants pouvant être supportée par le milieu considéré est ajouté dans l'équation du modèle malthusien. Ainsi, une autre façon d'exprimer ces contraintes biologiques pourrait être :

$$\frac{dX}{dt} = rX(1 - \frac{X}{k}).$$

Cette équation, qui donne le modèle mathématique de la croissance des populations animales est dénommée « modèle de Verhulst » du nom de son concepteur : le mathématicien belge Verhulst (1804-1849) qui l'a proposé en 1838 et est aussi appelé « modèle logistique » (Britton 2004).

II.2.2.2. La stratégie « r » et la stratégie « k »

L'équation de Verhulst, qui fait intervenir le taux de croissance « r » et la capacité biotique « k » du milieu, est, avec la théorie de biogéographie (Mac Arthur and Wilson 1967) à l'origine du concept de stratégie démographique « r » versus stratégie « k » qui peut caractériser chaque espèce. En effet, au sein d'un écosystème, une espèce donnée se trouve confrontée à :

- Un milieu ambiant dont les propriétés sont plus ou moins fluctuantes.
- Des ressources alimentaires plus ou moins limitantes et plus ou moins diversifiées.
- D'autres espèces avec lesquelles elles peuvent éventuellement être en compétition pour la même ressource.
- Des causes de mortalité ou d'inhibition variées.

Pour faire face à ces aléas, chaque espèce a, au cours de son évolution, acquis une stratégie démographique le long d'un gradient allant d'une stratégie « r » à une stratégie « k ». Les espèces présentant une stratégie « r » sont caractérisées par une grande vitesse de multiplication et la possibilité de coloniser rapidement une ressource, qu'il s'agisse d'une ressource alimentaire ou d'un espace disponible. A l'inverse, les espèces présentant une stratégie « k » sont caractérisées par un taux de croissance faible mais une très bonne capacité à maintenir leurs effectifs constants, qui tendent vers le maximum de la capacité biotique du milieu, ce qui nécessite des mécanismes de protection et de spécialisation.

Cette différence de stratégie pour l'occupation d'un milieu donné se caractérise par de profondes différences entre les deux types d'espèces (Tableau 1).

Tableau 1 : Comparaison des caractéristiques entre les espèces « r » et « k » (Fischesser and Dupuis-Tate 1996).

Stratégie « r »	Stratégie « k »
Petite taille	Grande taille
Productivité forte	Productivité faible
Grande précocité sexuelle	Période d'immaturité longue
Mortalité forte	Mortalité faible
Espérance de vie courte	Espérance de vie longue
Perte énergétique considérable	Economie de l'utilisation de l'énergie
Espèces de type généraliste	Espèces de type spécialiste
Espèces pionnières et colonisatrices	Espèces inféodées au climax
Effectifs très fluctuants	Faibles fluctuations des effectifs

Quelques exemples d'organismes à stratégie « r » et « k » peuvent être cités en guise d'illustration. Les mammifères, en règle générale, sont caractéristiques d'une stratégie « k ». En effet, ils font peu de descendants mais ceux-ci sont très protégés par un investissement parental important tant en ce qui concerne l'alimentation que la protection vis-à-vis d'éventuels prédateurs. A l'inverse, les poissons, par exemple, pondent généralement beaucoup d'œufs mais l'investissement parental est absent laissant les juvéniles à leur propre destin.

II.2.2.3. Le chaos déterministe

Le modèle de Verhulst sera, entre autres, repris par le démographe américain Raymond Pearl au début du XXième siècle ainsi que par le mathématicien italien Vito Volterra, intrigués par le comportement différent de l'évolution de la population d'une espèce à une autre. En effet, sur un territoire donné, il est possible d'observer que la population de certaines espèces semble se stabiliser tandis que d'autres semblent suivre des cycles réguliers ou encore fluctuer de façon apparemment aléatoire. Ainsi peut-on se poser la question de savoir pourquoi certaines espèces se stabilisent et d'autres non quand toutes les populations animales semblent avoir un comportement de même nature.

Dans les années 1970, le mathématicien James Yorke et un physicien australien, Robert May, étudièrent des populations d'insectes. Ils découvrirent alors que l'évolution de chaque population peut être décrite par une loi logistique et dépend grandement de la valeur de « r » (Fig. 13). Il faut préciser ici que ces auteurs n'ont pas utilisé le modèle logistique tel qu'il est décrit précédemment mais une « équivalence » en temps discret, soit une suite logistique (May 1976).

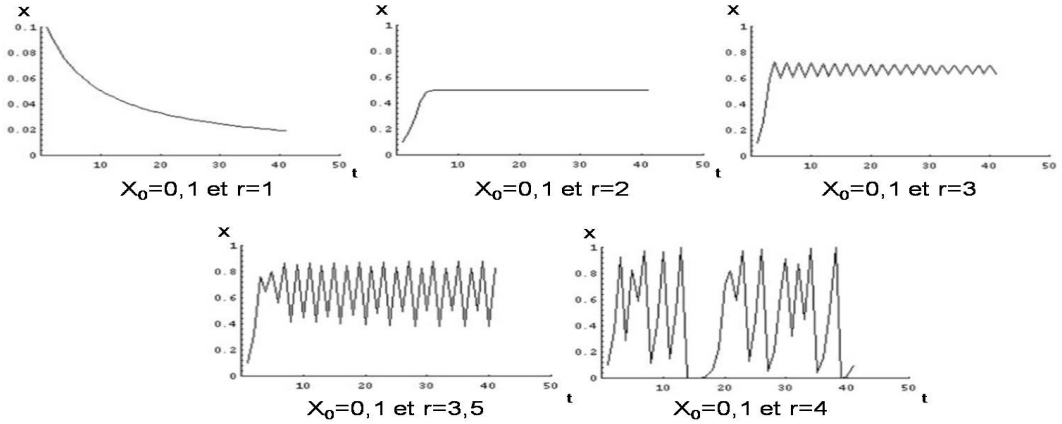


Figure 13 : Dynamiques d'une population selon une suite logistique en fonction de la valeur du paramètre « r » (Gleick 1999).

En effet, tandis que pour des valeurs relativement faibles de « X_0 », nombre d'individus dans la population considérée à l'état initial, et de « r », la suite logistique prédit une stabilisation de la population considérée, une augmentation de la valeur de « r » se traduit par une augmentation d'oscillations irrégulières, ou chaotiques, allant de la saturation du milieu à l'extinction de la population. De plus, Yorke et May ont également mis en évidence que l'évolution d'une population décrite par la suite logistique dépend également de la valeur de « X_0 » (Fig. 14).

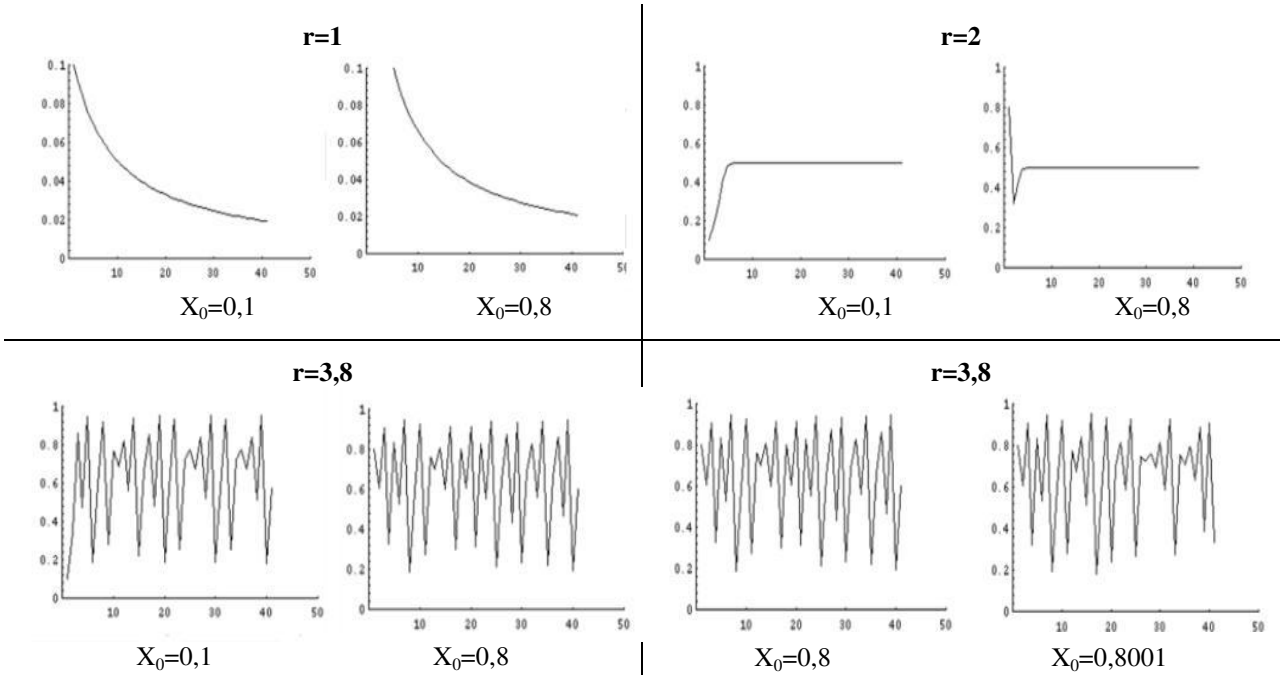


Figure 14 : Dynamiques d'une population selon une suite logistique en fonction de la valeur des paramètres « X_0 » et « r » (d'après Gleick, 1999).

En effet, pour une valeur de k fixée en dehors de la zone chaotique, soit quand r<3, la valeur du nombre d'individus à l'état initial, « X_0 », n'a aucune influence. En revanche, dans la phase chaotique, soit quand r>3, alors une très petite variation de la valeur initiale « X_0 » modifie grandement l'évolution démographique de la population. C'est « l'effet papillon ».

Les phénomènes mis en évidence par Yorke et May sont plus perceptibles encore si l'on adopte une représentation suivant le diagramme de Feigenbaum, du nom du mathématicien américain qui l'a proposé en 1975, qui se présente de la façon suivante : pour chaque valeur du taux de croissance intrinsèque, « r », en abscisse, sont générées, en phase asymptotique, cent valeurs successives de « X(t) » en ordonnées pour un instant « dt » donné (Fig. 15).

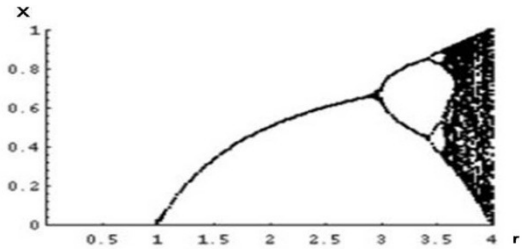


Figure 15 : Dynamiques d'une population selon le modèle logistique, ou de Verhulst, en fonction de la valeur des paramètres « X_0 » et « r » (Feigenbaum 1980).

Ainsi, le diagramme de Feigenbaum indique clairement que :

- Quand r<3, le système tend vers un état final stable.
- Quand r>3, le nombre d'individus dans la population se met à osciller entre deux, puis quatre, puis huit… valeurs jusqu'à entrer dans une zone chaotique où toutes les valeurs semblent possibles.

Le diagramme de Feigenbaum montre ainsi deux résultats particulièrement curieux :

- Les bifurcations en deux, puis quatre, puis huit… vont se multiplier à l'infini sur un intervalle qui ne dépassera jamais le point r=3,57 appelé le « point de Feigenbaum » ou « porte d'entrée sur le chaos ». En effet, c'est toujours à partir de ce point que le système devient chaotique c'est-à-dire qu'il se met à fluctuer entre des valeurs « imprévisibles ».
- La longueur des intervalles propres aux différentes classes de bifurcation (2, 4, 8…) diminue dans un rapport qui tend vers une constante 4,67 appelé « constante de Feigenbaum ».

Il est également à noter que ces bifurcations, points et constantes de Feigenbaum ne se retrouvent pas seulement dans le cas de la fonction logistique mais également dans de nombreux phénomènes physiques comme l'hydrodynamique, l'électronique, les lasers, l'acoustique (Peitgen, Jurgens et al. 1992)…

II.2.3. Le modèle de Lotka-Volterra ou modèle proie-prédateur

II.2.3.1. L'historique du modèle de Lotka-Volterra

Le modèle de Verhulst, s'il tient compte de la capacité du milieu et donc de la densité de la population, ne considère pas les interactions du vivant qui peuvent influencer l'abondance des différentes espèces. Un des premiers modèles d'interaction entre espèces fut développé indépendamment par l'américain Alfred Lotka (1880-1949) et l'italien Vito Volterra (1860-1940) et est connu sous le nom de modèle de Lotka-Volterra. En 1925, Volterra prêta son attention sur un étrange phénomène : durant la première guerre mondiale, la population de sardines dans la mer Adriatique avait fortement baissé bien que l'activité de pêche y fut nettement moins intense. De plus, Volterra remarqua que le nombre de requins, prédateur naturel de la sardine, avait parallèlement fortement augmenté. Aussi, Volterra rechercha un modèle représentant cette relation proie-prédateur. En 1924, Lotka, de son côté, étudia un problème analogue posé dans le domaine agricole et tenta de le résoudre de la même manière.

Le modèle de Lotka-Volterra est depuis devenu un des modèles les plus utilisés en écologie car il peut être considéré comme l'ancêtre de tous les modèles différentiels d'interactions bien qu'à l'origine il ne s'intéressait qu'aux relations trophiques, c'est-à-dire à des relations de type proie-prédateur, reflétant la conception restreinte de la théorie darwinienne que nous avons abordée précédemment.

II.2.3.2. Les hypothèses du modèle de Lotka-Volterra

Le modèle de Lotka-Volterra concerne deux populations dont les effectifs au temps « t » sont respectivement notés « X(t) » et « Y(t) », la seconde (les prédateurs) se nourrissant de la première (les proies). Les hypothèses, inévitablement simplificatrices, sont :

- Les proies disposent de nourriture en quantité illimitée, seuls les prédateurs s'opposent à leur croissance et en l'absence de prédateurs, la population des proies a une croissance exponentielle.
- Le nombre de prédateurs est limité par la quantité de proies dont ils disposent pour se nourrir et en l'absence de proies, la population a une décroissance exponentielle.
- Le nombre de rencontres entre proies et prédateurs est à la fois proportionnel au nombre de proies et au nombre de prédateurs.
- Le taux de disparition des proies ainsi que le taux de croissance des prédateurs dus à ces rencontres sont l'un et l'autre proportionnels au nombre de rencontres entre les deux populations.

II.2.3.3. La description du modèle de Lotka-Volterra

Le modèle de Lotka-Volterra fait donc intervenir deux populations représentées chacune par une équation différentielle.

➢ L'équation relative à la proie introduit :

- Un modèle malthusien de croissance comprenant un terme du premier degré en « X » entraînant une croissance exponentielle.

- Un terme négatif décrivant l'influence du prédateur et reflétant une mortalité proportionnelle au taux de rencontre entre un individu de l'espèce proie et un individu de l'espèce prédatrice, taux proportionnel aux deux densités de population soit à leur produit « XY ».

Ceci conduit à l'équation différentielle :

$$\frac{dX}{dt} = rX - \propto XY \quad \text{soit} \quad \frac{dX}{dt} = (r - \propto Y)X$$

où « r » est le taux de croissance intrinsèque de la population et α le taux de prédation. Ces deux coefficients sont invariables dans le temps et invariables vis-à-vis des densités des deux populations. Ainsi, ces deux coefficients restent constants au cours du temps ce qui, bien entendu, constitue une simplification de la réalité.

➢ L'équation relative au prédateur introduit :

- Un modèle malthusien de mortalité comprenant un terme du premier degré en « Y » entraînant une mortalité exponentielle en l'absence de proies.

- Un terme positif décrivant l'influence de la proie et reflétant une croissance proportionnelle au taux de rencontre entre un individu de l'espèce proie et un individu de l'espèce prédatrice, taux proportionnel aux deux densités de population soit à leur produit « XY »

Ceci conduit à l'équation différentielle :

$$\frac{dY}{dt} = -\beta Y + \gamma XY \quad \text{soit} \quad \frac{dY}{dt} = (-\beta + \gamma X)Y$$

où « β » est le taux de mortalité de la population et « γ » la capacité de prédation du prédateur vis-à-vis de la proie. De la même manière que pour les coefficients de l'équation de l'espèce proie, ceux-ci restent constants au cours du temps.

Le modèle de Lotka-Volterra consiste donc en un système de deux équations différentielles couplées et ce système prédateurs-proies est considéré à l'équilibre quand les densités de proies et les densités de prédateurs sont constantes. Cela revient à chercher la quantité de prédateurs,

alors notée « Y* », telle que la variation de proies soit nulle dans le temps et la quantité de proies, alors notée « X* », telle que la variation de prédateurs soit nulle. Ainsi, à l'équilibre :

$$\frac{dX}{dt} = (r - \propto Y)X = 0 \qquad \text{d'où} \qquad X^* = \frac{r}{\propto}$$

$$\frac{dY}{dt} = (-\beta + \gamma X)Y = 0 \qquad\qquad Y^* = \frac{\beta}{\gamma}$$

Chacune des équations ci-dessus représente une isocline du système et l'équilibre est atteint à l'intersection des deux (Fig. 16).

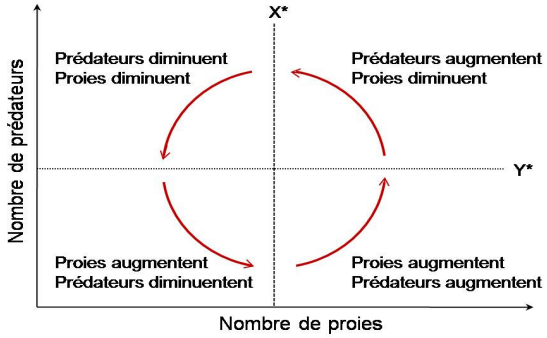


Figure 16 : Espaces des phases du modèle de Lotka-Volterra et évolution de l'abondance des proies et des prédateurs de part et d'autres des isoclines nulles du système.

Dans les équations du modèle de Lotka-Volterra, la vitesse maximale d'accroissement d'une population de prédateurs se situe au moment de la densité maximale de ses proies reflétant que le taux de multiplication du prédateur dépend essentiellement de la disponibilité de sa nourriture. Réciproquement, la vitesse maximale de décroissance d'une population de proies se situe au moment de la densité maximale de prédateurs reflétant que la cause de mortalité de cette population est la prédation. Les oscillations des deux populations sont donc de même fréquence mais décalées d'un quart de période (Fig. 17).

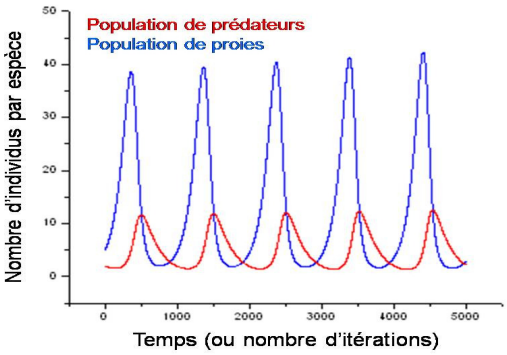


Figure 17 : Oscillations entretenues indéfiniment des populations de prédateurs et de proies selon le modèle de Lotka-Volterra.

Le fait qu'un modèle proie-prédateur très simple puisse présenter des fluctuations périodiques est un résultat très important du point de vue biologique. En effet, cela signifie que même en l'absence de perturbations extérieures, des populations peuvent grandement fluctuer.

Quelques modifications intéressantes peuvent être apportées au modèle de Lotka-Volterra présenté ci-dessus rendant compte de la relation proie-prédateur entre deux espèces. En effet, il est possible de tenir compte, par exemple, de la densité de chacune des populations et de les borner en intégrant dans les équations un terme d'auto-limitation, soit d'interaction intraspécifique, conduisant au système suivant :

$$\frac{dX}{dt} = (r - \varphi X - \propto Y)X$$

$$\frac{dY}{dt} = (-\beta - \theta Y + \gamma X)Y$$

Les oscillations générées par ce modèle apparaissent amorties, aboutissant à des densités constantes à l'équilibre de la population de la proie et de celle du prédateur. De même, l'espace de phase apparait différent, la trajectoire est alors une spirale qui s'enroule, dans le sens trigonométrique, autour d'un certain point du plan dont les coordonnées sont égales aux densités à l'équilibre de la proie et du prédateur (Fig. 18).

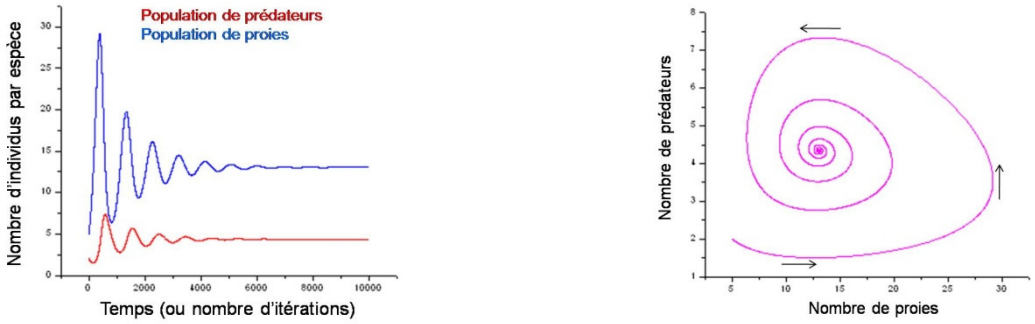


Figure 18 : Données générées des populations de prédateurs et de proies selon le modèle de Lotka-Volterra tenant compte d'une limitation densité-dépendante des deux espèces. A gauche figurent les oscillations amorties telles que données par le modèle. A droite les mêmes données représentées sous espace de phases.

Il est également possible de supposer que la population de proies n'ait pas de mécanisme d'autolimitation mais qu'au contraire, sa reproduction s'accélère quand sa densité augmente. Une telle considération revient à remplacer –φ par + φ dans l'équation différentielle décrivant l'évolution de la population de proies (Fig. 19).

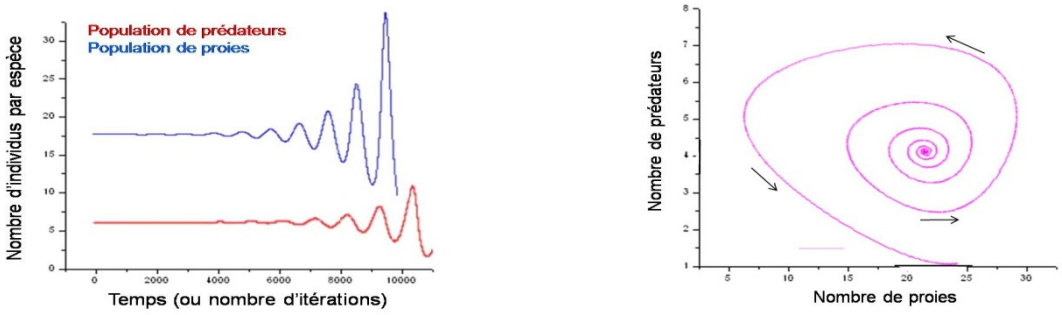


Figure 19 : Données générées des populations de prédateurs et de proies selon le modèle de Lotka-Volterra tenant compte d'une facilitation densité-dépendante des deux espèces. A gauche figurent les oscillations amorties telles que données par le modèle. A droite les mêmes données représentées sous espace de phases.

Les oscillations générées par ce modèle apparaissent amplifiées. La trajectoire dans l'espace des phases est encore une spirale parcourue dans le sens trigonométrique, mais qui se déroule au lieu de s'enrouler et :

- Ou bien tend asymptotiquement à rencontrer un des axes de coordonnées. L'autre coordonnée devenant alors quasi-nulle, un des deux partenaires tend alors à disparaître du système.

- Ou bien décrit des spires de plus en plus serrées atteignant, par l'intérieur, un cycle limite reproduisant la première situation.

Ainsi, en dépit de sa grande simplicité, le modèle de Lotka-Volterra permet de rendre compte de comportements complexes entre deux espèces entretenant une relation de proie-prédation. Ce modèle est devenu ce que l'on peut appeler un grand classique et marque l'entrée de la modélisation en Ecologie. Le modèle de Lotka-Volterra peut être considéré comme le père des modèles d'interactions du vivant. En effet, par quelques modifications supplémentaires, ce modèle peut être utilisé pour décrire le comportement de plusieurs, espèces en compétition pour une même ressource.

II.2.4. Le modèle de Lotka-Volterra comme modèle de compétition

II.2.4.1. La présentation du modèle

Dans le cas de deux espèces en compétition pour la même ressource, l'évolution des deux populations dépendra d'un terme d'interaction négatif. En effet, l'abondance d'une des espèces limite la croissance de l'autre en accaparant la ressource et inversement, la rareté de l'une favorisant la deuxième. Un modèle simple, basé sur le modèle de Lotka-Volterra, traduisant ces hypothèses et tenant compte des interactions intraspécifiques est :

$$\frac{dX}{dt} = (\propto -\beta X - \gamma Y)X$$

$$\frac{dY}{dt} = (\propto' - \beta' Y - \gamma' X)Y$$

où les termes d'autolimitation de chaque espèce sont $\frac{\beta}{\alpha}$ et $\frac{\beta'}{\alpha'}$ et les termes de limitation mutuelle sont $\frac{\gamma}{\alpha}$ et $\frac{\gamma'}{\alpha'}$.

Comme précédemment, les isoclines nulles données par « dX/dt=0 » et « dY/dt=0 » peuvent être déterminées, l'évolution du système dépendant de la position des deux droites résultantes.

Plusieurs cas peuvent alors être distingués dans l'analyse des directions de trajectoires :

- Les droites se croisent de telle sorte que $\frac{\propto'}{\beta'} < \frac{\alpha}{\gamma}$ et $\frac{\propto}{\beta} < \frac{\alpha'}{\gamma'}$

L'intersection des droites apparaît alors comme un point de convergence des trajectoires. Le système évolue vers un état d'équilibre stable comprenant une certaine proportion des deux espèces. Il y a donc coexistence des deux espèces en compétition pour la même ressource. Les densités à l'équilibre des deux espèces correspondent à leurs coordonnées au point d'intersection des deux droites soit :

$$X^* = \frac{\gamma'\alpha - \gamma\alpha'}{\gamma'\beta - \gamma\beta'} \quad \text{et} \quad Y^* = \frac{\beta'\alpha - \beta\alpha'}{\beta'\gamma - \beta\gamma'}.$$

Néanmoins, cette coexistence est conditionnée par la double inégalité :

$$\frac{\propto'}{\beta'} < \frac{\alpha}{\gamma} \text{ et } \frac{\propto}{\beta} < \frac{\alpha'}{\gamma'}$$

car si l'une des deux n'est pas satisfaite alors on se retrouve dans le deuxième cas de figure. Ainsi, ce modèle nous apprend que deux espèces en compétition pour une même ressource ne peuvent coexister que si, pour chacune d'elles, l'autolimitation est plus forte que la limitation croisée ou en d'autres termes que la compétition intraspécifique est plus forte que la compétition interspécifique.

- Les droites se croisent de telle sorte que $\frac{\propto'}{\beta'} > \frac{\alpha}{\gamma}$ et $\frac{\propto}{\beta} > \frac{\alpha'}{\gamma'}$

Alors une des deux espèces disparait car toutes les trajectoires divergent en s'éloignant de l'intersection des deux droites. Une telle intersection constitue une « ligne de catastrophe » car en fonction de fluctuations pouvant être minimes, le système va évoluer vers la disparition soit de la première espèce soit de la deuxième.

- Les droites ne se croisent pas et alors l'extinction, déterminée par les valeurs des coefficients des équations dynamiques, d'une des deux espèces est inéluctable.

Ces deux derniers cas fournissent une illustration du principe d'exclusion compétitive.

II.2.4.2. Le principe d'exclusion compétitive

Le principe d'exclusion compétitive stipule que « deux ou plusieurs espèces présentant des modes d'utilisation des ressources identiques ne peuvent coexister dans un environnement stable, la plus apte éliminant les autres » (Harding 1960; Grover 1997). Le principe d'exclusion compétitive fait appel à la notion de ressource limitante. Trois types de ressources limitantes prépondérantes ont été évoqués : l'espace, les ressources trophiques et le temps (Schoener 1974). Plus les espèces en compétition sont similaires dans l'utilisation partagée de ces ressources limitantes et plus leur coexistence est précaire (May 1981). Les expériences de Gause avec des paramécies ou celles de Park avec des coléoptères ont démontré la validité du principe d'exclusion compétitive mais dans des conditions environnementales très simplifiées (Gause 1934; Park 1948; Park 1954; Park 1957). Ce principe a également été mis en évidence dans des

écosystèmes naturels mais généralement dans le cas particulier d'introduction d'espèces exotiques par l'Homme. En effet, très souvent des espèces introduites se retrouvent en compétition avec des espèces endémiques (i.e. natives) et dans certains cas il arrive que l'espèce invasive élimine complètement les espèces endémiques (Mooney and Cleland 2001).

Cependant, de nombreuses réserves ont été émises par rapport au principe d'exclusion compétitive. En effet, en 1961, Hutchinson observa un grand nombre d'espèces de phytoplancton coexistant dans un milieu présentant un nombre restreint de ressources disponibles (Hutchinson 1961). Ces observations, allant à l'encontre des prédictions des modèles, conduisirent à l'expression du « paradoxe du plancton ». Putman et Wratten évoquent que le principe d'exclusion compétitive ne serait théoriquement possible que si l'une des espèces en compétition ne change pas de comportement trophique (Putman and Wratten 1984). Ces auteurs utilisent le mot « théoriquement » pour indiquer que les espèces ont, en fait, des possibilités de réaction et peuvent s'adapter à la présence d'un compétiteur de différentes façons. En effet, mis à part certaines situations particulières, les études de terrain suggèrent qu'il existe souvent des mécanismes de relâchement de la compétition (Loreau and Ebenhoh 1994; Schluter 1994; Huisman and Weissing 1999). Dans ce dernier cas, les relations entre compétition et coexistence apparaissent plus simples : l'évitement, la réduction ou le relâchement de la compétition interspécifique peuvent favoriser la coexistence entre espèces. Il existe différents cas d'interactions coexistence-compétition : (i) il y a coexistence-compétitive lorsque la coexistence est rendue possible par des facteurs extrinsèques malgré une forte compétition, par exemple via la prédation (ii) il y a coexistence non compétitive si la compétition est faible, par exemple lorsque les ressources ne sont plus limitantes (iii) s'il y a eu une forte compétition dans le passé, la coexistence est possible via une séparation plus ou moins complète des niches écologiques au cours d'un processus de coévolution. Ce troisième cas, qui fait appel au concept majeur de la niche écologique, pourrait jouer un rôle fondamental dans les conditions naturelles (Tokeshi 1999).

II.2.4.3. Le concept de niche écologique

Le concept de niche écologique définit le rôle et la place d'un organisme dans le fonctionnement d'un écosystème. Hutchinson la définit comme l'ensemble des conditions dans lesquelles vit et se maintient une population (Hutchinson 1957). Il s'agit donc d'un hyper-volume à « n » dimensions correspondant à la niche potentielle ou optimale d'une espèce. La niche réelle serait quant à elle plus restreinte par suite des interactions biotiques et abiotiques entre la population considérée et les autres populations locales. Néanmoins, pour des besoins analytiques, les auteurs divisent généralement le terme de niche en autant de dimensions

correspondant aux activités essentielles de la vie des organismes : niche alimentaire, niche spatiale, niche comportementale (Leibold 1995)…. Cette approche analytique permet d'accéder aux phénomènes de divergence partielle ou totale de niche qui aboutissent à la réduction de la compétition (Hutchinson, 1957). Malgré son caractère intuitif, la mise en évidence du partage des ressources comme base de la coexistence d'espèces n'est pas si aisée à démontrer. En effet, la séparation des niches écologiques s'accompagne d'adaptations différentielles entre les espèces, par exemple pour acquérir une nourriture spécifique (Grant 1999). Comme la plupart des mécanismes se déroulant sur de grandes échelles de temps, il est souvent impossible de différencier les causes des conséquences. Les adaptations spécifiques sont-elles à l'origine du partage des ressources ou une conséquence ?

Ainsi, la modélisation s'avère un outil particulièrement intéressant pour la compréhension des interactions du vivant et en dégager des principes ou concepts. Néanmoins, si le modèle de Lotka-Volterra a été très souvent utilisé comme modèle de base pour l'étude des relations trophiques et de la compétition entre deux ou plusieurs espèces, bien peu d'études se sont intéressées aux autres types d'interactions et notamment à l'influence des interactions dites positives telles que la facilitation et le mutualisme sur le fonctionnement des écosystèmes.

III. DU FONCTIONNEMENT DES ÉCOSYSTÈMES

« Nous n'héritons pas la terre de nos ancêtres,
Nous l'empruntons à nos enfants »
Antoine de Saint Exupery.

L'analyse des liens entre la complexité du vivant et le fonctionnement des écosystèmes est une des grandes problématiques de l'Ecologie (Loreau, Naeem et al. 2001). De plus, l'acquisition de connaissances solides sur les liens entre la structuration et le maintien des communautés assemblées et les fonctions exprimées par les écosystèmes devient cruciale dans le contexte actuel de perte de diversité biologique. En effet, les pertes d'espèces liées directement ou indirectement aux activités humaines se produisent à un rythme 100 à 1 000 fois supérieur aux extinctions naturelles et il devient indispensable de connaître l'impact de ces pertes sur les fonctions des écosystèmes (Naeem, Thompson et al. 1994). L'intégrité fonctionnelle des écosystèmes est en effet primordiale : de très nombreux services sont rendus aux sociétés humaines via le bon fonctionnement des écosystèmes comme par exemple l'épuration des eaux ou encore le maintien de la fertilité des sols (Costanza, dArge et al. 1997).

Néanmoins, si la question de l'évaluation de la biodiversité reste complexe (richesse spécifique, abondance des individus de chaque espèce, connectance, type d'interactions), la question du fonctionnement ne l'est pas moins dans la mesure où les attributs pouvant servir à l'évaluation fonctionnelle peuvent concerner le nombre de fonctions exprimées, la productivité ou encore la stabilité des écosystèmes.

III.1. La complexité du vivant et les fonctions des écosystèmes

III.1.1. La notion de fonctions des écosystèmes

Les fonctions exprimées par un écosystème sont traditionnellement définies comme les différentes étapes des processus liés aux flux de matière et d'énergie qui traversent l'écosystème considéré. En effet, les systèmes biologiques obéissent au principe thermodynamique de conservation de l'énergie : l'énergie qui les traverse peut être convertie sous une forme ou sous une autre mais cette énergie n'est jamais créée ni détruite ou pour paraphraser Lavoisier : « rien ne se perd, rien ne se crée, tout se transforme ». Les grands cycles biogéochimiques tels que le cycle de l'azote sont des illustrations de ces cycles de la matière et de l'énergie (Fig. 20).

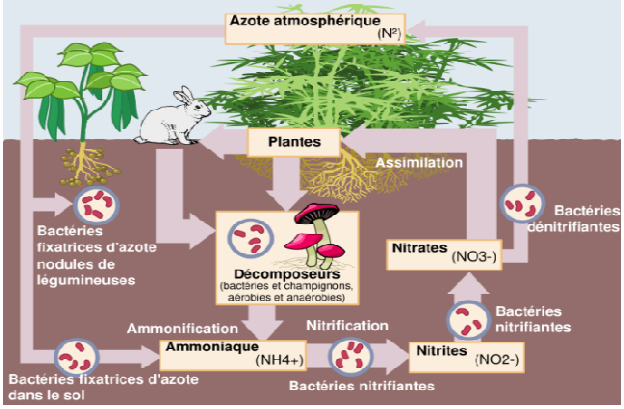


Figure 20 : Schéma du cycle de l'azote (source : wilkipedia).

Dans un tel cycle, l'azote atmosphérique est transformé en différentes formes minérales : azote moléculaire (N_2) ; ions nitrites (NO_2^-) ; nitrate (NO_3^-), ammonium (NH_4^+) ; protoxyde d'azote (N_2O) auxquels s'ajoutent de petites molécules organiques parfois directement assimilables par les végétaux ou les microorganismes (acides aminés, urée, acide urique…). Chacun de ces processus de transformation que sont : la fixation de l'azote atmosphérique, l'ammonification, la nitrification, la dénitrification… peut être considéré comme une fonction de l'écosystème. L'expression de ces fonctions dépendra des conditions abiotiques telles que la température, le pH… ainsi que des conditions biotiques telles que la richesse spécifique ou la structuration des communautés qui considère le nombre de réseaux trophiques, la connectance de la communauté, la force et le type d'interaction… (Giller, Berninger et al. 2004).

III.1.2. L'étude de la productivité des écosystèmes

La plupart des études qui se sont intéressées à la relation entre diversité et fonctions des écosystèmes ont porté sur la quantité de biomasse du système, que se soit la biomasse totale ou celle de chaque niveau trophique et sur la production des différents niveaux trophiques définie comme le flux entrant dans ce niveau trophique et dépendant donc de la biomasse du niveau trophique considéré et de la masse de ressources consommées. Plus rarement, quelques études se sont intéressées à l'influence de la structuration de la communauté assemblée sur la productivité des écosystèmes. Ces études ont été réalisées tant par des approches expérimentales que par des approches théoriques faisant intervenir la modélisation mathématique.

III.1.2.1. L'approche expérimentale

La grande majorité des travaux expérimentaux portant sur la relation entre la biodiversité et la productivité des écosystèmes a été réalisée sur des communautés végétales. Ces travaux ont généralement consisté en l'étude comparative d'assemblages de communautés présentant une richesse spécifique différente. Parmi ceux-ci peuvent être cités les importants travaux d'Hector et al. conduits dans plusieurs pays européens : Royaume Unis, Allemagne, Irlande, Grèce, Portugal,

Suède et Suisse (Hector, Schmid et al. 1999). Ces auteurs ont mis en évidence que la productivité, en termes de biomasse produite, est corrélée positivement avec la diversité de l'écosystème étudié, la diversité étant représentée ici par la richesse en espèces, et ce indépendamment des conditions environnementales et climatiques (Fig. 21).

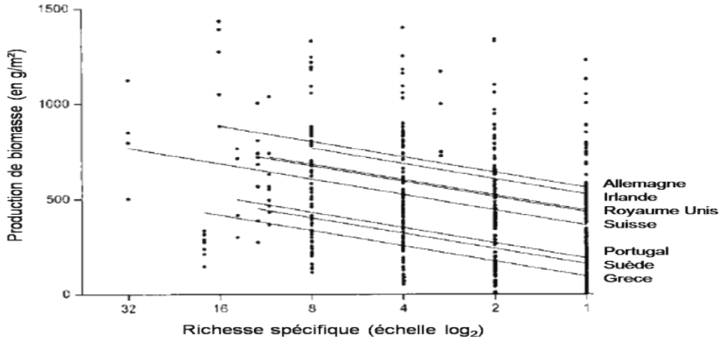


Figure 21 : Corrélation entre la baisse de productivité en biomasse et la perte de diversité, en termes de richesse spécifique, telle que démontrée par les travaux d'Hector et al. (1999) dans différents pays d'Europe : Allemagne, Irlande, Royaume Unis, Suisse, Portugal, Suède et Grèce.

Plusieurs autres études ont obtenu des résultats similaires (Spehn, Hector et al. 2005). Tilman qui a étudié l'impact de la perte de diversité sur la productivité en termes de biomasse ainsi que sur la capture et le lessivage des nutriments a mis en évidence qu'une plus grande richesse spécifique conduit à une plus grande productivité et à une meilleure utilisation de l'azote du sol qui constitue la ressource limitante de son expérimentation (Tilman 1996). Le même auteur arrivera à des conclusions identiques en proposant une expérimentation similaire mais effectuée pendant plusieurs années (Tilman, Reich et al. 2001).

Quelques études se sont également intéressées aux réseaux d'interactions plantes-pollinisateurs (Kremen, Williams et al. 2004; Memmott, Waser et al. 2004). Les travaux de Fontaine et al., consistant à tester différents assemblages d'insectes pollinisateurs vis-à-vis de la productivité en fruits et en graines des plantes pollinisées, ont mis en évidence que la productivité des plantes est fortement affectée par une perte de diversité, toujours au sens de richesse spécifique, des pollinisateurs (Fontaine, Dajoz et al. 2006).

Le rôle de la diversité dans la productivité a également été montré expérimentalement dans des réseaux mutualistes. Ainsi, Van der Heijden et al. ont montré que la diversité des champignons mycorhiziens augmente la diversité des plantes ainsi que leur productivité (van der Heijden, Klironomos et al. 1998).

Quelques études ont également été réalisées sur des systèmes aquatiques tels les travaux de Cardinale (Cardinale 2002) sur des larves de phrygane (petits insectes, 20 à 30 mm, de l'ordre des Trichoptères. Ces larves sont bien connues des pêcheurs de truite qui les l'utilisent communément comme appât). Testant différents assemblages d'espèces, cet auteur a constaté que dans le milieu où la diversité est la plus forte, la consommation des particules en suspension

l'est aussi et dépasse la consommation totale attendue correspondant à la somme de la consommation de chaque espèce prise séparément (Fig. 22).

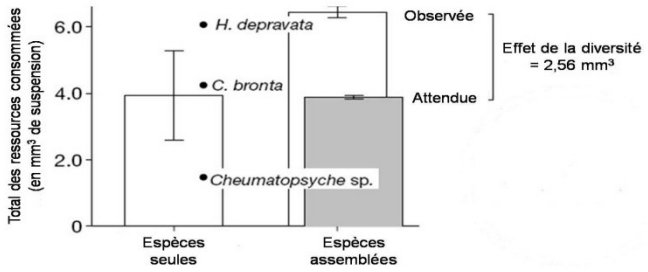


Figure 22 : Corrélation entre la diversité des espèces assemblées et la capacité totale de consommation d'une ressource, telle que démontrée par les travaux de Cardinale (2002).

L'auteur attribue la corrélation positive entre la diversité et la consommation de la ressource par l'effet de complémentarité entre les espèces et particulièrement à une facilitation interspécifique de la capture des ressources. Cardinale a également démontré que l'augmentation de la diversité entraîne des changements dans l'environnement (modification des flux d'eau) qui favorisent le fonctionnement de la communauté.

Si les études expérimentales vont généralement toutes dans le même sens en démontrant une corrélation positive entre la diversité biologique et la productivité écosystémique, il est à noter que les rares études s'étant intéressées à des réseaux trophiques, généralement simples, montrent que cette corrélation n'est pas toujours positive et qu'elle est complexifiée par les interactions trophiques (Paine 2002; Duffy, Richardson et al. 2003; France and Duffy 2006).

Par ailleurs, des études se sont également intéressées au lien entre interactions non-trophiques et productivité, en particulier à l'influence des interactions positives telles que le mutualisme ou la facilitation. Ainsi, les expériences de Rixen et Mulder sur des communautés arctiques de mousses montrent que la diversité augmente la rétention d'eau, via une augmentation de la facilitation, conduisant en une augmentation de la productivité (Rixen and Mulder 2005). De même, les travaux de Bertness et al. sur des communautés intertidales rocheuses montrent que le couvert végétal formé par les algues diminue le stress physique, comme la température ou l'évaporation, engendrant un effet positif sur le recrutement d'individus, la croissance et la survie mais également un effet négatif notamment en augmentant la pression exercée par les consommateurs (Bertness, Leonard et al. 1999).

Plusieurs critiques peuvent être émises sur les études par approche expérimentale. En premier lieu, ces études ont été réalisées sur peu d'écosystèmes différents en se consacrant surtout à des communautés végétales. Ensuite, la diversité n'y est bien souvent étudiée qu'à travers la richesse spécifique qui ne constitue qu'une dimension particulière de la complexité du vivant et les interactions, qui constituent une part importante de la biodiversité, ne sont que trop rarement

considérées. Enfin, une augmentation de la richesse spécifique ne conduit à un effet sur les fonctions écosystémiques exprimées que si la diversité fonctionnelle est elle-même affectée. En d'autres termes, en augmentant le nombre d'espèces dans un assemblage expérimental, la probabilité d'intégrer des espèces fonctionnellement différentes et donc de recruter : (i) une espèce très efficiente pour la fonction considérée (ii) un ensemble d'espèces présentant des traits de vie différents dont l'association augmente le rendement de la fonction considérée (Loreau, Naeem et al. 2001).

Une approche théorique du lien diversité-productivité des écosystèmes, en lien avec l'approche expérimentale, pourrait permettre de pallier ces biais expérimentaux.

III.1.2.2. L'approche théorique

La majorité des études théoriques qui se sont intéressées au lien entre diversité et productivité des écosystèmes a été réalisée sur des modèles de communautés végétales basés sur des extensions du modèle de Lotka-Volterra. Ainsi, Loreau a élaboré un modèle considérant un pool de nutriments inorganiques dans un sol et une communauté de plantes dont la richesse spécifique peut varier (Loreau 1998). Avec un tel modèle, cet auteur arrive à la conclusion qu'une augmentation de la richesse spécifique en plantes n'augmente pas nécessairement la productivité du système (correspondant ici à la quantité de nutriments utilisée par rapport à la quantité présente). De plus, il apparaît que des variations dans les facteurs abiotiques contrôlant, en partie, le flux de nutriments peut interférer sur la compréhension de la relation diversité-productivité. En effet, de tels facteurs masquent systématiquement l'effet de la diversité. Les travaux de Tilman et al., également effectués sur des modèles de communautés végétales, ont comparé les résultats de trois modèles différents relativement simples. Le premier modèle considère des espèces végétales en compétition pour une unique ressource. Le second considère la même communauté mais avec deux ressources limitantes différentes. Enfin, le troisième représente un modèle général de niche écologique dans lequel deux facteurs, le pH et la température, limitent l'abondance des espèces. Pour l'ensemble de ces trois modèles, les auteurs ont mis en évidence que la productivité primaire est positivement corrélée avec la richesse spécifique de la communauté assemblée (Tilman, Lehman et al. 1997).

D'autres modèles ont été élaborés pour tenir compte de plusieurs niveaux trophiques et non plus un seul comme les modèles de communautés végétales. Ainsi, Thébault et Loreau ont présenté un modèle comprenant : un pool de nutriments, une communauté de plantes, une communauté d'herbivores et une communauté de carnivores (Thebault and Loreau 2003). Leur étude met en évidence l'importance de la structure du réseau trophique sur le lien diversité-productivité. En effet, il apparaît qu'un des facteurs influant fortement cette relation est le

nombre d'herbivores généralistes par rapport au nombre d'herbivores spécialistes correspondant à la connectance du système (cf. chapitre I.1.4). Ces auteurs ont montré que lorsque les herbivores sont généralistes alors la productivité n'augmente pas linéairement avec la diversité et peut même décroître pour de fortes valeurs en richesse spécifique. En effet, une augmentation du nombre d'herbivores généralistes conduit à une augmentation de la consommation d'un grand nombre de plantes et donc à une diminution de la production primaire. La compétition entre herbivores qui s'ensuit pour la consommation des plantes restantes conduit également à une diminution du nombre total d'herbivores et donc à une diminution du nombre de carnivores.

Ainsi la diversité n'augmente la productivité que si chaque plante est consommée par un herbivore différent c'est-à-dire que si la connectivité du système n'est pas trop importante. Ces auteurs se consacreront d'ailleurs un peu plus au lien entre connectance et productivité avec un modèle d'assemblage de réseaux trophiques comparable mais incluant le recyclage de la matière (Thébault and Loreau 2006).

Par ailleurs, si une espèce de plante est définie comme non-comestible, donc non-accessible pour les herbivores, qu'ils soient généralistes ou spécialistes, alors le lien diversité-productivité apparaît beaucoup plus complexe. Thébault et Loreau expliquent cette différence de comportement par la combinaison d'un rétrocontrôle des herbivores sur les plantes comestibles et d'un rétrocontrôle des plantes non-comestibles sur la concentration en nutriments présents dans le sol. De tels rétrocontrôles ont une grande importance dans le fonctionnement des écosystèmes. En effet, il a été montré que dans un réseau à trois niveaux trophiques, le contrôle exercé par un carnivore sur les herbivores favorise la croissance des producteurs primaires et favorise donc la productivité primaire (Hairston, Smith et al. 1960). C'est le phénomène des cascades trophiques pouvant aller de haut en bas (contrôle dit « top-down ») quand il s'agit d'un contrôle des herbivores par les carnivores (ou plus généralement du contrôle d'un niveau trophique donné par le niveau trophique supérieur), ou de bas en haut (contrôle dit « bottom-up ») quand il s'agit d'un contrôle des producteurs primaires et des carnivores par la ressource (ou plus généralement du contrôle d'un niveau trophique donné par le niveau trophique inférieur). De telles cascades trophiques sont actives dans de nombreux écosystèmes qu'ils soient terrestres ou aquatiques (Pace, Cole et al. 1999). Si Thébault et Loreau ont mis en évidence que la force de ces rétrocontrôles est influencée par un taux de consommation différent selon la comestibilité des proies, d'autres études ont souligné l'importance des espèces ayant un régime omnivore sur ces cascades trophiques ainsi que l'importance du cannibalisme (Kuijper, Kooi et al. 2003; Bruno and O'Connor 2005; Rudolph 2007; Stachowicz, Bruno et al. 2007).

Il est à noter que très peu d'études théoriques ont été consacrées au rôle des interactions non-trophiques sur la productivité des écosystèmes (Ringel, Hu et al. 1996; Holland, DeAngelis et al. 2002).

III.1.2.3. Une synthèse des études expérimentales et théoriques

La plupart des études, qu'elles soient expérimentales ou théoriques, qui se sont intéressées au lien entre la biodiversité et la productivité des écosystèmes ont révélé une corrélation positive. Cet effet positif de la complexité du vivant est expliqué par trois hypothèses principales :

- L'effet d'échantillonnage qui repose sur l'hypothèse selon laquelle quelques espèces, ayant des traits particuliers, ont un effet majeur sur la productivité écosystémique. L'effet de sélection explique l'impact positif d'une plus grande diversité sur la productivité par une plus grande probabilité que de telles espèces soient présentes dans l'écosystème considéré. Cet effet de sélection a été montré expérimentalement sur des communautés végétales (Aarssen 1997; Loreau and Hector 2001) ainsi que par des modèles de producteurs primaires (Tilman, Lehman et al. 1997; Loreau 1998). Pour que l'effet de sélection soit positif sur la relation entre diversité et production dans les systèmes de compétition indirecte pour les ressources, il est néanmoins nécessaire que les espèces les plus productives soient aussi les plus compétitives (Troumbis, Dimitrakopoulos et al. 2000) car les espèces ayant la plus forte productivité en monoculture ne sont pas nécessairement celles qui dominent en polyculture ou cultures mixes.

- L'effet de complémentarité qui inclut la différenciation de niche et la facilitation. Plus le recouvrement des niches est important, plus le nombre d'espèces qui sont redondantes l'est aussi (Walker 1992). Si les espèces utilisent des ressources différentes, ou identiques mais dans des lieux et/ou moments différents, les espèces sont dites complémentaires par différenciation des niches écologiques. Lorsque les espèces sont redondantes, la perte d'une espèce peut être compensée par les autres espèces de la communauté et la productivité ne dépend alors pas de la diversité. Lorsque les espèces sont complémentaires, une plus grande diversité peut être à l'origine d'une plus grande productivité (Tilman, Lehman et al. 1997; Loreau 1998). La facilitation est un effet biotique courant dans les écosystèmes et peut influencer fortement les processus fonctionnels comme la productivité (Mulder, Uliassi et al. 2001) en modifiant les paramètres abiotiques de l'écosystème (température, pH…) ou en apportant une ressource utile aux autres espèces. Ainsi, la facilitation peut être un des mécanismes expliquant l'effet positif de la diversité spécifique sur les processus fonctionnels, reposant alors sur l'hypothèse que les interactions positives sont majoritaires, ou ont une influence majoritaire, dans l'écosystème.

- L'hypothèse idiosyncratique, selon laquelle l'impact de la perte d'une espèce dépend de la composition de la communauté et de l'environnement. La nature de la relation entre diversité et

productivité est alors difficilement prévisible car spécifique à chaque écosystème. Cette hypothèse est notamment avancée quand la diversité spécifique est faible, chaque espèce ayant alors un effet important sur les processus fonctionnels (Hooper et al., 2005).

Ces différentes hypothèses expliquant la relation entre la complexité du vivant et la productivité des écosystèmes ont fait l'objet d'un débat animé en particulier sur l'impact relatif de la diversité par rapport à la contribution des facteurs abiotiques (Hutson 1997; Wardle 2001). Ces différents mécanismes ne sont pas exclusifs les uns vis-à-vis des autres et il apparaît nécessaire de déterminer leur contribution relative (Loreau and Hector 2001). De même, l'influence des interactions non-trophiques sur la productivité mériterait également d'être plus étudiée afin d'aborder la complexité du vivant dans l'ensemble de ses dimensions et non pas uniquement à travers la richesse spécifique et les relations trophiques.

III.2. La complexité du vivant et la stabilité des écosystèmes

III.2.1. La notion de stabilité des écosystèmes

La notion de stabilité en écologie renvoie à deux notions clefs : la résilience et la résistance. Le terme de résilience vient du latin « Resilio » qui signifie « rebondir ». La résilience fut d'abord un concept de physique qui mesure la résistance d'un solide vis-à-vis d'un choc (Mathieu 1991). Ainsi, la résilience est l'ampleur maximale du choc qu'un système peut recevoir avant de rompre. Ce concept fut ensuite utilisé dans différentes disciplines et notamment en psychologie et en écologie. Un écosystème résilient est un écosystème qui revient à son état antérieur après une perturbation c'est-à-dire qui persiste sans changement qualitatif de sa structure (Holling 1973). Le concept de résilience garde donc son sens physique originel mais s'enrichit par l'ampleur de la perturbation, le seuil à ne pas franchir qui menacerait la survie de l'écosystème.

Par ailleurs, pour retourner à son état d'équilibre, le système met un certain temps. La résilience est donc également assimilable au temps de retour à l'équilibre, autrement dit à la vitesse qu'il met pour revenir à son état initial. La résilience se distingue ainsi de la résistance qui concourt également à la stabilité d'un système. En effet, la résistance caractérise la capacité d'un système à absorber un choc et donc à rester inchangé sous l'effet d'une perturbation extérieure.

III.2.2. L'étude de la stabilité des écosystèmes

III.2.2.1. L'approche expérimentale

Un des premiers principes d'Ecologie a été de considérer qu'un écosystème est d'autant plus stable dans le temps que la biodiversité qui le compose et les interactions qui s'y nouent sont

grandes, soit : que la complexité est source de stabilité. En effet, selon la proposition de Mac Arthur (1955) la connectance stabiliserait le réseau trophique (Mac Arthur 1955).

Cependant, étudier l'effet de la complexité du vivant sur les capacités de résistance et/ou de résilience des écosystèmes par une approche expérimentale n'est pas chose si aisée que cela n'y paraît. En effet, cela nécessite des conditions parfaitement contrôlées afin d'éviter que les résultats expérimentaux ne soient le fait d'autres facteurs, en particulier des facteurs abiotiques, que la biodiversité. Cela nécessité également des études plus ou moins longues dans le temps suivant l'écosystème considéré. Un champ expérimental qui n'a pas d'égal vis-à-vis de ce dernier point est le « Park Grass Experiment » basé à Rothamsted en Angleterre qui est en fonctionnement depuis 1856. Des générations de chercheurs s'y sont succédé, étudiant notamment l'influence de la richesse spécifique sur la production annuelle de foin pour différentes communautés végétales. En réalisant une méta-analyse des données comprises entre 1862 et 1991, Dodd et al. ont mis en évidence que les communautés contenant un grand nombre d'espèces différentes présentent des variations de production annuelle de foin moins importantes laissant ainsi supposer que la diversité est source de stabilité (Dodd, Silvertown et al. 1994). De nombreuses autres études portant sur les communautés végétales arrivent à la conclusion que la stabilité temporelle de propriétés écosystémiques variées augmente avec la richesse spécifique (Tilman and Downing 1994; Tilman 1996; Mac Grady-Steed, Harris et al. 1997; Pfisterer, Joshi et al. 2005). Il est à noter que parmi celles-ci, quelques études ont relevé que si une augmentation du nombre d'espèces engendrait une augmentation de la stabilité de la communauté, en termes de biomasse totale, une telle augmentation engendrait également une baisse de la stabilité populationnelle, soit de plus grandes fluctuations dans les effectifs respectifs de chaque espèce (Tilman and Downing 1994; Tilman 1996). Néanmoins, une critique peut être faite à ces travaux. La richesse spécifique n'était pas directement contrôlée par les expérimentateurs mais variait en réponse à des additions d'azote dans le sol. Aussi, il est possible de penser que d'autres facteurs que le nombre d'espèces interviennent dans les résultats que ces auteurs ont obtenus. Ces résultats seront pourtant confirmés par les travaux de Calderia et al. effectués durant trois ans sur des prairies méditerranéennes en contrôlant directement la richesse spécifique. En effet, ces auteurs relèvent que les effectifs populationnels sont déstabilisés par l'augmentation du nombre d'espèces. Leur interprétation de ces résultats est que la stabilité de la communauté serait le fait de l'asynchronie des espèces, résultant de différences biologiques, en réponse à la modification de l'environnement introduite par l'augmentation du nombre d'espèces (Caldeira, Hector et al. 2005).

D'autres études portant sur les communautés végétales se sont plus particulièrement focalisées sur la stabilité des écosystèmes en réponse à des changements dans les conditions

environnementales correspondant aux scenarii du réchauffement climatique (Macgillivray, Grime et al. 1995; Grime, Brown et al. 2000; Kahmen, Perner et al. 2005). Ainsi, Grime et al. se sont intéressés à des prairies calcaires, qui constituent les communautés végétales présentant la plus forte richesse spécifique en Europe (Hillier, Walton et al. 1990), qu'ils ont soumises artificiellement à différents climats durant cinq années. Ces auteurs ont mis en évidence que les communautés les moins diverses sont les plus sensibles à des modifications climatiques et notamment à la sécheresse. Les résultats des travaux de Kahmen et al. sont concordants, ces auteurs ayant également noté une relation favorable entre diversité et résistance aux changements climatiques. Différentes études démontrent que plus le système est simple plus il est sensible aux perturbations de l'écosystème.

Quelques études ont également portées sur l'influence des interactions biotiques sur la stabilité des écosystèmes. Des analyses de réseaux trophiques réels ont mis en évidence que la plupart des écosystèmes naturels sont caractérisés par une majorité d'interactions de faible intensité et un petit nombre d'interactions de forte intensité (Paine 1992; Wootton 1994; Deruiter, Neutel et al. 1995; McCann, Hastings et al. 1998). De plus, il apparaît que les interactions de forte intensité sont plus particulièrement concentrées dans le premier niveau trophique (Deruiter, Neutel et al. 1995). Une méta-analyse des études portant sur des réseaux trophiques naturels renseignant la taille de la communauté et l'intensité des interactions liant les espèces a été réalisée (Neutel, Heesterbeek et al. 2002). Celle-ci a montré qu'une grande proportion d'interactions faibles peut stabiliser la communauté en tamponnant les oscillations des populations de consommateurs et de ressources diminuant ainsi la probabilité d'extinctions.

Des travaux ont également été conduits sur des réseaux mutualistes. Ainsi, les expériences, déjà citées sur le lien diversité-productivité des écosystèmes, réalisées par Fontaine et al. (2006) ont montré que la diversité des pollinisateurs augmente la persistance des communautés de plantes. Dans ce cas, l'effet positif de la diversité sur la stabilité pourrait s'expliquer par une complémentarité des groupes fonctionnels de pollinisateurs notamment du fait des différences de morphologie de leurs pièces buccales conduisant à une spécialisation (Fontaine, Dajoz et al. 2006).

Enfin, quelques études se sont intéressées à un autre niveau de diversité du vivant que la richesse spécifique sur la stabilité des écosystèmes (Madritch and Hunter 2003; Whitham, Young et al. 2003; Hughes and Stachowicz 2004). Ainsi, Hughes et Stachowicz ont cherché à mettre en évidence l'influence de la diversité génétique sur la résilience de communautés d'algues marines (des zostères, plantes de mer avec de longues feuilles fines en ruban, d'une taille de 20 à 50 cm voire exceptionnellement de 2 mètres et constituant de véritables prairies sous-marines refuges

de nombreuses espèces animales) en réponse à une attaque de prédateur, en l'occurrence des oies sauvages venues les brouter. Ces auteurs ont montré que, comme la richesse spécifique, une plus grande diversité génétique dans la communauté assemblée confère une plus grande résilience et donc stabilité temporelle.

Ainsi, nombreux sont les travaux qui établissent une corrélation positive entre diversité et stabilité des écosystèmes. Ces résultats ont conduit à l'émission de l'hypothèse d' « assurance » (Yachi and Loreau 1999). Cette hypothèse se base sur le concept que différentes espèces réagissent différemment aux changements environnementaux. Aussi, lors d'une perte de diversité, la probabilité de perdre des espèces avec des réponses différentes aux changements climatiques augmente et par conséquent la capacité de la communauté à résister ou résilier s'en trouve diminuée. Les écosystèmes aux diversités les plus faibles ont donc moins de chance d'avoir des espèces pouvant faire face aux changements environnementaux et/ou compensant la diminution des espèces moins adaptées ce qui augmente le risque de déstabilisation du fonctionnement de l'écosystème.

III.2.2.2. L'approche théorique

Si la corrélation positive entre complexité et stabilité est confirmée par de très nombreuses études expérimentales, ce principe écologique fut remis en question par la modélisation mathématique et notamment à partir des travaux des physiciens Gardner et Ashby (Gardner and Ashby 1970). Ces auteurs ont formulé un modèle dynamique relativement simple défini par :

$$\frac{dx_i}{dt} = \sum_{j=1}^{n} \propto_{ij} x_i$$

où « α_{ij} » est une matrice décrivant l'influence de l'espèce « j » sur le taux de croissance de l'espèce « i ». Si $\alpha_{ij}=0$ alors l'espèce « j » n'a pas d'influence particulière sur l'espèce « i ». Dans leur étude, Garner et Ashby ont défini la connectance comme le nombre d'éléments de la matrice « α_{ij} » non nuls en dehors de la diagonale. Les valeurs des éléments diagonaux, correspondant à l'influence des individus d'une espèce sur eux-mêmes, sont tirées aléatoirement dans une distribution uniforme bornée de -1 à -0,1 considérant qu'il ne pouvait y avoir qu'une influence négative de la densité de population d'une espèce. Les éléments extra-diagonaux sont, eux, distribués de manière régulière entre -1 et 1. Gardner et Ashby ont alors cherché à tester la stabilité asymptotique de leur modèle, un système étant considéré comme asymptotiquement stable si et seulement si toutes les variables retournent à leur valeur d'équilibre après une perturbation. Par des simulations, ces auteurs ont trouvé que la probabilité que le système soit asymptotiquement stable diminue quand la complexité du maillage d'interactions liant les espèces entre elles augmente. Leur conclusion fut donc que la complexité est source d'instabilité.

Néanmoins, plusieurs critiques importantes peuvent être faites au modèle développé par Gardner et Ashby. D'abord, les communautés complexes contiennent plusieurs centaines d'espèces avec de très nombreuses interactions et donc peuvent difficilement être assimilées à un système si simple. Ensuite, le caractère aléatoire des connections du modèle de Gardner et Ashby paraît peu pertinent biologiquement et leurs résultats signifient simplement que la stabilité ne peut être maintenue par une diversité reliée stochastiquement (Fig. 23.1)…

Lawlor (1978), conscient de la divergence entre les modèles mathématiques et la réalité des communautés assemblées dans un environnement donné chercha alors à remettre un peu de réalisme biologique au cœur de la modélisation et pour ce faire, proposa trois critères à respecter (Laylor 1978) :

- Qu'il y est au moins un producteur primaire dans le système.
- Qu'il n'y est pas plus de 5 à 7 niveaux trophiques.
- Qu'il n'y est pas de boucles à trois espèces (i.e. où A mange B qui mange C qui mange A).

Suivant ces suggestions, Pimm construisit en 1982 alors un nouveau modèle, toujours sur la base du modèle de Lotka-Volterra, pour étudier le lien entre la complexité du vivant et la stabilité des écosystèmes (Pimm 1982) :

$$\frac{dx_i}{dt} = x_i \left(r_i + \sum_{j=1}^{n} \propto_{ij} x_j \right)$$

où « x_i » est la densité de l'espèce « i », « r_i » est le taux de croissance intrinsèque de l'espèce considérée et « α_{ij} » l'influence de l'espèce « j » sur le taux de croissance de l'espèce « i ».

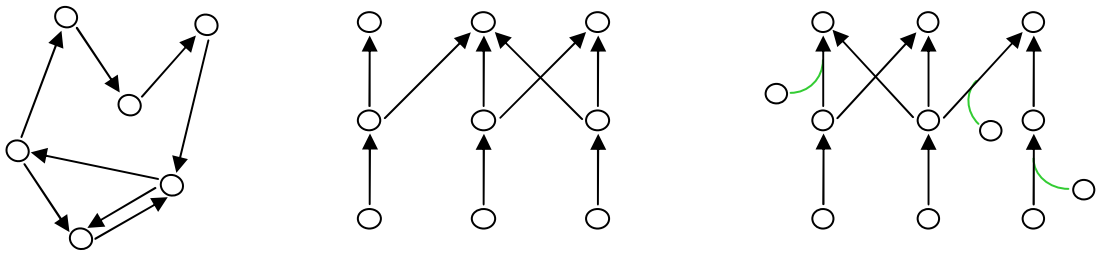
Les contraintes prises appliquées par Pimm dans son modèle sont les suivantes :

- Seules les interactions trophiques sont considérées d'où $\alpha ij=\alpha ji=0$ sauf si « i » est le prédateur de « j ». Dans ce cas, les valeurs de « αij » sont choisies aléatoirement selon les bornes suivantes : $0< \alpha ij<0,1$ et $-10< \alpha ji<0$.
- Seules les espèces basales sont auto-limitantes avec $-1<\alpha ii<0$.
- La structure des interactions trophiques n'est ici pas aléatoire, seuls les cas biologiquement raisonnables sont testés, il s'agit alors d'un modèle de réseau trophique dit structuré (Fig. 23.2).
- Le taux de croissance est fixé à 1 pour les espèces basales et -0,02 pour les autres.

Avec ce modèle, Pimm montre que les modèles biologiquement raisonnables sont plus stables que les modèles stochastiques tels que celui de Gardner et Ashby. Néanmoins, il montre également que la probabilité de stabilité diminue quand la complexité augmente.

Si de nombreux résultats vont alors généralement dans ce sens, il est à noter la petite originalité de De Angelis (1975) qui, en utilisant une fonction mathématique quelque peu différente, a déterminé que la stabilité pouvait augmenter avec la complexité dans quelques cas

bien particuliers (De Angelis 1975). Il est à noter également que tous ces auteurs ont en commun de ne pas avoir tenu compte dans leurs analyses des « explosions écologiques », c'est-à-dire des augmentations démographiques infinies d'une espèce, considérant qu'il s'agissait là d'artéfacts mathématiques. En effet, ces explosions infinies ne pouvant avoir lieu dans les milieux naturels, ils les ont généralement ignorées, même Taylor (1988) qui a pourtant observé que le nombre de ces explosions augmentait avec le nombre d'interactions du système (Taylor 1988). Pour Michalski et Arditi (1999), ces explosions doivent être considérées car elles correspondent aux cas où la croissance d'une population n'est limitée que par des facteurs (espace, éléments nutritifs) absents des modèles utilisés par les précédents auteurs cités qui n'ont considéré que les interactions trophiques. En reprenant les travaux de Taylor, Michalski et Arditi ont montré que s'il était avéré que les systèmes complexes sont moins stables, leur instabilité est plus due à des phénomènes d'explosions écologiques qu'à des extinctions (Michalski and Arditi 1999). Aussi, implémenter dans les modèles les facteurs qui permettent de borner ces explosions pourrait conduire à la conclusion que la complexité peut être source de stabilité dans de plus nombreux cas que les quelques exceptions du modèle de De Angelis (1975)… Un nouveau modèle de réseau trophique structuré, capable de représenter des interactions trophiques et « rhéagogiques » (i.e. interaction ainsi qualifiée lorsqu'une espèce modifie positivement ou négativement une interaction trophique établie entre deux autres espèces) a été proposé (Arditi, Michalski et al. 2005). Ainsi, la complexité du vivant est représentée mathématiquement de manière beaucoup plus satisfaisante (Fig. 23.3)



1. Schéma d'un réseau trophique stochastique

2. Schéma d'un réseau trophique structuré

3. Schéma d'un réseau trophique structuré avec « rhéagogies »

Figure 23 : Schéma représentant les différents types de modèles mathématiques visant à la simulation de réseaux trophiques. Les ronds correspondent ici aux espèces et les flèches aux interactions trophiques. 1) Schéma d'un réseau trophique stochastique (i.e. où les interactions sont déterminées ne manière aléatoire). 2) Schéma d'un réseau trophique structuré (i.e. où les interactions sont établies de manière à rendre compte d'un certain réalisme biologique). 3) Schéma d'un réseau trophique structuré où figurent en vert les « rhéagogies » telles que définies par Arditi et al. (2005).

Les simulations réalisées sur le modèle de réseau trophique structuré avec « rhéagogies » ont mis en évidence que plus le nombre de « rhéagogies » est élevé et plus ces rhéagogies sont de type positif, soit facilitant la relation trophique entre deux espèces, plus la communauté assemblée est super-efficace. En effet, de telles communautés présentent une biomasse totale et

une richesse spécifique forte ainsi qu'une importante utilisation des ressources (Arditi, Michalski et al. 2005).

Par ailleurs, des travaux de modélisation réalisés sur des communautés végétales ont mis en évidence un effet stabilisateur de la diversité sur les propriétés écosystémiques s'expliquant par une asynchronie des réponses des espèces aux fluctuations de l'environnement reprenant ainsi le concept d'assurance (Naeem 1998; Tilman, Lehman et al. 1998; Yachi and Loreau 1999).

III.2.2.3. Une synthèse des études expérimentales et théoriques

Bien qu'elle soit cruciale, notamment du fait de la crise écologique actuelle, la question du rapport entre la complexité du vivant et la stabilité des écosystèmes n'a toujours pas été résolue de manière claire et définitive. Cependant, le grand nombre d'études expérimentales relevant une corrélation positive entre la diversité et la stabilité ainsi que les nouveaux modèles ou approches de modélisation laissent à penser que la complexité est source de stabilité pour trois raisons majeures :

- L'effet de protection (ou d'assurance) qui stipule que toute espèce possède des atouts qui lui permettent d'affronter avec succès certaines circonstances. Aussi, plus les espèces sont nombreuses et plus la probabilité est forte qu'au moins certaines d'entre elles puissent survivre, voire prospérer quelles que soient les conditions. Si une perturbation venait à se produire dans l'environnement, ces espèces seraient à même de protéger la communauté dans son ensemble.
- L'effet de moyenne dû au fait que la stabilité est souvent définie par la variabilité des populations vis-à-vis de l'abondance de la communauté. Ainsi, quand la diversité augmente, la valeur de la variabilité baisse-t-elle automatiquement. Ce phénomène pose néanmoins problème du fait que l'impact d'espèces additionnelles dans la communauté assemblée peut alors se confondre avec l'augmentation du nombre des individus de populations déjà présentes dans la communauté.
- L'effet de covariance négative qui stipule que, du fait des compétitions, tout gain réalisé par une espèce se fait, dans une certaine mesure, au détriment d'une ou plusieurs autres. Par conséquent, les perturbations ne seraient pas aussi nuisibles qu'elles pourraient le sembler pour le système dans son ensemble car les pertes subies par une espèce sont compensées par les gains qu'elles permettent aux autres de réaliser.

III.3. Les limites des approches expérimentales et théoriques

III.3.1. Les limites de l'approche expérimentale classique en écologie

Comme nous venons de le voir au cours de la description des études portant sur la compréhension de l'influence de la complexité du vivant sur la productivité et la stabilité des

écosystèmes (chapitres III.1.2.1. et III.2.2.1.), la grande majorité des expérimentations a été menée sur des communautés végétales et plus généralement sur des macroécosystèmes. Ces expérimentations montrent certaines limites en particulier du fait que les paramètres environnementaux sont généralement difficilement maîtrisables ce qui conduit à des interprétations délicates vis-à-vis du phénomène étudié. Par ailleurs, dans de tels macroécosystèmes, il apparaît difficile de manipuler de grandes populations d'espèces ce qui rend parfois les analyses statistiques peu robustes. De plus, des échantillonnages de taille restreinte peuvent conduire à des effets de sélection rendant là encore controversée l'analyse des résultats. Enfin, les macroécosystèmes présentent généralement des temps de génération très longs qui rendent laborieuses les études notamment lorsqu'il s'agit de s'intéresser à la dynamique des populations et au lien entre la diversité et la stabilité des écosystèmes.

Nous verrons dans la suite de ce manuscrit que d'autres types d'écosystèmes peuvent pallier ces difficultés. En particulier, nous traiterons **de l'intérêt du monde microbien dans la compréhension des écosystèmes complexes** et comment **des communautés microbiennes peuvent être suivies dans des conditions parfaitement contrôlées.**

III.3.2. Les limites de l'approche théorique

Comme nous l'avons vu au cours de la partie consacrée à la modélisation du vivant (chapitre II), les approches théoriques s'avèrent pertinentes en Ecologie pour la compréhension des écosystèmes complexes. De tels modèles permettent une représentation de la complexité du vivant et fournissent une aide précieuse à l'émergence de concepts et théories générales. De plus, si pendant longtemps les modèles étaient basés strictement sur des relations de proie-prédation et de compétition, la complexité se trouve aujourd'hui représentée dans toutes ses dimensions même si peu de résultats sont encore disponibles notamment sur la compréhension des interactions positives telles que le mutualisme ou la facilitation.

Par ailleurs, l'apparition depuis les années 1980 de puissants moyens de calcul, leur démocratisation et leur banalisation ont entraîné une explosion des modèles mathématiques en écologie. En quelques jours, il est devenu « facile » de concevoir le modèle d'un système biologique complexe et de générer un grand nombre de simulations. Bouleau (1999) dresse une liste des modèles que l'on peut désormais rencontrer en biologie et en conclut acerbe : « *L'impression générale que donnent ces travaux est un ensemble assez hétéroclite. Parfois, des schématisations très sommaires sont appliquées à des situations complexes aux implications délicates, parfois au contraire sont employées des méthodes très sophistiquées sur des données très vagues. Des ébauches maladroites avoisinent des effets de style qui évoquent les Précieuses Ridicules. L'emploi de mathématiques trop complexes est un travers fréquent qui nuit gravement*

à la réputation des mathématiques. Le but peut être d'empêcher la discussion par des considérations savantes ou de tirer avantage d'une tournure à la mode mais le plus souvent cela vient de la tendance spontanée du modélisateur à améliorer en perfectionnant et en compliquant. » De plus, bien souvent ces modèles mathématiques ne sont jamais confrontés à des données expérimentales. En effet, encore aujourd'hui les biologistes et les mathématiciens apparaissent dans deux sphères déconnectées même si de plus en plus de lien sont créés.

Pour éviter ces écueils il apparaît donc important de **combiner une exploration expérimentale de la dynamique des communautés et des fonctions exprimées dans des écosystèmes avec une approche mathématique de modélisation** (Fussmann, Loreau et al. 2007). En effet, la méthode qui semble la plus pertinente pour découvrir de nouvelles lois du vivant passe par (i) l'écriture d'un modèle phénoménologique capable de prédire des comportements qualitatifs d'un système, (ii) la mise au point d'expériences dont l'analyse des données permet de discriminer différents scénarii qualitatifs afin de valider ou d'invalider les hypothèses qui sous-tendent la cohérence du modèle, (iii) un aller-retour entre la théorie et l'expérimentation permettant d'affiner ou de modifier les hypothèses relatives au système étudié. Nous verrons dans la suite de ce manuscrit que les écosystèmes microbiens apparaissent comme de bons modèles biologiques pour mettre en œuvre une telle approche.

De l'intérêt du monde microbien pour la compréhension des écosystèmes complexes

Où il sera question :

- *Du monde microbien et des outils d'analyse de sa diversité*
- *Du monde microbien comme modèle d'étude en écologie*

IV. DU MONDE MICROBIEN ET DES OUTILS D'ANALYSE DE SA DIVERSITÉ

« Quelque soit le critère auquel on se réfère, les bactéries furent dès le début, sont aujourd'hui et resteront les organismes les plus réussis de la Terre »
Sephen Jay Gould.

IV.1. A la découverte du monde microbien

IV.1.1. La naissance de l'écologie microbienne

L'écologie microbienne, qui aborde la place et le rôle des microorganismes dans un environnement donné ainsi que les interactions des microorganismes entre eux et avec leur milieu, n'a véritablement commencé qu'avec l'invention d'outils d'analyses du monde microbien dont le premier fut le microscope par Antoine van Leeuwenhoek (1632-1723) en 1676 qui a révélé l'incroyable diversité de ce qui était alors appelé « les animalcules ». Néanmoins, il faudra attendre encore deux siècles avant que la discipline ne prenne un réel essor. En effet, c'est dans les années 1830 que sont réalisées les premières descriptions scientifiques et les premières tentatives de classification de ces animalcules notamment sous l'impulsion du zoologiste allemand Christian Ehrenberg (1795-1876). Celui-ci identifie une grande variabilité de formes bactériennes parmi lesquelles *Bacterium* (ayant l'aspect de bâtonnets droits et rigides), *Vibrio* (bâtonnets tordus non rigides), *Spirochaeta* (filaments spiraux non rigides) et *Spirillum* (filaments spiraux rigides). Rapidement, ces différentes formes de microorganismes sont considérées par certains scientifiques comme les représentants d'une seule et même espèce douée d'une capacité à prendre une grande variété de formes selon leur stade de vie, c'est l'hypothèse du pléomorphisme. Cependant, vers la fin du XIXième siècle, un débat s'engage entre les partisans de cette hypothèse et ceux qui soutiennent l'hypothèse du monomorphisme, soit que la diversité des formes observées représente autant d'espèces. La thèse pléomorphiste est défendue ardemment notamment par Pierre Béchamp (1816-1908) qui considère que toute cellule animale ou végétale serait constituée de petites particules capables, sous certaines conditions, d'évoluer pour former des « microzymes » (i.e. bactéries) qui continueraient à vivre après la mort de la cellule dont elles proviendraient. Face à eux, les tenants de l'hypothèse monomorphiste comme Ferdinand Cohn (1828-1898) ou encore Louis Pasteur (1822-1895) finirent par s'imposer. Parmi eux figure également Robert Koch (1843-1910), biologiste allemand très attaché à la conception linnéenne des espèces qui joua un rôle déterminant dans le règlement de la controverse en rendant possible l'isolation des souches bactériennes par la technique de culture sur milieu solide. En 1876, Koch a également mis en évidence que l'agent

causal de la maladie de l'anthrax est la bactérie *Bacillus anthracis*, confirmant ainsi la théorie des germes de Pasteur, et en conclura plus tard que chaque maladie correspond à une espèce bactérienne.

L'accent des recherches de Koch et Pasteur sur les maladies infectieuses a contribué à jeter le trouble dans les esprits pendant la première moitié du siècle dernier et jusqu'à aujourd'hui, montrant du doigt les bactéries, « les microbes », comme les ennemies absolues de nos existences et les agents impitoyables de toutes les corruptions et maladies. Néanmoins, les observations sur les désordres infectieux ont eu aussi pour effet de stimuler les premières grandes recherches sur l'écologie des microorganismes dans les sols ainsi que dans les milieux aquatiques et d'améliorer notre compréhension de la diversité du monde microbien.

IV.1.2. La diversité du monde microbien

IV.1.2.1. La présentation générale de la diversité du monde microbien

Le monde microbien, qui constitue la biomasse la plus importante de la Terre, regroupe un grand nombre d'organismes divers ayant comme point commun leur petite taille (Tableau 2).

Tableau 2 : Tailles et organisation cellulaire des différents organismes constituant le monde microbien.

Organisation cellulaire	*Microorganisme*	*Taille approximative*
Acaryote	Virus	0,01 – 0,25 µm
Procaryote	Bactéries Archées	0,1 – 10 µm
Eucaryote	Champignons unicellulaires Algues unicellulaires Protozoaires	2 – 1000 µm

A l'exception des Virus qui sont des parasites intracellulaires obligatoires constitués d'une séquence d'acide nucléique pouvant être de l'ADN ou de l'ARN simple ou double brin entourée d'une coque de protéines appelée capside et qui pose la question de leur classification dans le monde du vivant (Jacob 2002), ces différents microorganismes peuvent présenter soit une organisation cellulaire dite eucaryote soit une organisation cellulaire qualifiée de procaryote. Ces termes sont formés à partir de la racine grecque « caryon » signifiant « noyau » et des préfixes « eu » et « pro » qui veulent dire « vrai » et « avant » respectivement.

Les eucaryotes sont des organismes qui possèdent un vrai noyau cellulaire délimité par une membrane nucléaire, constitué de plusieurs chromosomes et d'un nucléole. Ils possèdent également des organites impliqués dans la transformation d'énergie tels que les chloroplastes ou les mitochondries ainsi que des membranes internes complexes comme le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Les eucaryotes peuvent être unicellulaires, pluricellulaires ou constitués de filaments plurinucléés. La totalité des macroorganismes, végétaux et animaux, présentent ce type d'organisation cellulaire. Parmi les microorganismes y figurent :

- Les champignons unicellulaires dont font parties les levures qui se multiplient par scission binaire ou par bourgeonnement donnant naissance à de nouveaux individus à partir d'une cellule mère. Ces microorganismes sont présents dans les sols, les débris végétaux, les lichens... Certains sont également des parasites de l'homme, d'animaux et de végétaux.

- Les Protozoaires qui regroupent un grand nombre d'organismes de taille et de morphologie diverses. Ceux-ci possèdent une variété de structures inhabituelles liées à la membrane externe, par exemple les vacuoles aérifères qui permettent à la cellule de flotter. D'autres groupes de Protozoaires possèdent des granules spécialisés présents à la périphérie de structures, appelés extrusomes, impliqués dans le mouvement amiboïde ou dans le mouvement de glissement.

- Les algues unicellulaires phototrophes. Quelques-unes ont une morphologie filamenteuse ou membraneuse. Elles peuvent être entourées d'une paroi cellulaire à base de cellulose ou d'une couche protéino-aqueuse. De nombreuses espèces sont également flagellées. La plupart contiennent des chloroplastes pouvant différer en structures et en pigments.

A l'inverse, les organismes procaryotes ne possèdent pas de noyau cellulaire, leur ADN n'étant pas entouré d'une membrane nucléaire. Leur structure cellulaire interne est relativement simple, dépourvue de mitochondries et de chloroplastes ainsi que de structures membranaires internes comme le réticulum endoplasmique et d'appareil de Golgi.

IV.1.2.2. La diversité des organismes procaryotes

Durant de nombreuses années, la diversité des organismes procaryotes a été largement sous-estimée et le terme « procaryote » n'était en réalité qu'une définition par défaut pour non-eucaryote. Ce n'est qu'en 1990 que Carl Woese distingua deux phylums de procaryotes, comportant l'un des bactéries vivant dans des conditions extrêmes qu'il appela Archébacteries ou Archées, et l'autre les bactéries « vraies » ou Eubactéries ou encore Bactéries (Woese, Kandler et al. 1990). Ainsi, le règne du vivant ne se trouvait plus divisé en deux (procaryote versus eucaryote) mais en trois : Bacteries, Archées et Eucaryotes (Fig. 24).

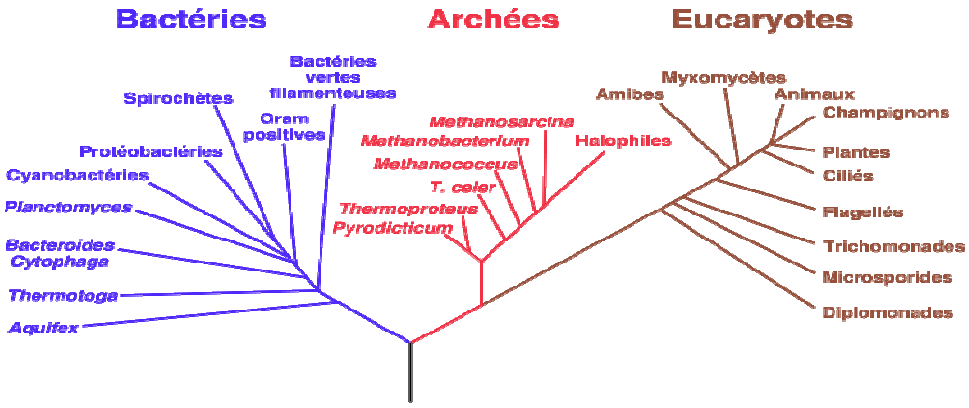


Figure 24 : Arbre phylogénétique des trois domaines du vivant. Cet arbre a été réalisé par la méthode de maximum de vraisemblance et de parcimonie à partir du séquençage d'ADN ribosomiques des représentants de chaque domaine du vivant (d'après Woese et al., 1990).

Les Archées ont été dénommées de la sorte car leur prolifération dans des conditions extrêmes telles que les sources hydrothermales laissait supposer qu'elles avaient pu être les premières formes de vie à la surface du globe terrestre. Les Archées comprennent entre autres des halophiles, des méthanogènes et des thermophiles. Les halophiles supportent des concentrations élevées en sel. Certaines possèdent un système photosynthétique qui utilise un pigment lié à la membrane, la bactériorhodospine. Les méthanogènes vivent dans des milieux sans oxygène et produisent du méthane par réduction du gaz carbonique. Quant aux thermophiles, elles vivent dans des sources chaudes ou dans des fonds marins à des températures avoisinant 80 à 90°C. De plus, le domaine des Archées contient également des espèces détectées dans des environnements aérobies marins, des eaux douces et des sédiments (Bano, Ruffin et al. 2004).

Les Bactéries ont, quant à elles, été réparties en dix divisions majeures (Tableau 3).

Tableau 3 : Les divisions majeures du domaine des Bactéries (Woese 1987).

Divisions	Subdivisions	Genres représentatifs
Protéobactéries	α-protéobactéries β-protéobactéries γ-protéobactéries δ-protéobactéries ε-protéobactéries	*Nitrobacter, Agrobacterium* *Nitrosomonas, Neisseria* *Nitrococcus, Legionella* *Nitrospina* *Helicobacter*
Gram-positives	Haut G+C Bas G+C Espèces photosynthétiques Espèces gram-négatives	*Actinomyces, Streptomyces* *Bacillus, Clostridium* *Heliobacterium* *Megasphaera, Sporomusa*
Cyanobactéries et apparentées		*Nostoc, Synechococcus*
Spirochètes et apparentées	Spirochètes Leptospiras	*Treponema, Borrelia* *Leptonema, Leptospira*
Bactéries vertes sulfureuses		*Chlorobium, Chloroherpeton*
Bactéroïdes, Flavobactéries, Cytophagales et apparentées	Bactéroïdes Flavobactéries	*Bacteroides, Fusobacterium* *Flavobacterium, Cytophaga*
Planctomycetes et apparentées	Groupe des Planctomycètes Thermophiles	*Planctomyces, Pasteuria* *Isocystis pallida*
Chlamydiales		*Chlamydia*
Micrococcus radiorésistants et apparentés	Groupe des Deinococcus Groupes des Thermophiles	*Deinococcus* *Thermus*
Bactéries vertes non sulfureuses	Groupe des Chloroflexus Groupe des Thermomicrobium	*Chloroflexus, Herpetosiphon* *Thermomicrobium roseum*

La plupart de ces groupes ne reposent que très partiellement sur des critères phénotypiques, la variabilité des modes de vie à l'intérieur des divisions est en effet très importante. Par exemple, la division des Protéobactéries, dont le nom fait référence à la présence chez certains de ces microorganismes d'un pigment lié à la photosynthèse, est composée de nombreux groupes qui contiennent tous des bactéries dépourvues de ce pigment et sont donc non photosynthétiques.

D'un point de vue phylogénétique, les Archées sont aussi différentes des Bactéries que des Eucaryotes mais de nombreuses zones d'ombre persistent sur la différenciation de ces trois groupes qui comprennent toute la diversité du vivant (Fig. 25).

Figure 25 : Schéma des grandes divergences du vivant menant à la complexité actuelle. La divergence ayant conduit à la formation des Eucaryotes, entre autres, demeure incertaine notamment quant à une origine archaebactérienne ou bactérienne.

IV.1.3. La formidable odyssée du monde microbien

Les protoprocaryotes (i.e. ancêtre commun des Bactéries et des Archées qui est également appelé LUCA pour Last Universal Cellular Ancestral) constituent les premiers organismes apparus sur Terre il y a environ 3,5 milliards d'années. En effet, des fossiles microscopiques, qui ressemblent aux organismes procaryotes actuels, ont été découverts en Australie et en Afrique du Sud sous forme de tapis présents dans des affleurements rocheux appelés stromatolithes (Fig. 26).

Figure 26 : Photos de stromatolithes (source : wikipedia).

Ces tapis fossilisés correspondent à des colonies de microorganismes enrobées de minéraux qui se seraient formées il y a environ 3,5 milliards d'années (Nagy 1974). L'une des plus anciennes bactéries-archées, *Eobacterium isolatum* (signifiant étymologiquement « bactérie de l'aube des temps »), a été trouvée dans des sédiments du Transvaal (région du Nord-Est de l'Afrique du Sud) datant d'environ 3 milliards d'années (Barghoorn and Schopf 1966). Des colonies fossilisées d'une autre bactérie-archée capable d'oxyder le fer en présence de traces d'oxygène, *Metallogenium personatum*, datant de 2,8 milliards d'années ont également été mises en évidence en Rhodésie (région du Sud-Est de l'Afrique) dans des sédiments contenant de l'hydroxyde de fer suggérant qu'il existait déjà à cette époque des traces d'oxygène (Crerar, Fischer et al. 1980).

Une fois apparus, ces protoprocaryotes se sont progressivement complexifiés. Bien que de morphologie relativement simple, ils se sont dotés de systèmes enzymatiques complexes et performants, indispensables pour les mécanismes moléculaires inhérents à leur division et à leur métabolisme. Ils se sont alors répandus et ont occupé les nombreuses niches écologiques disponibles, étant les seuls organismes vivants sur Terre durant plus de deux milliards d'années. En effet, la rapidité de division des organismes procaryotes est prodigieuse. Par exemple, à 37°C

la bactérie *Escherichia coli* se divise toutes les 20 minutes, donnant naissances à des milliards d'individus en 24 heures. Compte tenu de la densité des tapis de bactéries-archées fossilisées, il est possible de présumer que cette faculté à se diviser rapidement était également un attribut des procaryotes primitifs. Leur développement rapide a dû engendrer de la concurrence vis-à-vis des composés organiques formés antérieurement, constituant leurs ressources. Il y aurait alors eu sélection de nouvelles stratégies pour se défaire de cette dépendance alimentaire et évoluer vers l'utilisation de l'énergie la plus fiable et la plus abondante qui soit sur terre : le Soleil. Les premiers organismes procaryotes photosynthétiques utilisèrent probablement le pouvoir réducteur de l'hydrogène sulfuré (SH_2) pour réduire le dioxyde de carbone (CO_2) (Olson 1970). Il est possible, mais il ne s'agit là que de spéculations, que l'acquisition de la photosynthèse ait conduit à deux autres innovations majeures dans le monde du vivant : la mobilité et les processus de réparation de l'ADN. En effet, il est possible que l'évolution ait sélectionné le déplacement actif qui permet de maximiser l'exposition au soleil favorisant ainsi la propagation d'organismes flagellés. Un flagelle est une sorte de fouet qui mouline sous l'effet de changements de charges électriques et qui serait issu d'une modification du système de sécrétion de protéines de type III (Cavalier-Smith 2006; Pallen and Mattzke 2006; Wong, Amidi et al. 2007). Cependant, si la lumière devint alors un précieux allié de la Vie, elle demeurait aussi une menace destructrice certaine. En effet, les rayons ultraviolets détériorent l'ADN en modifiant les liaisons chimiques. Plusieurs stratégies, qui permettaient de s'en préserver tout en ayant la possibilité de recevoir et d'exploiter la lumière visible par photosynthèse, ont alors pu être sélectionnées, comme se réfugier dans des niches à filtres naturels (ex : dans des eaux riches en sels, par enterrement partiel dans le sable…) ou comme l'acquisition de mécanismes de réparation de l'ADN en réponse aux perturbations subies (Sghaier, Ghedira et al. 2008).

Par ailleurs, l'augmentation considérable des communautés microbiennes entraîna une demande insatiable en hydrogène qui devenait de moins en moins disponible dans l'atmosphère (il n'en reste aujourd'hui que de l'ordre de 1 ppm alors qu'il représentait plus de 90% de la composition de l'atmosphère au début de la formation de la Terre). Cependant, une grande source d'hydrogène était alors présente en quantité : l'oxyde de dihydrogène, H_2O, ou eau. Néanmoins, les liaisons H-O sont très robustes et les microorganismes ne parvenaient pas à les briser ce qui fut finalement fait par une amélioration du processus photosynthétique avec l'apparition d'un deuxième centre réactionnel pour permettre d'absorber la lumière à un niveau d'énergie supérieure (Vignais 2001). En absorbant de l'eau, ces protoprocaryotes consommaient l'hydrogène et rejetaient de l'oxygène qui s'accumula alors dans l'atmosphère passant de 0,0001 à 21%. Le microcosme dans son ensemble dut s'adapter à une telle évolution. Nombreux sont les mécanismes de protection qui se firent jour à ce moment. Mais celui qui fut un des plus

importants fut la respiration aérobie, l'assimilation de l'oxygène pour canaliser et exploiter sa réactivité élevée. Cette étape fondamentale serait également à l'origine d'une autre étape extrêmement importante : l'acquisition d'une organisation pluricellulaire à l'intérieur de laquelle certaines cellules ont développé une spécialisation en vue d'accomplir des fonctions différentes. Cette transformation se serait ensuite traduite par une compartimentation intracellulaire à l'origine de tous les eucaryotes. Il existe actuellement deux hypothèses sur l'origine des eucaryotes. Selon l'hypothèse de l'origine autogène, les cellules eucaryotes ont évolué par spécialisation de membranes internes issues à l'origine de la membrane plasmique des organismes procaryotes. Selon ce modèle, les éléments du système de membranes internes, c'est-à-dire la membrane nucléaire, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les organites limités par une membrane simple (comme les lysosomes), proviennent de la différenciation de membranes invaginées. De la même manière, les mitochondries et les chloroplastes auraient peut-être acquis leur double membrane par un processus d'invagination secondaire ou par un repliement complexe des membranes. Selon une seconde hypothèse, l'hypothèse d'une origine endosymbiotique, les cellules eucaryotes ont eu pour précurseurs des consortiums symbiotiques de cellules procaryotes. Cette hypothèse a été plus particulièrement approfondie par Lynn Margulis sur l'origine des chloroplastes et des mitochondries (Margulis and Chapman 1998). Selon ces travaux, les chloroplastes viendraient de procaryotes photosynthétiques qui vivaient en tant qu'endosymbiontes à l'intérieur de cellules plus grandes. Les mitochondries quant à elles, proviendraient de bactéries endosymbiotiques qui étaient des hétérotrophes aérobies. Ce serait sous forme de proie non-digérée ou de parasites internes que de telles cellules auraient pu réussir à pénétrer une cellule plus grosse. Pour étayer leur hypothèse, les partisans de l'endosymbiose citent les similitudes de structure et de fonction que présentent les bactéries avec les chloroplastes et mitochondries des cellules eucaryotes. En effet, les mitochondries et les chloroplastes se reproduisent par un processus de segmentation faisant penser à la scissiparité des bactéries. De plus, ces organites possèdent, comme les procaryotes, un ADN circulaire non associé à des histones ou à d'autres protéines. Enfin, ils contiennent également l'ARN de transfert, les ribosomes et des molécules nécessaires à la transcription de l'ADN et à la traduction de leur ARN en protéines.

Ainsi, les organismes procaryotes seraient à l'origine de l'ensemble de la complexité du vivant. Au cours de l'Evolution, ils ont su se pérenniser par la sélection de mécanismes innovants et occuper la totalité des niches écologiques terrestres aussi extrêmes soient-elles. Les microorganismes affectent aujourd'hui tous les domaines de la Vie. En effet, dans l'environnement ils assurent le recyclage du carbone, de l'azote et du phosphore composants essentiels aux organismes vivants. Ils maintiennent la fertilité des sols et peuvent être utilisés

pour éliminer les composants toxiques de l'environnement par des techniques dites de bioremédiation. Dans la médecine, la capacité de certains microbes à provoquer des maladies comme la variole (*Pox virus*), le choléra (*Vibrio cholerae*) ou encore le paludisme (*Plasmodium*) est bien connue. Cependant, il est à noter que si les microorganismes peuvent constituer des agents pathogènes redoutables, c'est également des microorganismes qui nous ont fourni les moyens de les contrôler avec les antibiotiques. Dans l'alimentation, les microorganismes sont utilisés depuis des centaines d'années pour la fabrication du vin, du fromage, du pain… Dans les domaines de la biotechnologie, les microorganismes sont utilisés pour synthétiser de nombreux produits chimiques importants comme l'acétone et l'acide acétique… On les trouve également en association avec les plantes notamment pour la fixation de l'azote, avec les vaches et les termites qui ne peuvent digérer la cellulose de l'herbe et du bois sans leur communauté microbienne, de même qu'avec l'homme où elle représente 10% du poids sec d'un individu adulte.

Aussi, compte tenu de leur rôle dans le processus évolutif de tous les êtres vivants ainsi que dans le fonctionnement des écosystèmes, l'étude des microorganismes revêt une importance toute particulière. Le développement de différents outils d'analyses de la diversité microbienne en donne de formidables moyens.

IV.2. Les outils d'analyses de la diversité du monde microbien

IV.2.1. Les outils d'analyse classique de la diversité microbienne

Le microscope a constitué le premier outil d'analyse de la diversité microbienne en mettant à jour la grande variété de formes de ces organismes. Cependant, s'il a permis de différencier certains genres de bactéries, le microscope s'est rapidement heurté au manque de caractères morphologiques distinctifs chez les microorganismes. Le développement des techniques de culture en milieu solide mises au point par Koch a permis d'aller beaucoup plus loin dans la distinction des différentes espèces microbiennes. De nombreux types de milieux de culture ont été élaborés pour favoriser la multiplication d'un grand nombre d'espèces différentes ou pour sélectionner un genre bactérien ou une famille particulière afin de l'étudier de manière plus spécifique. Parmi ces milieux peuvent être cités :

- Les milieux minimum comportant les éléments chimiques strictement nécessaires à la croissance bactérienne, sous une forme utilisable par des bactéries n'ayant pas d'exigence particulière. Un tel milieu contient généralement des sources de carbone et d'énergie comme le glucose, des sources de potassium, de phosphore, d'azote, de souffre, de magnésium, de calcium et de fer. Il contient également des oligo-éléments tels que du cuivre et du zinc.

- Les milieux synthétiques dont la composition chimique est parfaitement maîtrisée tant d'un point de vue qualitatif que quantitatif. Ceux-ci sont généralement utilisés dans l'étude de réactions enzymatiques précises. Ainsi, par exemple, le milieu tryptophane est employé pour révéler la présence de l'enzyme tryptophanase par la production d'indole qui induit un changement de coloration du milieu (Fig. 27).

Figure 27 : Photos de différentes cultures en milieux synthétiques permettant l'étude de réactions enzymatiques par changement de coloration du milieu. (Source : Entreprise AES Chemunex).

- Les milieux semi-synthétiques dont la composition exacte n'est maîtrisée que pour un certain nombre de composants.

- Les milieux empiriques dont la composition n'est pas exactement déterminée. Ainsi, les milieux type cœur-cervelle contiennent de l'eau stérile, de l'agar-agar, de l'hydrolysat de cœur et de cervelle sans que les aspects qualitatifs et quantitatifs en soient parfaitement connus.

- Les milieux sélectifs qui permettent la culture de certains genres de microorganismes. Pour ce faire, des éléments inhibant la croissance de bactéries non désirées, comme le chlorure de sodium, le thiosulfate de sodium ou encore le cristal violet sont ajoutés dans la solution de préparation du milieu. Parmi ceux-ci peuvent être cités : le milieu S-S qui ne permet que la croissance des Salmonelles et des Shigella, le milieu de Sabouraud qui sélectionne les mycètes ou encore le milieu KV contenant deux antibiotiques, la Kanamycine empêchant la croissance des Entérobactéries et la Vancomycine empêchant la croissance des bactéries gram-positives.

- Les milieux de culture enrichis qui contiennent, outre les éléments de base, des composants indispensables aux bactéries mais qu'elles ne peuvent synthétiser. Ces milieux sont généralement réalisés à base de sang frais, riche en nutriments divers, ou avec du jaune d'œuf.

Au-delà de mieux connaitre les différentes espèces bactériennes et de caractériser les réactions enzymatiques, les cultures en milieux fermés ont également permis d'étudier les cinétiques de croissance de ces microorganismes. Les courbes de croissance des microorganismes sont ainsi bien connues notamment depuis les travaux de Buchanan, Winogradsky et Monod (Fig. 28).

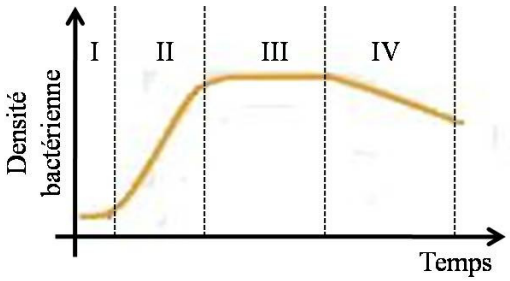


Figure 28 : Les différentes phases de la croissance bactérienne en culture sur milieu fermé. I) Phase de latence. II) Phase de croissance exponentielle. III) Phase maximale stationnaire. IV) Phase de décroissance (d'après Buchanan, 1918).

Ainsi, des microorganismes en culture sur milieu fermé présentent une cinétique pouvant être décomposée en plusieurs phases :

- La phase de latence, qui correspond à une absence apparente d'augmentation de la biomasse. Cette situation reflète des situations individuelles variées : (i) Le passage brutal du milieu carencé dans lequel se trouvent les microorganismes de l'inoculum à un milieu neuf et riche nécessite une première adaptation des cellules qui doivent ajuster leur physiologie à ce nouvel environnement. Cette adaptation nécessite l'activation ou la synthèse de certains composants cellulaires, notamment de protéines enzymatiques, synthèse qui n'est pas immédiate mais requiert un certain temps (ii) L'inoculum peut être tellement appauvri que certaines cellules sont incapables de restaurer leurs capacités métaboliques. La stagnation de la biomasse refléterait alors le temps nécessaire à ce que les cellules viables, plus ou moins nombreuses, se divisent pour compenser les pertes par mortalité cellulaire. C'est notamment en raison de cette hypothèse que certains auteurs préfèrent parler de « phase de latence apparente » défini par Fogg (1965).

- La phase de croissance exponentielle correspondant à une augmentation de la biomasse du fait que les cellules non-viables sont progressivement submergées par la croissance des cellules viables.

- La phase maximale stationnaire caractérisée par un taux de croissance constant et maximal. C'est au cours de cette phase que peut être évalué le taux de croissance de l'espèce pour les conditions nutritionnelles du milieu.

- La phase de décroissance où le taux de croissance commence à diminuer par la raréfaction d'un substrat limitant du milieu de culture au sens de la loi du minimum (von Liebig, 1840) : la croissance est en effet limitée par un élément dont la concentration devient inférieure à une valeur minimum en dessous de laquelle les synthèses métaboliques ne peuvent plus être réalisées.

Les trois principales caractéristiques des courbes de croissance que sont : la durée de la phase de latence, la pente de la droite de croissance exponentielle et la concentration maximale atteinte en fin de croissance sont toutes indépendantes les unes des autres. Elles évoluent en fonction des

conditions initiales, telles que la lumière, la température, la concentration initiale de ce qui deviendra le substrat limitant… et des caractéristiques physiologiques de la souche cultivée. De même, pendant la dernière phase de la dynamique d'une population microbienne (la phase de décroissance), la vitesse de croissance diminue avec la diminution du substrat limitant. Or il s'avère important de quantifier la relation exacte entre la concentration en élément limitant et le taux de croissance pour interpréter les observations dans le milieu naturel. La technique de culture en milieu fermé n'est donc sans doute pas le meilleur moyen d'établir cette relation, étant donné que, dans le milieu naturel, l'élément limitant peut se trouver à concentration invariable compte tenu des processus de diffusion.

De plus, malgré la grande diversité des milieux existants, il s'est avéré que la diversité microbienne, qui peut être révélée par des techniques de culture, est très limitée par rapport à la diversité réelle des communautés bactériennes. En effet, des écarts importants entre le dénombrement de microorganismes par le biais de microscopes et de cultures ont été observés. Il est estimé aujourd'hui que la fraction cultivable de la diversité microbienne représente seulement 0,001 à 15% de la diversité totale, cette fraction pouvant fortement varier selon les écosystèmes considérés (Tableau 4).

Tableau 4 : Pourcentage de la fraction cultivable de la diversité microbienne pour différents types d'écosystèmes. Ce pourcentage représente le nombre d'unités formant des colonies bactériennes par rapport au nombre de bactéries total dénombré par comptage direct au microscope (Amann, Snaidr et al. 1996).

Types d'écosystème	Fraction cultivable en %
Eau de mer	0,001 – 0,1
Eau douce	0,25
Lac mésotrophique	0,1 – 1
Eaux d'estuaires non pollués	0,1 – 1
Boues activées	1 – 15
Sédiments	0,25
Sol	0,3

Les causes de cette faible fraction cultivable de la diversité microbienne sont de deux ordres :

- Des difficultés à reproduire les conditions permettant la croissance bactérienne, que ce soit au niveau des paramètres physico-chimiques, environnementaux ou au niveau des relations mutualistes ou symbiotiques qui peuvent exister dans les écosystèmes naturels.

- Des phénomènes de dormance qui caractérisent des bactéries ayant perdu leur capacité à se multiplier mais présentant toujours une activité cellulaire, on parle alors d'état viable mais non cultivable (Roszak and Colwell 1987). Il est à noter que de telles bactéries peuvent redevenir cultivables, c'est-à-dire reprendre une activité de croissance, sous certaines conditions (Roszak, Grimes et al. 1984).

Ainsi, les techniques d'écologie microbienne classique conduisent à une vision très restreinte de la diversité des communautés microbiennes. Les techniques plus récentes, faisant intervenir

des approches moléculaires, ont permis d'enrichir considérablement les connaissances en écologie microbienne.

IV.2.2. Les outils d'analyse moléculaire de la diversité microbienne

Les techniques d'études des communautés microbiennes se sont considérablement développées et diversifiées avec la mise à la portée de nombreux laboratoires des outils de la biologie moléculaire. Ces derniers présentent en effet l'avantage de permettre l'étude des génomes de bactéries présentes dans un milieu donné, et non pas de leurs produits d'expression, et sont donc indépendants des conditions de culture et, parfois, de la culture même des microorganismes. Les techniques de biologie moléculaire nécessitent donc au préalable une étape d'extraction de l'ADN présent dans un échantillon donné. Différentes techniques d'extraction et de purification de l'ADN ont été testées sur différents types d'échantillons d'environnements naturels. Elles combinent généralement des méthodes de lyse chimique (détergents, phénol…) et/ou de lyse enzymatique (protéinase K, lysozyme…) et/ou de lyse physique (pilon et mortier, cycles de congélation-décongélation…). Des traitements sont ensuite appliqués pour purifier les acides nucléiques de matériaux contaminants potentiels, tels que les métaux et polymères, susceptibles d'inhiber par la suite les réactions moléculaires. Une fois l'ADN extrait et purifié, les techniques de biologie moléculaire reposent sur l'emploi de quatre outils de base :

- Des enzymes telles que des polymérases capables de copier une molécule d'acide nucléique à partir d'une matrice monobrin d'ADN ou d'ARN, ou telles que les enzymes de restriction qui reconnaissent spécifiquement des séquences du génome et sont capables de le cliver. La séquence et la taille des sites de reconnaissance, allant de quelques bases à plusieurs dizaines, définissent le nombre de sites potentiels de coupure pour une bactérie donnée. La séquence reconnue étant spécifique d'une enzyme, toute modification d'une base d'un site de reconnaissance se traduit par l'incapacité de l'enzyme à reconnaître et couper la séquence.
- L'hybridation qui permet l'appariement de molécules d'acides nucléiques monobrins. L'hybridation repose sur la complémentarité des brins qui peut être totale ou partielle et dépend fortement des conditions expérimentales, en particulier de la température et des forces ioniques appliquées (ou stringence).
- L'électrophorèse qui permet la séparation des molécules d'acides nucléiques en fonction de leur poids moléculaire, donc de leur taille, la charge de ces molécules étant uniforme ou encore en fonction de leur conformation secondaire (i.e. leur configuration tridimensionnelle).
- Le séquençage des acides nucléiques qui consiste en la détermination des séquences d'acides nucléiques qui composent tout ou partie d'un génome.

Les techniques de biologie moléculaire existantes peuvent être différenciées selon qu'est mise en jeu une reconnaissance spécifique de séquence cible ou non.

IV.2.2.1. L'amplification de l'ADN

Les techniques s'attachant à mettre en évidence des séquences spécifiques sont très variées et souvent combinatoires. Néanmoins, il en est une qui eut et a toujours une grande importance en microbiologie : l'amplification en chaîne ou PCR (pour Polymerisation Chain Reaction) mise au point à la fin des années 1980 et qui a permis de s'affranchir, dans une certaine mesure, des limitations liées à la quantité de matrice disponible en amplifiant (i.e. photocopiant) directement la séquence cible à partir d'un échantillon d'ADN total (Fig. 29).

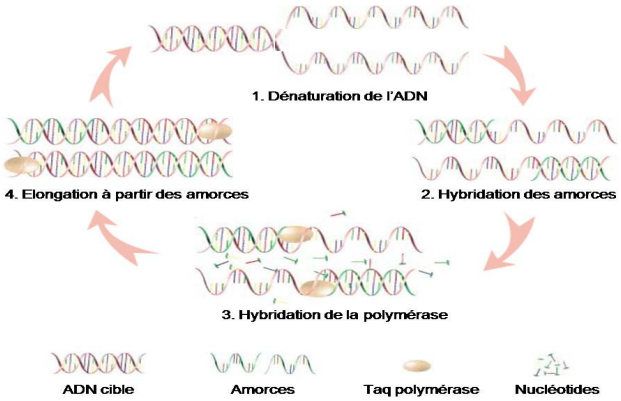


Figure 29 : Principe de l'amplification en chaîne (ou PCR) d'une séquence cible à partir d'ADN total.

Le cycle dénaturation-hybridations-élongation étant reproduit généralement 20 à 30 fois, la technique de PCR aboutit à la production en grand nombre de la séquence ciblée pouvant être ensuite visualisée sur un gel d'agarose contenant du Bromure d'Ethidium (BET). Les produits de l'amplification peuvent également être conservés et utilisés pour des applications diverses d'analyses de la diversité microbienne telles que les inventaires moléculaires et les techniques d'empreintes moléculaires.

IV.2.2.2. L'analyse de l'ADN ribosomique

La PCR permet également d'accéder à plusieurs niveaux phylogénétiques des microorganismes par l'utilisation d'amorces différentes, une amorce (ou « primer ») étant définie comme une courte séquence d'ARN ou d'ADN complémentaire du début d'une matrice et servant de point de départ de la synthèse du brin complémentaire de cette dernière par une ADN polymérase. Celles-ci peuvent être de deux types :

- Universelles : qui permettent de cibler les grands domaines microbiens.
- Spécifiques : qui visent des gènes dont la séquence est plus ou moins conservée parmi le groupe, genre ou espèce ciblé.

Parmi le grand nombre de séquences cibles possibles, les ARN ribosomaux sont rapidement apparus comme des marqueurs de choix (Fox, Pechman et al. 1977; Woese and Fox 1977). En effet, ceux-ci possèdent les avantages d'une présence universelle, d'une fonction conservée, ainsi que d'être constitués d'une alternance de domaines variables et de domaines conservés (Stackerbrandt and Rainey 1995). Cette dernière propriété permet d'avoir accès à différents niveaux de taxonomie car plus les séquences ciblées seront conservées, plus elles permettront de différencier différents organismes. Ainsi par exemple, Raskin *et al.* ont, dans leur travaux, hybridé l'ADN total de leurs échantillons avec des sondes d'ADNr 16S de spécificité croissante ce qui leur a permis de différencier les microorganismes présents depuis les grands domaines jusqu'à l'espèce (Raskin, Poulsen et al. 1994).

Les organismes procaryotes possèdent trois ADN ribosomiques classés selon leur coefficient de sédimentation : le 5S qui compte environ 120 nucléotides, le 16S qui en contient environ 1 500 et le 23S qui présente environ 3 000 nucléotides. Durant de nombreuses années, l'analyse de ces séquences ribosomiques a été cantonnée aux bactéries cultivables. Ce n'est qu'en 1985 que Norman Pace et ses collaborateurs ont proposé l'analyse du 5S et du 16S pour décrire la diversité microbienne contenue dans des échantillons issus de milieux naturels (Lane, Pace et al. 1985). Ce faisant, Pace et al. ont contribué à sortir la microbiologie des laboratoires et à donner une nouvelle importance à l'écologie microbienne. Les études ayant utilisé ces ADN ribosomiques ont révolutionné la vision de la diversité microbienne et ont par la même mis en exergue la vision partielle que pouvaient donner les outils d'analyses classiques. C'est en effet par l'analyse de ces ADN ribosomiques que la distinction fut établie entre les Bactéries et les Archées (Woese and Fox 1977).

Si les techniques moléculaires permettent d'améliorer nos connaissances sur l'évolution des espèces, elles constituent également de formidables outils pour la compréhension de la dynamique, de la diversité et de la structuration des microorganismes dans les écosystèmes complexes. Parmi la palette de ces techniques, les empreintes moléculaires sont sans aucun doute les plus efficientes pour de telles études.

IV.2.2.3. Les techniques d'empreintes moléculaires

Plusieurs techniques permettent de réaliser rapidement, par le biais d'une électrophorèse des fragments d'ADNr préalablement amplifiés par PCR, une image ou « empreinte moléculaire » des communautés microbiennes présentes dans un écosystème. La variabilité de ces fragments permettant de différencier les « espèces moléculaires » ou phylotypes à qui ils appartiennent est apportée soit par la taille soit par la séquence des fragments amplifiés selon la technique employée.

IV.2.2.3.1. Les gels d'électrophorèse à gradient de dénaturation

Les gels d'électrophorèse à gradient de dénaturation ou DGGE (pour Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) sont des outils qui permettent de discriminer des fragments d'ADN de taille identique ou très proche mais de compositions différentes. La séparation des fragments est alors basée sur leurs différences de mobilité électrophorétique lorsqu'ils sont mis à migrer dans un gel vertical de polyacrylamide contenant un gradient d'agent dénaturant (i.e. entraînant une séparation des brins d'ADN) qui peut être de la formamide et/ou de l'urée. Afin d'éviter une dénaturation totale de l'ADN, une structure à très haute température de fusion, le « GC clamp » comportant une succession de 40 GC, est associée à l'ADN lors de l'amplification. Les variations de séquences dans les zones à faible température de fusion font que des séquences différentes stopperont leur migration dans des zones différentes du gradient dénaturant (Theron and Cloete 2000). Une telle méthode permet d'obtenir une image de la communauté microbienne représentée par des bandes aux intensités différentes. En effet, la comparaison de différents profils (ou gels) permettra de décrire la diversité de la population ainsi que sa structure, chaque bande d'un profil de restriction correspondant à un phylotype (i.e. espèce au sens moléculaire) différent et l'intensité lumineuse des bandes permettant d'obtenir une indication quant à l'abondance relative de chacun de ces phylotypes (Moyer, Dobbs et al. 1994) (Fig. 30).

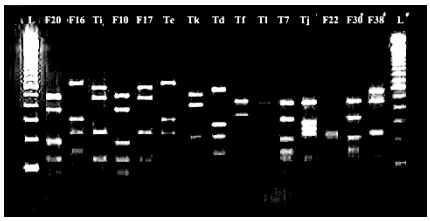


Figure 30 : Photo d'un gel d'électrophorèse permettant l'obtention d'une empreinte moléculaire d'une communauté microbienne par la technique DGGE. Chaque bande représente un phylotype différent et son intensité lumineuse permet d'obtenir une indication quant à son abondance relative.

L'un des avantages de cette méthode très sensible est que les bandes individuelles d'ADN peuvent ensuite être excisées du gel, réamplifiées puis séquencées. Des variantes de la DGGE, différant par leur type de gradient de dénaturation existent également :

- La TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) où la séparation des fragments d'ADN est réalisée grâce à un gradient de température (Muyzer 1999).
- La TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis) où la migration des fragments d'ADN se fait dans un gel possédant une concentration uniforme d'agent dénaturant et où la température augmente graduellement durant la migration (Farnleitner, Kreuzinger et al. 2000; Ogier, Son et al. 2002).

IV.2.2.3.2. L'analyse de polymorphisme de conformation secondaire

La technique d'analyse de polymorphisme de conformation d'acides nucléiques simple brin ou SSCP (pour Single Strand Conformation Polymorphism), développée pour détecter des mutations dans des gènes humains peut également être utilisée en écologie microbienne (Hayashi 1991; Godon, Zumstein et al. 1997; Schwieger and Tebbe 1998; Zumstein, Moletta et al. 2000; Godon, Duthoit et al. 2001). Après extraction des acides nucléiques totaux et amplification par PCR d'une zone variable des ADNr 16S, ceux-ci vont être dénaturés en ADN simple brin puis vont faire l'objet d'une migration par électrophorèse qui peut être réalisée sur un gel de polyacrylamide ou par capillarité à l'aide d'un séquenceur automatique. Dans ce dernier cas, la PCR est dite marquée par l'utilisation d'un fluorophore sur l'une des deux amorces utilisées. Dans des conditions non-dénaturantes, la structure secondaire de l'ADN simple brin est affectée par des interactions intramoléculaires. La mobilité électrophorétique des ADN simple brin se fera donc en fonction de leur masse moléculaire et de leur structure secondaire (Fig. 31).

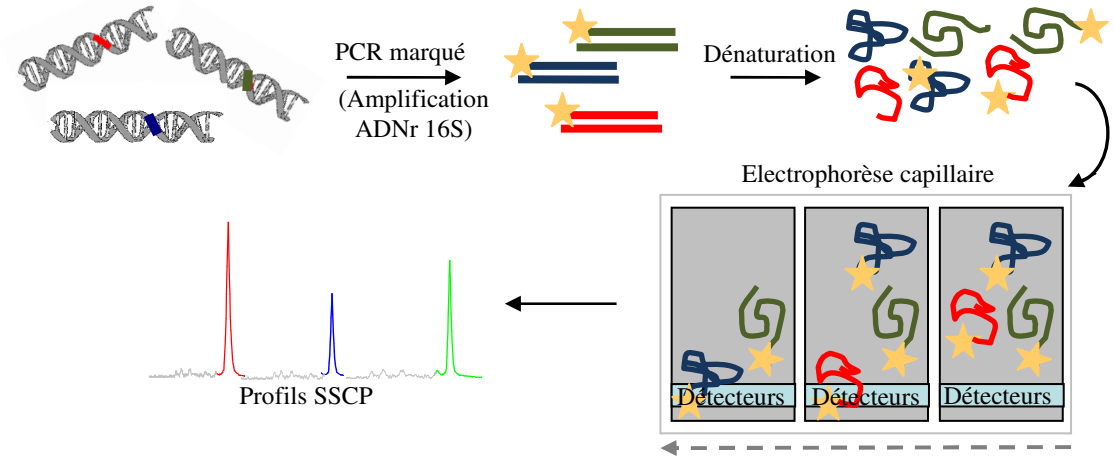


Figure 31 : Principe de la technique SSCP par électrophorèse capillaire.

De cette manière, une communauté microbienne sera représentée par un profil de pics lorsque l'électrophorèse est réalisée par capillarité ou par un profil de bandes de la même manière que les techniques précédemment citées lorsque l'électrophorèse est réalisée sur gel. Chaque pic ou bande correspond à une séquence et donc à un phylotype. De plus, l'aire de chaque pic ou l'intensité lumineuse de chaque bande donne une indication sur l'abondance de chaque « espèce » au sein de la communauté.

La séquence de l'ADNr 16S correspondant à chaque pic ou bande peut également être déterminée en comparant la distance de migration de séquences préalablement isolées par clonage à la distance de migration du profil total. La technique de SSCP est par conséquent particulièrement appropriée pour effectuer des suivis de population au sein d'un écosystème comme nous le verrons de façon plus approfondie dans la suite de cette thèse.

IV.2.2.3.3. L'analyse de fragments de restriction terminaux

La technique d'analyse de fragments de restriction terminaux ou T-RFLP (pour Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) est une méthode qui a été développée pour analyser rapidement la diversité microbienne de différents environnements (Liu, Marsh et al. 1997; Moeseneder, Arrieta et al. 1999; Lueders and Friedrich 2003). A partir d'un extrait d'acides nucléiques environnementaux, une PCR est réalisée sur une région de l'ADNr 16S, en utilisant une amorce marquée en 5' par un fluorochrome. Après amplification, le produit PCR est digéré avec une ou plusieurs enzymes de restriction, générant des fragments de diverses longueurs selon la séquence de l'ADN et la spécificité de l'enzyme. Seuls les fragments de restriction terminaux marqués avec le fluorochrome seront visualisés et mesurés par un séquenceur automatique générant des profils assez semblables à ceux obtenus par SSCP (Fig. 32).

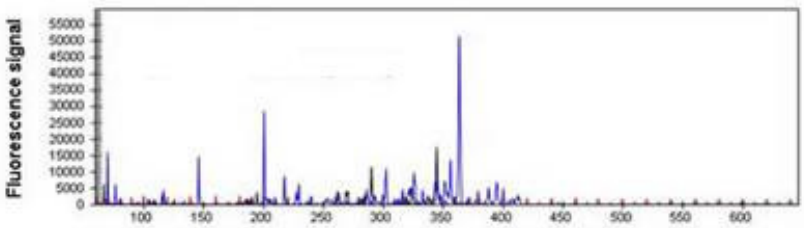


Figure 32 : Empreinte moléculaire d'une communauté microbienne par la technique T-RFLP avec séquenceur automatique. Chaque pic représente un phylotype différent et l'intensité de sa fluorescence permet d'obtenir une indication quant à son abondance relative.

L'ensemble de ces techniques d'empreintes moléculaires apparait comme un outil aux forts potentiels pour l'étude de la diversité microbienne dans un environnement donné et par là même d'améliorer nos connaissances et notre compréhension du lien diversité-fonctionnement des écosystèmes.

V. DU MONDE MICROBIEN COMME MODÈLE D'ÉTUDE EN ÉCOLOGIE

« Chaque créature vivante peut être regardée comme un microcosme, un petit univers, formé d'une légion d'organismes se propageant par eux-mêmes, inconcevablement petits et aussi nombreux que les étoiles dans le ciel »

Charles Darwin.

V.1. La pertinence du monde microbien en écologie

Le développement des outils d'analyse de la diversité microbienne ont récemment engendré un intérêt grandissant pour l'utilisation de communautés microbiennes comme modèles biologiques pour la compréhension des écosystèmes complexes et plus particulièrement concernant leur fonctionnement et leur stabilité (Jessup, Kassen et al. 2004). Néanmoins, il convient de souligner ici que de nombreux écologues demeurent toujours sceptiques quant à l'utilisation des communautés microbiennes pour la compréhension des écosystèmes et que cette démarche demeure encore largement marginale. Ceci peut être dû au structuralisme des sciences académiques qui a fait que durant de nombreuses années, l'écologie et la microbiologie constituaient deux disciplines bien distinctes sans communications de connaissances de l'une vers l'autre. Ainsi, durant tout le XXième siècle, l'écologie générale évolua sans tenir compte des études écologiques portant sur les microorganismes et l'écologie microbienne demeura pendant longtemps une sous-discipline de la microbiologie, isolée de l'écologie générale (Atlas and Bartha 1998). Finalement, ce n'est qu'à la fin du XXième siècle que de véritables ponts furent établis entre les deux disciplines (Andrews 1991). Les critiques les plus couramment émises contre l'utilisation des microorganismes en écologie sont que ceux-ci présentent une trop grande simplicité et un manque de généralité. Pour autant, cette simplicité peut constituer un indéniable atout pour mener des expérimentations qui soient plus informatives que les études faisant intervenir des systèmes plus complexes (Lawton 1995; Drake, Huxel et al. 1996). En effet, comme nous l'avons vu, les expérimentations sur des macroorganismes tels que les végétaux ou les animaux peuvent voir leurs résultats difficiles à interpréter du fait de l'effet de sélection ou d'échantillonnage (cf. chapitre III.3.1.). De plus, les macroorganismes présentent généralement des temps de génération longs et contraignants notamment lorsqu'il s'agit d'étudier la stabilité d'un écosystème. Enfin, les travaux réalisés sur des macroorganismes demandent généralement de grands espaces, typiquement à l'échelle de champs lorsqu'il s'agit d'études sur des communautés végétales, dans lesquels il est difficile de contrôler les paramètres environnementaux du milieu. Les microorganismes constituent une bonne alternative à l'ensemble de ces limitations. En effet, leur petite taille permet de travailler avec des millions

d'individus et des dizaines voire des centaines d'espèces dans un volume très restreint qu'il est beaucoup plus facile de maîtriser en termes de paramètres abiotiques. Aussi, de plus en plus d'études sont réalisées en utilisant les microorganismes comme modèle biologique pour répondre à des questions d'écologie générale. Ainsi peuvent être cités les travaux de Kerr et al. sur la coexistence de plusieurs espèces en compétition sur un même substrat (Kerr, Riley et al. 2002). Ces auteurs, qui ont étudié la coexistence de trois souches d'*E. coli* : l'une produisant une toxine, l'autre étant sensible à cette toxine et la dernière y étant résistante, ont mis en évidence l'importance de la structuration spatiale et des interactions locales dans le maintien de la diversité. D'autres travaux ont également été réalisés sur la relation diversité-productivité des écosystèmes et ont révélé une corrélation positive même si les mécanismes sous-jacents à ce lien sont encore mal définis (Bohannan and Lenski 2000; Travisano and Rainey 2000; Horner-Devine, Leibold et al. 2003).

Ainsi, l'Ecologie microbienne semble être en mesure d'apporter des éléments de réponse pertinents en Ecologie générale notamment par l'association des outils d'analyse moléculaire de la diversité microbienne avec les réacteurs biologiques qui permettent la culture de microorganismes sur de longues périodes de temps tout en assurant une très bonne maîtrise des paramètres expérimentaux.

V.2. Les réacteurs biologiques, des microcosmes sous contrôle

V.2.1. Le principe des réacteurs biologiques

Les réacteurs biologiques sont des dispositifs permettant la croissance de micro-organismes (Fig. 33). Ils constituent des microcosmes contrôlés dont les flux de matière à l'entrée et à la sortie sont maîtrisés.

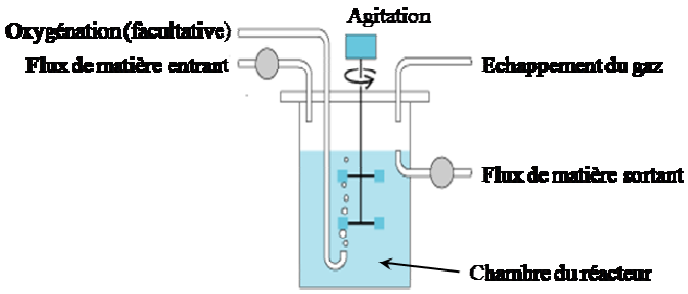


Figure 33 : Schéma d'un réacteur biologique.

Plusieurs composants peuvent être distingués dans un réacteur biologique :

- Les substrats qui sont nécessaires à la croissance des micro-organismes (flux de matière entrant). En effet, pour soutenir la croissance, le milieu de culture contenu dans la chambre du réacteur doit contenir tous les éléments nécessaires. En général, nombre de ces éléments sont ajoutés en excès de manière à ce qu'ils ne limitent pas la croissance.

- Les organismes s'y développant et pouvant être de nature très différente comme des bactéries, du phytoplancton, des champignons, des levures… La majorité des procédés biologiques développés à l'échelle industrielle utilisent des cultures microbiennes composées d'une seule espèce de micro-organisme (culture pure). Concernant les procédés de dépollution, il s'agit principalement de microorganismes issus d'un écosystème complexe qui peut donc compter jusqu'à plus d'une centaine d'espèces.

- Les produits des réactions biochimiques synthétisés par les micro-organismes. Ces composés sont utilisés dans divers domaines de l'industrie : agro-alimentaire (huiles, fromage, bières, vins…), chimique (solvants, enzymes, colorants…), pharmaceutique (antibiotiques, hormones, vitamines…) également pour la production de bio-énergie (éthanol, biogaz…). Dans les études écologiques, ces composés permettent de suivre l'activité des micro-organismes en relation avec d'autres paramètres tels que les conditions opératoires (température, pH…) ou encore les interactions liant les espèces entre elles…

- Les catalyseurs qui ne sont ni produits ni consommés au cours de la réaction mais qui sont nécessaires pour qu'elle puisse avoir lieu.

V.2.2. Le fonctionnement des réacteurs biologiques

La chambre du réacteur biologique où se développent les micro-organismes est remplie par un milieu de culture (flux de matière entrant) avec un débit noté Q_{in} et se vide (flux de matière sortant) avec un débit noté Q_{out}. Ces deux débits peuvent être choisis par l'expérimentateur ou peuvent résulter d'une loi de contrôle (auquel cas les valeurs des débits dépendront de l'état du système). Trois grands modes d'alimentation peuvent être distingués.

V.2.2.1. Le fonctionnement discontinu des réacteurs biologiques

En mode discontinu (ou « batch »), le réacteur biologique est fermé et garde un volume constant en l'absence d'entrée et de sortie de matière. Les espèces sont introduites à l'instant initial (inoculation) ainsi que les nutriments et les précurseurs nécessaires. L'avantage de cette approche est qu'elle limite la contamination par d'autres micro-organismes et permet donc de rester plus longtemps dans des conditions axéniques.

Un inconvénient majeur est que les moyens d'action sur de tels systèmes sont limités. En effet, l'absence de renouvellement de la culture restreint les possibilités d'échantillonnage à moins d'utiliser des enceintes de très grand volume qui s'avèrent peu pratiques. De plus, les substrats du milieu s'épuisant au cours du temps et engendrant des modifications physico-chimiques, l'identification des causes de changement démographique des espèces présentes est rendue difficile.

Néanmoins, du fait de sa simplicité, les réacteurs biologiques en batch sont les plus utilisés dans l'industrie notamment en vue de la production d'un métabolite ou de biomasse.

V.2.2.2. Le fonctionnement semi-discontinu des réacteurs biologiques

De même que dans le cadre des réacteurs biologiques fermés (batch), la durée d'une expérience dans un réacteur semi-continu est limitée. En effet, la culture est ici alimentée de son volume de départ V_0 jusqu'à son volume final V_f à l'instant final t_f. Ainsi, s'il y a flux entrant de matière dans les réacteurs semi-continus, la sortie est nulle durant le temps de l'expérience. Ce mode de fonctionnement permet un meilleur contrôle des conditions de croissance, le réacteur étant le plus souvent alimenté par un débit contrôlé en boucle fermée.

V.2.2.3. Le fonctionnement continu des réacteurs biologiques

Le fonctionnement en continu des réacteurs biologiques est le plus largement répandu dans le domaine de la dépollution biologique de l'eau. Caractérisé par un volume constant dans la chambre du réacteur, le soutirage de milieu réactionnel (flux de matière sortant) est réglé de manière à être égal au flux d'alimentation en matière nutritive. Ce mode de fonctionnement laisse une grande latitude pour appliquer des techniques de contrôle des procédés. De plus, il est possible de réaliser des prélèvements importants tout en limitant l'utilisation de grands volumes peu pratiques d'un point de vue expérimental.

Les réacteurs biologiques fonctionnant en régime continu sont également appelés « chémostats » dont le concepteur fut principalement Szilàrd dans les années 1950. En effet, alors que Jacques Monod étudiait les cinétiques de croissance d'*Escherichia coli* sur un milieu de culture contenant à la fois du glucose et du lactose comme source carbonée, Szilárd lui suggéra de fournir de manière continue les deux sucres à la vitesse où les bactéries les consomment (Monod 1950). De cette manière, il pourrait savoir si l'utilisation de l'un des sucres exclut l'utilisation de l'autre. C'est pour tester cette hypothèse que Szilárd inventa le chémostat dans lequel les concentrations de glucose et/ou de lactose peuvent être maintenues constantes (Novick and Szilard 1950).

Les réacteurs biologiques en continu apparaissent comme des outils pertinents pour l'étude de la croissance des micro-organismes et de leurs interactions d'autant plus que les réactions s'y produisant peuvent être aisément modélisables.

V.3. La modélisation des systèmes microbiens en chémostat

V.3.1. L'importance du schéma réactionnel et du bilan de matière

Comme nous l'avons vu, les chémostats sont des systèmes relativement simples faits d'un flux de matières entrant, de microorganismes qui consomment le(s) substrat(s) à l'intérieur de la

chambre et d'un flux de matière sortant. Ainsi, la modélisation d'un chémostat doit prendre en considération deux éléments : la partie physique décrivant les flux de matière dus à la circulation du liquide, et la partie microbienne qui représente les processus biologiques ayant lieu à l'intérieur du chémostat. Afin de garantir une certaine robustesse, le travail de modélisation d'un tel système doit, au même titre que tous les systèmes physiques, respecter la loi de conservation de la matière édictée par Lavoisier : « Rien ne se perd, rien ne se crée, tout se transforme ». Ceci nécessite donc de bien considérer le schéma réactionnel sur lequel le modèle sera construit.

Le schéma réactionnel d'un système biochimique est une manière synthétique de représenter au niveau macroscopique l'ensemble des flux de matière parcourant le système. Pour ce faire, un formalisme semblable à celui de la chimie est adopté en définissant simplement la transformation de « N_s » substrats « S_i » entrant en « N_p » produits « P_i » sous la forme (Bastin and Dochain 1990) :

$$Y_1 S_1 + \cdots + Y_{N_s} S_{N_s} \rightarrow Y'_1 P_1 + \cdots + Y'_{N_P} S_{N_P}$$

où « Yi » et « Y'i » sont des coefficients stœchiométriques incluant les rendements. Par convention, la vitesse à laquelle la réaction se réalise est définie par la vitesse de croissance de la biomasse impliquée, biomasse qui constitue, dans le cadre d'une réaction biologique, un des produits du système.

Ainsi, un schéma réactionnel est en fait une manière synthétique de résumer au niveau macroscopique un ensemble de réactions qui sont supposées déterminer la dynamique du procédé. A la différence de la chimie, tous les composés intervenant dans la réaction ne sont pas représentés, il apparaît en effet difficile de faire un bilan complet de tous les composés entrant dans la composition du milieu de culture et nécessaires à la croissance des microorganismes. Aussi, le réseau réactionnel est donc le plus souvent fondé sur des hypothèses liées aux connaissances phénoménologiques disponibles.

Le choix du nombre de réactions à prendre en compte est très important pour la pertinence du travail de modélisation en fonction de la question que l'on se pose, de l'objectif du modèle ainsi que des connaissances qualitatives et quantitatives dont on dispose sur le système. En général, trois types de situations peuvent être distingués (Bernard 2004) :

- Le réseau réactionnel est parfaitement connu. C'est par exemple le cas de réactions chimiques clairement identifiées.
- Le réseau réactionnel est connu mais beaucoup trop compliqué par rapport aux mesures qui peuvent être réalisées sur le système.
- Le schéma réactionnel est inconnu ou connu avec incertitude.

Dans les deux derniers cas, il sera alors nécessaire d'identifier un réseau réactionnel approché qui synthétisera les principaux transferts de matière au sein du système. La complexité retenue impliquera en particulier un choix dans le nombre d'éléments chimiques et le nombre d' « espèces » microbiennes considéré. En général, ces « espèces » sont une abstraction dans le sens qu'elles représentent un agrégat ou communauté d'espèces.

Ainsi, avant de commencer le travail de modélisation à proprement parler, il est nécessaire de bien penser le schéma réactionnel qui va être utilisé tout en gardant à l'esprit les hypothèses qu'il induit.

V.3.2. La modélisation d'une population microbienne dans un chémostat

V.3.2.1. La présentation du modèle proposé par Monod

C'est à Jacques Monod (1910-1976) que l'on doit la première modélisation d'une population microbienne dans un chémostat (Monod 1950).

Soit « x(t) » la biomasse totale en microorganismes et « S(t) » la concentration en substrat à l'instant « t », le modèle de Monod, qui décrit la dynamique de ces deux variables et qui est un modèle déterministe composé de deux équations différentielles, s'écrit de la façon suivante :

$$\frac{dx}{dt} = x(\mu(S) - D)$$

$$\frac{dS}{dt} = D(S_{in} - S) - \frac{\mu(S)x}{Y}$$

où « μ(S) » correspond au taux de croissance de la biomasse (dépendant du substrat), « Y » est le coefficient de rendement de la biomasse, « S_{in} » est la concentration de substrat entrant dans le chemostat et « D » correspond au taux de dilution. On peut relever que ces équations correspondent à la modélisation d'un système proie-prédateur avec un taux de migration de proies constant dans le système.

« D » est également appelé le taux de renouvellement du milieu, il est donné par la relation : D=Q/V où Q est le volume de milieu qui s'écoule dans et hors du réacteur de culture par unité de temps et V est le volume utile (i.e. volume occupé par le milieu de culture) du réacteur.

« Y », le coefficient de rendement de la biomasse microbienne est supposé constant dans le modèle de Monod. Ce coefficient qui mesure la quantité de biomasse produite par unité de substrat consommé, est donné par la définition suivante :

$$Y = \frac{x}{S_{in} - S}$$

La vitesse de croissance de la biomasse est ici censée ne dépendre que du substrat limitant et Monod a choisi la forme hyperbolique suivante :

$$\mu(S) = \mu_{max}\frac{S}{K+S}$$

où « μ_{max} » est la vitesse de croissance spécifique maximale, assimilée à une constante, et « K » est la constante de demi-saturation pour la croissance qui traduit l'affinité de la cellule pour le substrat « S ». Cette fonction de croissance μ(S) est également connue sous le nom de fonction de Michaelis-Menten, introduite par ces deux auteurs au début du XXième siécle pour représenter une cinétique enzymatique.

V.3.2.2. Les fonctions de croissance des microorganismes

La fonction de croissance d'un organisme est un processus clé pour tout être vivant. Néanmoins, il semble que, même pour des systèmes extrêmement simples, il n'existe pas une fonction universelle permettant de décrire correctement la consommation. Ainsi, si le modèle de Monod, qui utilise une fonction de croissance substrat-dépendante, s'avère particulièrement bien adapté à la description de cultures monospécifiques sur des substrats simples, il présente des résultats moins satisfaisants lorsqu'il s'agit de décrire les cinétiques de plusieurs espèces bactériennes en croissance sur un substrat complexe. Il existe de très nombreuses autres relations algébriques qui ont été établies pour décrire les cinétiques de croissance des microorganismes. Certains modèles tiennent compte de l'influence de la température, du pH, de la concentration en co-métabolite… (Bailey and Ollis 1986; Dochain 1986; Bastin and Dochain 1990; Stephanopoulos, Aristidou et al. 1998).

La fonction de croissance ratio-dépendante introduite par Contois en 1959 peut également constituer une alternative à la fonction de croissance proie-dépendante de Monod. En effet, Contois fut le premier à suggérer que K ne soit pas une constante mais proportionnelle à la densité de population du consommateur (Contois 1959). Il s'agit alors d'un cas particulier d'une fonction de croissance qui dépend du ratio de substrat par organisme s'écrivant :

$$\mu(S,X) = \mu_{max}\frac{S}{KX+S}$$

Plusieurs résultats expérimentaux ont montré que le modèle de Contois présentait des résultats plus satisfaisants que le modèle de Monod dans un contexte de cultures mixtes dans un milieu contenant des substrats divers et variés (Jost 2000). Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces observations. L'une d'entre elles est de considérer l'existence d'une hétérogénéité locale du substrat au voisinage de la cellule conduisant à une limitation de l'accès au substrat par la biomasse (Lobry and Harmand 2004). Il semble que ce soit cette première hypothèse qui ait conduit Contois à élaborer sa fonction de croissance. En effet, dans son article de 1959, Contois fait référence aux travaux de Pearl et Parker (1922), de Greenleaf (1926) ou

encore de Bail (1929), qui se sont justement intéressés à l'influence de cette hétérogénéité spatiale (Pearl and Parker 1922; Greenleaf 1926; Bail 1929). Une seconde hypothèse est l'accumulation dans le milieu de produits métaboliques qui inhibent la croissance. De tels phénomènes d'inhibition, bien qu'ils puissent être décrits de manière indirecte par la fonction de Contois, ont fait l'objet d'une modélisation plus particulière par l'expression de Haldane, introduite dans le cas des réactions enzymatiques et reprise par Andrews dans le cas des réactions biologiques (Andrews 1968) :

$$\mu(S) = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S + {S^2}/{K_i}}$$

avec « K_i » la constante d'inhibition exprimée en g/L.

Bien qu'il existe une grande quantité de fonctions de croissance différentes, la fonction de Monod reste la plus utilisée en microbiologie car les paramètres y intervenant sont relativement faciles à estimer par une approche expérimentale et à analyser d'un point de vue mathématique.

V.3.2.3. L'analyse du modèle proposé par Monod

L'état stationnaire du système proposé par Monod est obtenu lorsque les équations du modèle sont nulles. Concernant la partie biologique, un état stationnaire intervient donc quand :

$$\frac{dx}{dt} = x(\mu(S) - D) = 0 \quad \text{soit} \quad \text{lorsque} \quad x = 0 \quad \text{ou} \quad \mu(S) = D$$

Le premier état stationnaire implique donc que le chémostat soit vide de tout microorganisme. En reprenant l'équation du substrat, il est aisé de constater qu'à cette état stationnaire de la biomasse correspond l'état en substrat suivant : D(Sin-S)=0 soit Sin=S. Ainsi, en l'absence de biomasse, il n'y a pas de consommation de substrat, la concentration reste donc égale à ce qu'elle est à l'entrée.

Le second état stationnaire atteint pour μ(S)=D implique que la vitesse spécifique de croissance des microorganismes s'ajuste de manière à compenser le flux de sortie de la biomasse. L'état en substrat correspondant est défini par :

$$\mu_{max} \frac{S}{K+S} = D \text{ soit } S = \frac{DK}{\mu_{max} - D}$$

L'état en biomasse correspondant à ce second état stationnaire est défini, quant à lui, par :

$$\frac{dS}{dt} = D(S_{in} - S) - \frac{\mu(S)x}{Y} = 0 \quad \text{avec} \quad \mu(S)=D \quad \text{d'où} \quad x = Y(S_{in} - S)$$

Il n'y a alors plus d'accroissement de la biomasse en fonction du temps et la culture est à l'état d'équilibre. Le chémostat est donc un moyen élégant d'évaluer le taux de croissance d'une

espèce en fonction de la concentration instantanée en nutriment. En effet, il y a peu de chance de se trouver à l'état d'équilibre au début de la mise en culture :

- Si $\mu<D$ au début de l'expérimentation, la concentration cellulaire diminuera progressivement dans le réacteur. Dans ce cas, la concentration en nutriments dans le réacteur va augmenter ce qui va entraîner une augmentation du taux de croissance jusqu'à sa valeur maximale pour la concentration donnée. Ainsi, « μ » va tendre à se rapprocher de « D ».

- Si $\mu>D$ au début de l'expérimentation, la concentration en substrat dans le réacteur va diminuer rapidement. Dans ce cas, la croissance va diminuer ce qui va engendrer une diminution de « μ » jusqu'à égaler une valeur proche de « D ».

- Enfin, si « D » est ajustée à une valeur très élevée ou légèrement supérieure au maximum de croissance possible pour l'organisme, alors la biomasse va diminuer jusqu'à son élimination totale dans le réacteur.

V.3.3. La modélisation de plusieurs populations microbiennes dans un chémostat

A partir du modèle de Monod, il est possible de considérer un cas de compétition simple, c'est-à-dire de compétition entre deux populations (« x_1 » et « x_2 ») pour un substrat limitant unique (S), et exclusive, c'est-à-dire où aucune autre interaction n'est établie entre ces deux populations. Le système d'équations décrivant une telle relation est alors le suivant :

$$\frac{dx_1}{dt} = x_1(\mu_1(S) - D)$$

$$\frac{dx_2}{dt} = x_2(\mu_2(S) - D)$$

$$\frac{dS}{dt} = D(S_{in} - S) - \frac{\mu_1(S)x_1}{Y_1} - \frac{\mu_2(S)x_2}{Y_2}$$

avec « μ_1 » et « μ_2 », « Y_1 » et « Y_2 » correspondant respectivement aux taux de croissance et aux coefficients de rendement de « x_1 » et « x_2 ». Chacune des deux populations étant considérée ici avec une fonction de croissance de Monod soit avec un « μ_{max} » et un « K » spécifique (« μ_{max1} » et « K_1 » pour « x_1 » et « μ_{max2} » ; « K_2 » pour « x_2 »).

Un tel système peut être simplifié par l'introduction du paramètre « J » de la dimension d'une concentration et spécifique à chaque population défini par :

$$J_i = K_i \frac{D}{\mu_{max} - D} \quad \text{avec} \quad i=1 \text{ ou } 2$$

L'analyse mathématique du comportement asymptotique du système permet de démontrer qu'il existe deux équilibres possibles : le lessivage des deux populations et le lessivage d'une

seule des deux populations. En effet, si la concentration en substrat limitant dans le milieu de culture est inférieure aux deux valeurs de « J » alors les deux populations sont lessivées, sinon, la population qui se maintiendra dans le système sera celle qui présente la valeur de « J » la plus faible. Ainsi, par ce modèle, le principe d'exclusion compétitive mis en évidence par le modèle de Lotka-Volterra se vérifie de nouveau.

Il est à noter que théoriquement, la coexistence des deux populations à l'équilibre est possible si les deux populations ont des valeurs de « J » strictement égales et supérieures à la valeur de la concentration en substrat limitant dans le milieu de culture, soit lorsque :

$$K_1 \frac{D}{\mu_{max1} - D} = K_2 \frac{D}{\mu_{max2} - D}$$

Pour des valeurs fixées des paramètres μ_{max} et K, le système ci-dessus est une équation à une seule inconnue, le taux de dilution « D ».

- Si $\mu_{max1}=\mu_{max2}$ et $K_1=K_2$, c'est-à-dire si les deux populations de microorganismes ont exactement les mêmes paramètres du modèle de Monod, alors l'équation admet une infinité de solutions pour « D ».

- Si $\mu_{max1}>\mu_{max2}$ et $K_1>K_2$ ou si $\mu_{max1}<\mu_{max2}$ et $K_1<K_2$ alors l'équation n'admet aucune solution et alors il ne peut y avoir coexistence (Fig. 34, I).

- Si $\mu_{max1}<\mu_{max2}$ et $K_1>K_2$ ou si $\mu_{max1}>\mu_{max2}$ et $K_1<K_2$ alors les deux courbes représentant les deux populations par le modèle de Monod se coupent en un point unique. Il existe alors une unique valeur « D* » qui vérifie l'équation (Fig. 34, II). Néanmoins, en pratique il est très difficile de maintenir un taux de dilution à une valeur parfaitement constante. Aussi, ce dernier cas de figure est-il pratiquement irréalisable.

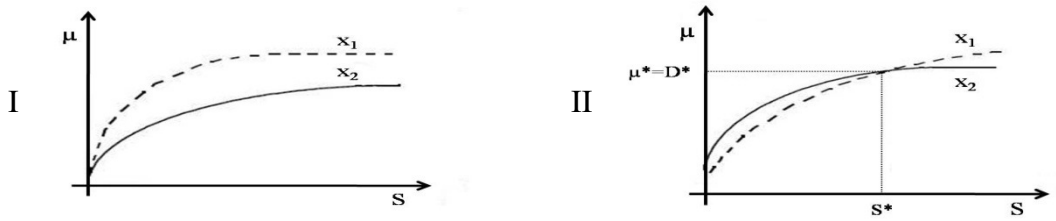


Figure 34 : Représentations des taux de croissance de deux populations en compétition pour un même substrat limitant suivant la modélisation de Monod. I. Evolution du taux de croissance en fonction du substrat quand $\mu_{max1}>\mu_{max2}$ et $K_1>K_2$ ou quand $\mu_{max1}<\mu_{max2}$ et $K_1<K_2$. II. Evolution du taux de croissance en fonction du substrat quand $\mu_{max1}<\mu_{max2}$ et $K_1>K_2$ ou quand $\mu_{max1}>\mu_{max2}$ et $K_1<K_2$ (Harder, Kuenen et al. 1977).

Des travaux expérimentaux ont confirmé qu'il était possible de faire pencher la compétition au profit de l'une ou de l'autre des deux populations en fonction du taux de dilution (Meers 1971). En effet, Meers qui étudiait une culture en chémostat de *Bacillus subtilis* et de *Candida utilis* avec du magnésium comme substrat limitant a pu modifier l'issue de la compétition en modifiant le taux de dilution. Par ailleurs, d'autres auteurs sont parvenus à faire coexister en

culture continue deux souches d'Escherichia coli ayant des paramètres de Monod différents (µmax et K) en choisissant une valeur du taux de dilution de manière à ce que la valeur de « J_1 » soit égale à celle de « J_2 » (Hansen and Hubbell 1980).

Comme nous l'avons vu lors de l'étude du modèle de Lotka-Volterra, le principe d'exclusion compétitive est remis en question par les nombreuses observations de terrain qui font part de la coexistence d'un grand nombre d'espèces sur un nombre limité de substrats conduisant à l'expression du « paradoxe du plancton ». Aussi, comme l'a proposé Arditi, un moyen de réconcilier les résultats fournis par les modèles avec les données expérimentales pourrait être d'introduire dans les modèles de compétition les autres types d'interactions pouvant s'établir entre les populations étudiées (Arditi, Michalski et al. 2005). Il s'agirait donc de rendre compte de la complexité du vivant au sein des écosystèmes et non plus de considérer seulement le cas d'une compétition simple et exclusive entre deux espèces. La représentation mathématique de ces interactions nécessite (i) de suivre simultanément la dynamique de plusieurs espèces assemblées en une communauté et les fonctions écosystémiques exprimées (ii) de déterminer « qui fait quoi » dans l'écosystème parmi toutes ces espèces assemblées afin de pouvoir réaliser une modélisation structurée de la communauté reposant sur un schéma réactionnel pertinent. Cependant, obtenir ces informations s'avère beaucoup moins évident dans le cadre du monde microbien que dans celui des macroécosystèmes. C'est ce à quoi nous avons travaillé durant cette thèse en nous appuyant sur l'étude de bactéries nitrifiantes en chémostat que nous proposons d'aborder maintenant.

De l'étude d'un écosystème microbien complexe : des bactéries nitrifiantes en chémostat

Où il sera question :

- *De la mise en place et du suivi de bactéries nitrifiantes en chémostat*
- *De la détermination du rôle fonctionnel des différentes espèces présentes dans un écosystème microbien complexe*
- *De la modélisation du maillage d'interactions au sein d'espèces assemblées dans un écosystème microbien complexe*
- *De l'influence de perturbations biotiques sur la structure et le fonctionnement de bactéries nitrifiantes en chémostat*

VI. DE LA MISE EN PLACE ET DU SUIVI DE BACTÉRIES NITRIFIANTES EN CHEMOSTAT

« L'expérience est une connaissance empirique, c'est-à-dire une connaissance qui détermine un objet par des perceptions. Elle est donc une synthèse des perceptions qui n'est pas contenue elle-même dans la perception »

Emmanuel Kant.

Dans ce présent chapitre, nous détaillerons les caractéristiques du dispositif expérimental mis en place au cours de la thèse ainsi que les mesures fonctionnelles et populationnelles réalisées sur les chemostats nitrifiants. Avant cela, nous synthétiserons les connaissances nécessaires à la compréhension de la réaction biologique étudiée. Nous présenterons plus particulièrement les acteurs de cette réaction que sont les bactéries nitrifiantes et les fonctions qu'elles réalisent au cours de la nitrification.

VI.1. La nitrification et les bactéries nitrifiantes

VI.1.1. La nitrification

La nitrification est définie comme étant la conversion de composés azotés réduits (organiques ou inorganiques) en éléments ioniques où l'azote est dans un état plus oxydé (Alexander, Marshall et al. 1960). La nitrification s'opère en deux étapes successives : une réaction de nitritation correspondant à l'oxydation de l'ammonium en nitrite suivie d'une réaction de nitratation correspondant à l'oxydation du nitrite en nitrate (Fig. 35).

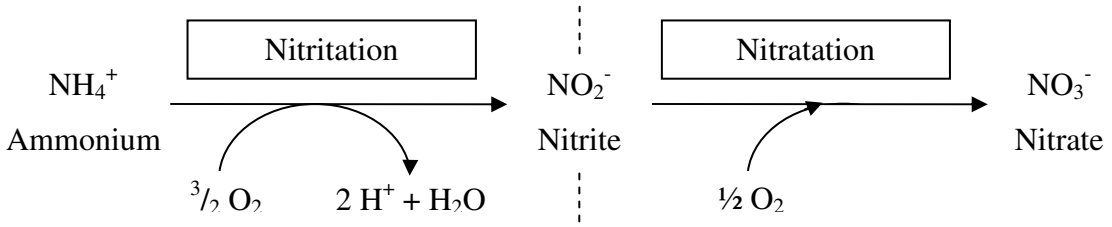


Figure 35 : Description des deux étapes successives de la réaction de nitrification : la nitritation et la nitratation.

Tandis que 95% de l'énergie libérée au cours de la nitrification sont dissipés sous forme de chaleur, les 5% restants sont utilisés pour la synthèse cellulaire des microorganismes réalisant la réaction (Schroeder 1985). Les réactions stœchiométriques pour chacune des deux étapes réactionnelles sont les suivantes :

- Nitritation : $55\ NH_4^+ + 76\ O_2 + 109\ HCO_3^- \rightarrow C_5H_7NO_2 + 54\ NO_2^- + 57\ H_2O + 104\ H_2CO_3$.

- Nitratation : $400\ NO_2^- + NH_4^+ + 4H_2CO_3 + HCO_3^- + 195\ O_2 \rightarrow C_5H_7NO_2 + 3\ H_2O + 400\ NO_3^-$

L'équation globale décrivant la nitrification est alors la suivante :

$$NH_4^+ + 1{,}86\ O_2 + 1{,}98\ HCO_3^- \rightarrow 0{,}021\ C_5H_7NO_2 + 0{,}98NO_3^- + 1{,}041\ H_2O + 1{,}88\ H_2CO_3$$

L'oxydation d'1 mg d'azote ammoniacal nécessite 4,57 mg d'oxygène soit 3,42 mg d'O_2/mg de N-NH_4^+ pour la nitritation et 1,14 mg d'O_2/mg de N-NO_2^- pour la nitratation. Ainsi, la réaction de nitrification se caractérise par une consommation importante d'oxygène pour un faible rendement en biomasse.

VI.1.2. Les bactéries nitrifiantes

Deux types de nitrification peuvent être distingués (Bock, Koops et al. 1991) :

- La nitrification lithotrophe caractérisée par l'utilisation de substrats inorganiques comme source d'énergie pour la croissance et qui concerne deux groupes de bactéries spécialisées dans cette fonction.
- La nitrification hétérotrophe réalisée par divers groupes de bactéries, de champignons et quelques algues consistant en une cooxydation non couplée à une production d'énergie.

VI.1.2.1. Les bactéries nitrifiantes lithotrophes

Les bactéries nitrifiantes lithotrophes se décomposent en deux groupes :

- Les Bactéries Oxydant l'Ammonium en nitrite (ou AOB pour Ammonium Oxydizing Bacteria), dites nitritantes et dont les noms de genres portent le préfixe « nitroso ».
- Les Bactéries Oxydant le Nitrite en nitrate (ou NOB pour Nitrite Oxydizing Bacteria), dites nitratantes et dont les noms de genres portent le préfixe « nitro ».

Il est à noter qu'il n'existe pas d'organisme connu qui puisse complètement oxyder l'ammonium en nitrate.

VI.1.2.1.1. La taxonomie des bactéries nitrifiantes lithotrophes

Les bactéries nitrifiantes lithotrophes sont de petite taille (de l'ordre du µm) appartenant à la famille des Nitrobacteraceae (Watson, Bock et al. 1989). Les bactéries peuvent avoir la forme de baguette, de sphère, d'ellipse, de lobe et peuvent être mobiles à l'aide de flagelles.

Chacun des deux groupes de bactéries nitrifiantes lithotrophes comporte plusieurs genres (Bock, Koops et al. 1989). Le groupe des nitritantes réunit les genres *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus* et *Nitrosovibrio*. Le groupe des nitratantes réunit les genres *Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrococcus* et *Nitrospira*.

C'est en 1888 que Winogradsky a isolé *Nitrosomonas* et *Nitrobacter*, bactéries nitrifiantes les plus importantes dans le sol (Winogradsky, 1888). Ces deux genres sont devenus des modèles pour l'étude des procédés nitrifiants et les bactéries nitrifiantes les plus souvent citées dans la

littérature (Schroeder 1985). Depuis, la diversité et la taxonomie des bactéries nitrifiantes ont été largement étudiées en utilisant les outils moléculaires basés sur l'ADNr 16S et ce d'autant plus qu'elles représentent l'un des rares groupes où il existe un lien phylogénie-fonction (Bothe, Jost et al. 2000; Kowalchuk, Stienstra et al. 2000). Toutes les bactéries nitrifiantes lithotrophes font partie des Protéobactéries, large groupe dont l'ancêtre présumé est photosynthétique (Teske, Alm et al. 1994). La famille des Nitrobacteraceae est polyphylétique puisque les genres la composant se répartissent parmi quatre des cinq subdivisions des Protéobactéries : alpha, beta, gamma et delta (Fig. 36). Les espèces nitritantes constituent un groupe lié dans la subdivision beta à l'exception d'une espèce du genre *Nitrosococcus* qui se trouve dans la subdivision gamma. Les espèces nitratantes se trouvent plus largement réparties dans les subdivisions alpha, gamma et delta.

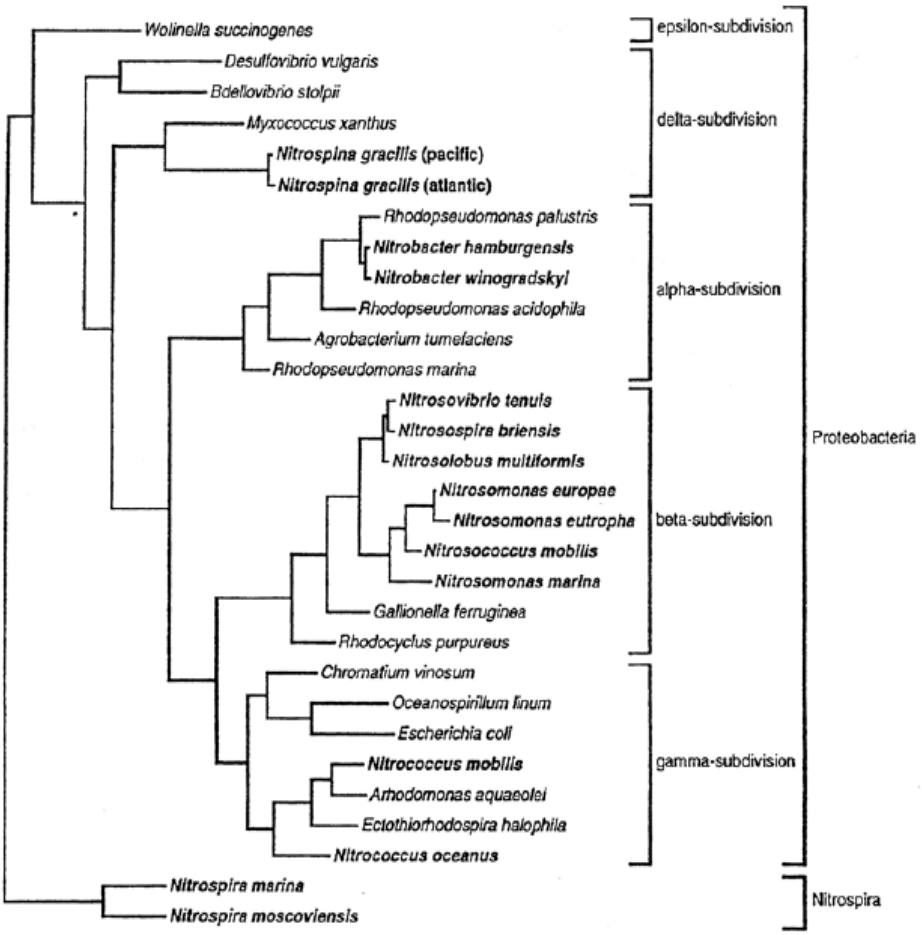


Figure 36 : Arbre phylogénétique des espèces nitrifiantes lithotrophes connues (Jetten, Logemann et al. 1997).

L'utilisation de sondes géniques pour l'analyse des communautés bactériennes dans les stations d'épuration fait apparaître que les nitritantes appartiennent au genre *Nitrosomonas* (Nogueira, Melo et al. 2002; Persson, Wik et al. 2002) et seules quelques espèces de *Nitrosospira* ont été détectées (Schramm, Debeer et al. 1998). Il est à noter que la bactérie *Nitrosococcus mobilis* retrouvée également dans les procédés de traitement des eaux est mal

nommée et appartient en fait au genre *Nitrosomonas* (Juretschko, Timmermann et al. 1998; Rowann, Moser et al. 2003). De manière similaire, les organismes nitratants détectés dans les stations d'épuration appartiennent essentiellement au genre *Nitrospira* mais le genre *Nitrobacter* a également été détecté (Daims, Nielsen et al. 2001; Wyffels, Boeckx et al. 2004).

VI.1.2.1.2. Le métabolisme des bactéries nitrifiantes lithotrophes

Les bactéries nitrifiantes ont un métabolisme autotrophe tirant leur énergie de l'oxydation de l'ammonium ou du nitrite. Une grande quantité de l'énergie générée par l'oxydation de l'ammonium ou du nitrite, environ 80%, est utilisée pour générer du pouvoir réducteur indispensable pour la fixation du CO_2 et seulement quelques pourcents sont utilisés pour la croissance cellulaire, environ 2 à 11% chez *Nitrobacter* (Bock, Koops et al. 1986). Par conséquent et même dans des conditions de culture optimales :

- Le taux de croissance spécifique des bactéries nitrifiantes est faible et le temps de génération est très long : de 7 à 24h pour les bactéries nitritantes, de 10 à 140h pour les nitratantes (Bock, Koops et al. 1991). Ceci explique que ces espèces sont souvent malaisées à isoler en culture pure car les contaminants se développent plus rapidement en utilisant les traces de matières organiques du milieu.
- Les rendements cellulaires sont faibles.
- A des taux élevés d'oxydation d'ammonium et de nitrites sont associées de faibles productions de biomasse et de faibles concentrations cellulaires.

VI.1.2.2. Les bactéries nitrifiantes hétérotrophes

La nitrification hétérotrophe consiste en la production de nitrate à partir de formes réduites, organiques ou inorganiques, de l'azote. Il s'agit alors d'une cooxydation non couplée à une production d'énergie et effectuée par divers groupes taxonomiques de bactéries, champignons et même par quelques algues (Kilham, 1986). Différentes voies biochimiques sont impliquées dans ce processus :

- Une voie inorganique suivant la réaction : $NH_4^+ \rightarrow NH_2OH \rightarrow NOH \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO_3^-$
- Une voie organique : $RNH_2 \rightarrow RNHOH \rightarrow RNO \rightarrow RNO_2 \rightarrow NO_3^-$

Aucune bactérie nitrifiante hétérotrophe ne peut croitre autotrophiquement. Par rapport à la nitrification lithotrophique, seules de faibles quantités de nitrite et de nitrate sont formées, pour autant, la nitrification hétérotrophique ne doit pas être négligée notamment si les conditions environnementales sont telles qu'elles peuvent entraîner une inhibition de la nitrification autotrophe. Parmi les hétérotrophes capables de nitrification, les champignons sont considérés comme les plus nombreux et les plus efficaces et ont fait l'objet de plusieurs études plus

particuliérement concernant *Aspergillus flavus* (Killham 1986). En milieu aquatique, la nitrification hétérotrophe est souvent le fait de bactéries dénitrifiantes très abondantes dans les sédiments (Hall 1986). L'oxydation du nitrite par des bactéries hétérotrophes comme *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*… (bactéries présentes dans les stations d'épuration) semble également fréquente sous des conditions nutritionnelles et d'oxydation convenables (Sarkai, Ikehata et al. 1996). La nitrification hétérotrophe ne peut être évaluée par des mesures d'accumulation de nitrite et nitrate car souvent une dénitrification a lieu simultanément. Les taux de nitrification hétérotrophe publiés (généralement 10^4 à 10^5 fois inférieurs à la nitrification autotrophe) sont donc vraisemblablement souvent sous-estimés (Van Niel, Arts et al. 1993). Des calculs de nitrification hétérotrophe basés sur la disparition de l'ammonium ont révélé que ce taux était en fait de 102 à 103 fois inférieur par unité de biomasse (Kuenen and Robertson 1988). Ainsi, dans les situations où les hétérotrophes surnombrent abondamment les autotrophes, comme dans les boues ou dans le sol, la part de nitrification due à ces deux types de nitrifiants peut être comparable. Dans certaines conditions, comme un pH bas, un rapport C/N élevé (i.e. > 10), ou de faibles concentrations en oxygène (< 25µM), la nitrification hétérotrophe pourrait jouer un rôle significatif par rapport à la nitrification autotrophe (Van Niel, Arts et al. 1993).

VI.1.3. Les facteurs influant le processus de nitrification

VI.1.3.1. Le taux d'oxygène dissous

L'oxygène dissous est utilisé comme accepteur final d'électrons par les bactéries nitrifiantes. La constante de demi-saturation KO_2 est cependant faible pour les AOB comme pour les NOB ce qui indique qu'il n'est pas nécessaire de maintenir des concentrations en oxygène dissous élevées dans les systèmes nitrifiants (Poduska and Andrews 1975; Sorensen and Jorgensen 1993). Les constantes de demi-saturation font également apparaître des différences d'affinité importantes pour l'oxygène suivant les espèces. Ainsi, pour de faibles concentrations, *Nitrobacter* semble présenter une plus grande sensibilité puisque aucune oxydation n'est observée en deçà de 0,2 $mg.l^{-1}$ ce qui se traduit par une accumulation de nitrite dans le milieu de culture (Painter 1970). Ces résultats sont confirmés par les travaux d'Hanaki *et al* (1990) qui ont observé une accumulation de nitrite et une augmentation du taux de croissance de *Nitrosomonas* pour des concentrations en oxygène dissous d'environ 0,5 $mg.L^{-1}$ (Hanaki, Wantawin et al. 1990). *Nitrobacter* présente donc une plus grande sensibilité à des faibles concentrations d'oxygène dissous que *Nitrosomonas*.

VI.1.3.2. Le pH

Le pH optimal donné dans la littérature pour la nitrification varie entre 7 et 9. La cinétique de la réaction diminue avec la diminution du pH. En effet, le pH agit via l'ammoniac (NH_3) et l'acide

nitreux (HNO_2) toxiques pour les micro-organismes nitrifiants et dont les concentrations sous forme libre sont dépendantes du pH (Anthonisen, Loehr et al. 1976). Ainsi à un pH élevé, la teneur en NH_3 est relativement importante du fait du déplacement de l'équilibre NH_3/NH_4^+. Inversement à pH faible, la teneur en HNO_2 devient forte du fait du déplacement de l'équilibre NO_2^-/HNO_2. Des travaux ont permis d'établir des zones de concentrations limites supportables par les micro-organismes pour les cultures en suspension (Fig. 37) (Anthonisen, Loehr et al. 1976).

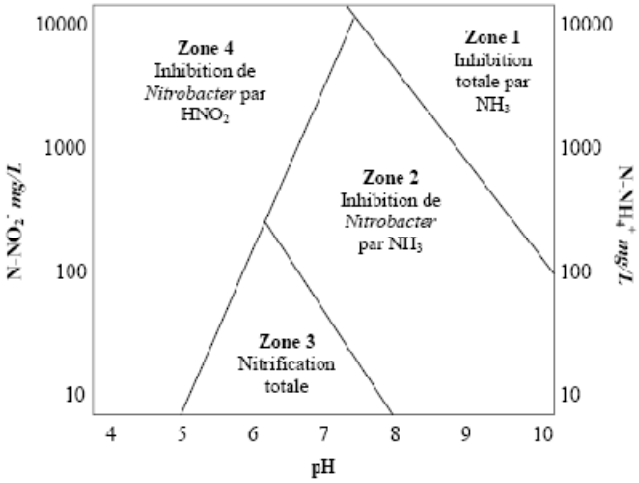


Figure 37 : Zones d'inhibitions des bactéries nitrifiantes en fonction du pH (D'après Anthonisen et al., 1976).

Il apparaît que les *Nitrobacter* sont inhibées pour des taux allant de 0,1 à 1 mg de $N\text{-}NH_3.L^{-1}$ tandis que les *Nitrosomonas* supportent de 10 jusqu'à 150 mg $N\text{-}NH_3.L^{-1}$. Les deux genres sont totalement inactivés par des concentrations comprises entre 0,22 et 2,8 mg $N\text{-}HNO_2.L^{-1}$.

VI.1.3.3. La température

La température optimale de croissance de *Nitrosomonas* se situe entre 30 et 36°C tandis que celle de *Nitrobacter* se situe entre 28 et 36°C (Knowles, Downing et al. 1965). Le taux de croissance (μ) et la constante d'affinité pour le substrat (Ks) dépendent fortement de la température. Entre 23 et 30°C, le taux de croissance maximal est multiplié par quatre pour *Nitrosomonas*. Pour les deux espèces, la vitesse maximale de croissance et l'affinité pour le substrat augmentent avec la température. Cependant, au-delà de 20°C, la vitesse maximale de croissance de *Nitrosomonas* devient supérieure à celle de *Nitrobacter*. La température influe également sur l'équilibre NH_3/NH_4^+ : pour une même valeur de pH, la concentration en NH_3 libre est plus élevée à 35°C qu'à 30°C.

VI.2. La mise en place de chémostats nitrifiants

Au cours de la thèse, des systèmes nitrifiants ont été choisis comme sujets d'étude car ceux-ci font intervenir une biodiversité « lisible » (i.e. suffisante pour être considérée comme complexe

mais insuffisante pour saturer les mesures). De plus, la nitrification est un processus bien connu et les paramètres abiotiques l'influant sont relativement faciles à maîtriser.

VI.2.1. Les caractéristiques physiques des chémostats nitrifiants

Le dispositif expérimental mis en place consiste en cinq réacteurs biologiques (notés A, B, C, D, E) fonctionnant en continu réalisant le processus de nitrification (fig. 38).

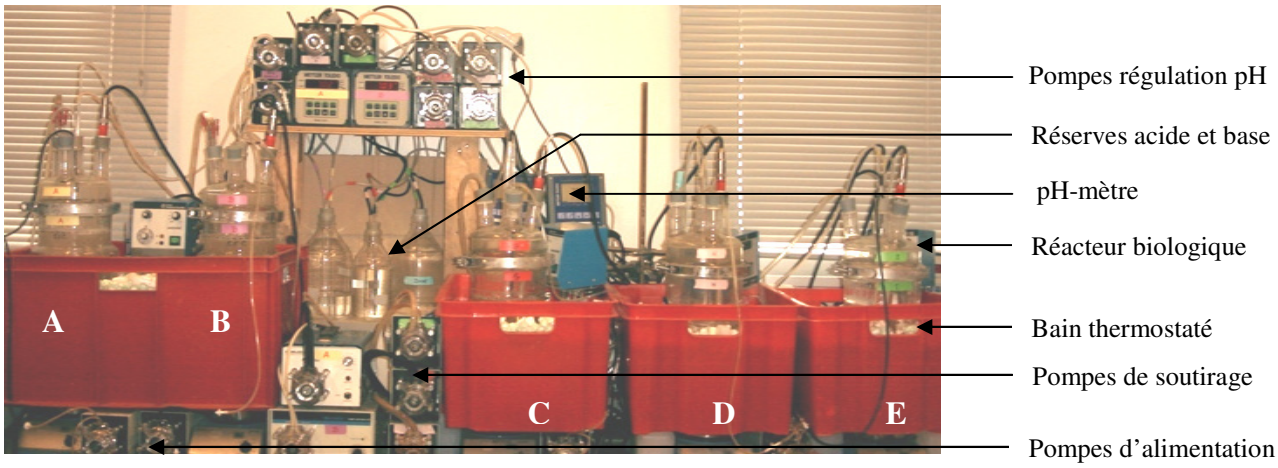


Figure 38 : Photo du dispositif expérimental comprenant cinq chémostats à nitrification.

Les cinq chémostats expérimentaux présentent une chambre d'un volume utile de 6 litres dont le contenu est maintenu à température constante par le biais de bains thermostatés. Chacun de ces cinq chémostats est équipé :

- D'une pompe péristaltique (Bioblock, Montpellier) d'entrée d'alimentation.
- D'une pompe péristaltique de soutirage permettant le maintien d'un volume constant.
- D'un pH-mètre commandant deux pompes péristaltiques : une pour addition de base en cas de baisse du pH en dessous de 7 et une pour addition d'acide en cas d'augmentation du pH au dessus de 8.
- D'une pompe à air (Bioblock, Montpellier) reliée à un bulleur plongé au cœur de la chambre.
- D'un agitateur magnétique permettant une bonne homogénéisation du milieu de culture.

Les chémostats A et B (Fig. 38, à gauche) sont des réacteurs jumeaux car soumis exactement aux mêmes conditions environnementales et partageant la même alimentation. Dans la suite de notre étude, ils constitueront le cœur du dispositif expérimental et feront l'objet d'une attention toute particulière. Le chémostat C (Fig. 38, au centre) est considéré comme un réacteur de réserve dans la mesure où il ne sera pas étudié de manière approfondie. Il permettra néanmoins de tenir à disposition de la biomasse nitrifiante en cas de problème, tel que les lessivages, des réacteurs A et B. Enfin, les réacteurs E et F (Fig. 38, à droite) feront offices de chémostats témoins. En effet, ceux-ci ne subiront pas de modifications des paramètres environnementaux,

contrairement à A et B, et permettront ainsi de comparer l'effet de ces perturbations sur le processus de nitrification ainsi que sur la dynamique des populations.

VI.2.2. Le milieu de culture des chémostats nitrifiants

Le milieu de culture utilisé consiste en une solution synthétique minérale fortement chargée en azote ammoniacal avec des concentrations variant de 0,5 à 2 g $N.L^{-1}$ (Tableau 5 et 6).

Tableau 5 : Composition de l'alimentation des réacteurs à nitrification

	Concentrations (par g $N.L^{-1}$ en charge)
$(NH_4)_2SO_4$ ($g.L^{-1}$)	4,717
K_2HPO_4 ($g.L^{-1}$)	1,4
Na_2HPO_4 ($g.L^{-1}$)	1,4
$KHCO_3$ ($g.L^{-1}$)	8
Solution minérale ($mL.L^{-1}$)	1

Tableau 6 : Composition de la solution minérale

	Concentrations ($g.L^{-1}$)
$CaCl_2$, 2 H_2O	7,3400
$MgSO_4$, 7 H_2O	30,3920
$FeCl_3$, 6 H_2O	4,8000
$MnCl_2$, 4 H_2O	1,0300
$ZnSO_4$, 7 H_2O	0,0200
$CuCl_2$, 2 H_2O	0,1120
$NaMoO_4$, 2 H_2O	0,0025

Les différents composés du milieu sont dissous avec de l'eau déminéralisée dans des bidons de 30 litres. La solution obtenue est tamponnée par des bicarbonates afin de minimiser les variations de pH nécessitant l'ajout d'acide et de base et pouvant modifier le Temps de Séjour Hydraulique. Les bidons d'alimentation sont maintenus à basse température dans des frigos d'où seuls sortent les tuyaux qui assurent l'acheminement dans les réacteurs via les pompes d'entrées à débit constant.

VI.2.3. Le choix du temps de séjour hydraulique

Le débit de l'alimentation (Q) ainsi que le volume utile (V_U) des réacteurs ont une influence directe sur le Temps de Séjour Hydraulique (TSH) des micro-organismes. Le TSH (ou Temps de séjour théorique, ou bien encore Temps de passage) est défini comme la durée pendant laquelle une bactérie va être en contact du milieu de culture au sein du réacteur avant d'être éliminée via la pompe de soutirage. Le TSH s'exprime en heures ou jours et correspond au rapport du volume utile sur le débit.

Le choix du TSH à appliquer dans les réacteurs s'avère particulièrement important dans le cadre d'un procédé. En effet, si on considère la communauté complexe présente dans un réacteur comme une somme de populations indépendantes, les populations à temps de croissance lent seront lessivées au profit des populations à croissance rapide si le TSH est trop faible. Ce phénomène est d'autant plus rapide que l'écart entre les taux de croissance est grand et le débit élevé. Or dans la réaction de nitrification, une telle différence de cinétique existe entre les espèces ammoniaques oxydantes (relativement rapides) et les espèces nitrites oxydantes (fort lentes) comme nous le verrons par la suite. Ainsi, afin de ne pas risquer de lessiver trop

rapidement les bactéries nitratantes et permettre le déroulement des deux étapes de la nitrification, un TSH de huit jours a été mis en place pour chacun des cinq réacteurs. Etant donné que le volume utile (V_U) est de 6 litres, cela se traduit par : TSH = V_U/Q soit Q=V_U/TSH soit Q = 6/8 soit la mise en place d'un débit de 0,75 L d'alimentation par jour.

VI.2.4. L'inoculation des chémostats nitrifiants

Afin d'inoculer les chémostats du dispositif expérimental, des boues activées ont été préalablement prélevées dans un bassin de la station d'épuration de Coursan (Aude, 11) qui traite l'azote par nitrification-dénitrification. Durant 10 mois, ces bactéries ont été mises en culture dans un réacteur aérobie à biomasse libre alimenté par l'effluent synthétique minéral à une charge en azote ammoniacal de 0,5 g N.L-1. Cette opération a eu pour but de sélectionner et d'enrichir la flore nitrifiante. La biomasse issue de ce premier réacteur a ensuite été utilisée pour inoculer un réacteur à lit turbulé inverse contenant de petites billes en verre servant de support de croissance aux bactéries. Le milieu de culture consistait toujours en la solution synthétique minérale mais avec une charge en azote successivement amenée à 2 $g.L^{-1}$. C'est la phase liquide de ce dernier réacteur qui a constitué l'inoculum de départ de nos chémostats.

VI.3. Le suivi fonctionnel et populationnel des chémostats nitrifiants

VI.3.1. Le suivi fonctionnel des chémostats nitrifiants

Des analyses chimiques ont été réalisées trois fois par TSH, soit environ tous les deux jours, afin de suivre l'évolution des deux étapes de la réaction de nitrification au sein des chémostats. Ces analyses ont consisté en des dosages de la concentration : en azote ammoniacal présent dans l'alimentation et résiduel dans les réacteurs ainsi que des nitrites, nitrates, phosphates, chlorures et sulfates. Pour doser ces différents anions un chromatographe DIONEX DX 100 qui permet la séparation des ions par chromatographie ionique a été utilisé. Ce dernier est équipé d'une membrane de suppression améliorée par un système d'électrolyse avec dégagement en sortie de H_2 et d'O_2. La détection se fait par conductimétrie.

Le chromatographe est équipé d'un passeur automatique d'échantillons et d'un ordinateur, une interface permet de faire la liaison entre les trois systèmes. Les colonnes utilisées sont, dans l'ordre de passage :

- NG 1, pour piéger les matières organiques et ainsi limiter la contamination de la colonne.
- AG 12A (4 mm), qui constitue la pré-colonne.
- AS 12A (4mm), qui constitue la colonne.

La colonne et la pré-colonne sont constituées de résines à base de polymères de type polystyrène qui sont sulfonatées en surface et portent une couche de micro-billes poreuses de

latex fonctionnalisé par des groupements aminés (ammonium quaternaire). Les colonnes sont suivies d'une membrane de suppression de cations (ASRS Ultra). L'éluant utilisé est un mélange carbonate-bicarbonate. Un tel système permet donc d'obtenir la concentration des différents composés formés au cours de la nitrification et permettra ainsi de rendre compte de l'activité des bactéries nitrifiantes présentes dans les chémostats.

VI.3.2. Le suivi populationnel des chémostats nitrifiants

Parallèlement aux analyses chimiques, des analyses microbiologiques et de biologie moléculaire ont été menées afin de connaître au mieux les espèces nitrifiantes présentes dans les chémostats ainsi que leur quantification relative. Les données issues des études moléculaires ont ensuite été analysées à l'aide d'un logiciel spécifiquement développé à cet effet.

VI.3.2.1. La quantification de la biomasse totale des chémostats

La quantification de la biomasse totale présente dans les chémostats a été réalisée par la technique de mesure de la masse sèche. Un volume (Ve) d'échantillon liquide est prélevé dans chaque réacteur avant d'être filtré sous vide à travers une membrane, préalablement tarée (P_1), faite en nitrate de cellulose et d'une maille de 0,2µm. La membrane est ensuite placée dans une capsule en porcelaine puis mise dans une étuve à 105°C durant 24h. A la sortie, la capsule est refroidie dans un dessiccateur afin d'assurer un retour à température ambiante sans reprise d'humidité par la membrane. Celle-ci est enfin pesée (P_2) et permet d'obtenir l'Extrait Sec Total (EST) exprimé en $g.L^{-1}$ selon la formule :

$$EST = \frac{P_2 - P_1}{V_e}$$

NB : Afin d'optimiser la précision de la mesure et de s'assurer de mesurer au mieux la biomasse totale, une EST est également effectuée régulièrement sur les alimentations des réacteurs afin d'être déduite des valeurs d'EST obtenues à partir des échantillons des réacteurs.

VI.3.2.2. La détermination des phylotypes composant la biomasse totale

La détermination et la quantification des espèces moléculaires (ou phylotypes) composant la biomasse totale met en jeux une série d'étapes : échantillonnage et conservation, extraction de l'ADN, amplification par Polymérase Chain Reaction (PCR) et Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP).

VI.3.2.2.1. La méthode de prélèvement et de conservation des échantillons

Trois fois par TSH, soit trois fois par semaine, 50 mL de milieu de culture ont été prélevés dans chacun des chémostats avant d'être centrifugés 15 minutes à 13 000 rpm. Tandis que les surnageants sont préservés pour être utilisés dans le cadre des mesures relatives à la fonction de

nitrification, les culots sont repris dans une solution de guanidine thiocyanate qui permet la dénaturation des protéines et de N-lauryol sarcosine 10% utilisé comme détergent ionique (Tableau 7).

Tableau 7 : Composition des solutions de conservation des prélèvements issus des chémostats en vue de l'extraction de l'ADN total.

Solution de guanidine	Solution de Tris-Cl	Solution de N-lauryol sarcosine
Guanidine thiocyanate : 472 g/L	TrizmaHCl : 127 g/L	Eau autoclavée
Solution de Tris-Cl : 100 mL/L	Trizmabase : 23,6 g/L	N-lauryol sarcosine
Solution à autoclaver	pH à étalonner à 7,5	Solution à ne pas autoclaver

La suspension ainsi obtenue est aliquotée dans des tubes à vis de 2 mL puis conservée à -20°C.

VI.3.2.2.2. La méthode d'extraction des ADN totaux

Le protocole détaillé de l'extraction et purification des ADN totaux est donné dans Godon *et al.* (1997). La lyse cellulaire est réalisée par chauffage (70°C durant 1 heure) puis par action mécanique de micro-billes de zirconium dans un vibro-broyeur (10 min). Les inhibiteurs d'amplification par PCR (notamment les acides humiques) sont éliminés par ajout de PolyVynilPolyPyrrolidone (PVPP). L'ADN est ensuite précipité par de l'isopropanol puis purifié sur micro-colonne du kit QIAamp (Quiagen). L'ADN ainsi extrait est conservé à -20°C. Une estimation de la qualité et de la quantité d'ADN est effectuée par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,7% - TBE 1X en présence de bromure d'éthidium (BET) permettant la visualisation de l'ADN sous UV. Le marqueur de taille Lambda DNA/*Hin dIII* est utilisé comme référence.

VI.3.2.2.3. L'amplification de la région V3 de l'ADNr 16S

Le principe de la Polymerase Chain Reaction (PCR) est utilisé pour amplifier spécifiquement un fragment d'ADN de 200 pb correspondant à la région V3 du gène de l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S). Pour ce faire, les amorces universelles bactériennes w49 et w104 (Tableau 8) ont été sélectionnées car situées dans des régions conservées encadrant la zone V3.

Tableau 8 : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification de l'ADN (F=Forward=sens ; R=Reverse=antisens).

Noms des amorces	Séquences nucléotidiques	Position dans *E. coli*
W49	5'- ACGGTCCAGACTCCTACGGG - 3'	F330
W104 (marquée)	5'- TTACCGCGGCTGCTGGCAC – 3'	R533

L'amorce w104 est marquée par une molécule fluorescente à son extrémité 5' afin de permettre la détection des brins d'ADN lors du passage en SSCP. Ces amorces sont associées à différents produits constituant le « mix PCR » (Tableau 9).

Tableau 9 : Constitution du mix PCR.

Produits	PCR-SSCP
Enzyme polymérase	Pfu Turbo 0,5 µL à 2,5 U.µL^{-1}
Eau ultrapure	36,9 µL
Tampon 10X	5 µL
dNTP 2,5 mM	4µL
Amorce sens w104 (100 ng.µL^{-1})	1,3µL
Amorce antisens w49 (100 ng.µL^{-1})	1,3µL
ADN extrait	1 µL

Le mix contenant l'ADN extrait est ensuite déposé dans de petits tubes eppendorf de 0,5mL eux-mêmes disposés dans un amplificateur dont les conditions opératoires sont préalablement réglées (Tableau 10).

Tableau 10 : Conditions opératoires de la PCR-SSCP.

Etapes	Températures	Durées
Dénaturation initiale	94°C	2 min
Dénaturation	94°C	30 s
Hybridation	61°C	30 s
Elongation	72°C	30 s
Elongation finale	72°C	10 min
Nombre total de cycles	25	

Le bon déroulement de l'amplification est vérifié par une électrophorèse sur un gel d'agarose à 2%. Les produits issus de la PCR sont conservés à -20°C avant SSCP.

VI.3.2.2.4. La discrimination par SSCP des brins d'ADN amplifiés

La discrimination des brins d'ADN amplifiés est réalisée par SSCP. Avant analyse, les fragments d'ADNr 16S, mélangés à de la formamide (Applera) et à un étalon interne (400 HD-rox, Applera), sont dénaturés par chauffage (5 min à 95°C) puis refroidis rapidement (10 min dans de l'eau glacée). Après cette renaturation soudaine, les fragments d'ADN simple brin adoptent une conformation secondaire stable qui sera la base de leur discrimination par électrophorèse capillaire. En effet, le temps de passage devant le détecteur de la machine se réalise en fonction de cette conformation. La détection se fait grâce au marquage fluorescent de l'amorce w104. L'électrophorèse est réalisée dans un séquenceur automatique (Hitachi Applied Biosystem 3130 Genetic Analyser) tandis que l'analyse des résultats se fait avec le logiciel GeneScan 3.1.

La SSCP fournit un profil électrophorétique où chaque pic correspond à un phylotype. L'aire des pics observés reflète le niveau d'amplification de l'ADN des micro-organismes correspondants. L'évaluation de l'aire de chaque pic par rapport à l'aire totale du profil permet d'estimer la proportion de la population microbienne correspondante (pic) au sein de la communauté (profil). Un programme informatique a été élaboré sous Matlab 6.5 spécifiquement

pour détecter et mesurer ces paramètres dans nos conditions expérimentales. Ainsi, par recoupement des données issues de la quantification de la biomasse totale et de la SSCP, il nous est possible de suivre la cinétique de chaque espèce présente au sein de nos réacteurs.

VI.4. La perturbation des chémostats nitrifiants

Après inoculation et à conditions environnementales fixes, une communauté nitrifiante se stabilise tant d'un point de vue populationnel que fonctionnel dans chacun des chémostats. Une fois cet équilibre « macroscopique » atteint (i.e. stabilisation des concentrations en nitrites, nitrates ainsi que de la biomasse totale), des perturbations ont été appliquées aux chémostats A et B selon deux stratégies différentes : abiotique et biotique (Fig. 39).

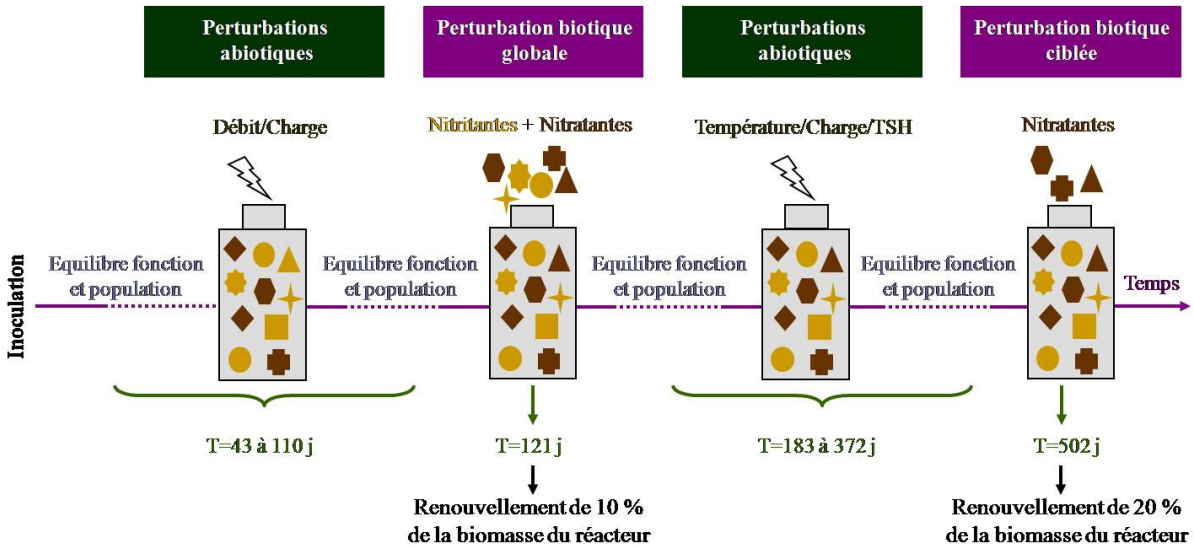


Figure 39 : Schéma représentant les différentes phases du protocole expérimental comprenant des perturbations ciblées ainsi que des perturbations globales biotiques et abiotiques.

VI.4.1. Les perturbations abiotiques des chémostats nitrifiants

Deux sessions de perturbations abiotiques ont été réalisées durant la cinétique expérimentale qui a duré 525 jours. Celles-ci ont consisté en des variations du débit d'alimentation, de la concentration en azote ammoniacal en entrée des chémostats, de la température, du temps de séjour hydraulique.

VI.4.2. Les perturbations biotiques des chémostats nitrifiants

VI.4.2.1. La perturbation biotique globale des chémostats nitrifiants

A t = 121 (soit 121 jours après inoculation), une perturbation biotique globale a été appliquée sur les deux chémostats expérimentaux A et B qui présentaient alors une stabilité fonctionnelle et populationnelle semblable. La perturbation a consisté en l'introduction d'une biomasse issue du réacteur de réserve C quantitativement proche (de l'ordre de 20 x 10^{11} bactéries) de celle présente dans A et B mais présentant une diversité biologique fortement différente (Tableau 11).

Tableau 11 : Récapitulatif des conditions environnementales, de la communauté installée ainsi que des fonctions exprimées pour les chémostats A, B et C juste avant perturbation globale effectuée à t = 121 j.

	Chémostat A	*Chémostat B*	*Chémostat C*
Environnement	T°C = 30°C pH ≈ 7,00 S_{in} = 1 g $N.L^{-1}$	T°C = 30°C pH ≈ 7,00 S_{in} = 1 g $N.L^{-1}$	T°C = 30°C pH ≈ 8,00 S_{in} = 1 g $N.L^{-1}$
Population			
Fonction exprimée	Nitrite	Nitrite	Nitrite et nitrate

Au cours de cette perturbation biotique globale, 20% de la biomasse totale de chacun des réacteurs expérimentaux A et B ont été remplacés par une quantité équivalente de la biomasse du réacteur de réserve.

VI.4.2.2. La perturbation biotique ciblée des chémostats nitrifiants

A t=502 j, une perturbation ciblée des populations établies a été réalisée. Celle-ci a consisté en l'introduction dans les chémostats expérimentaux A et B d'une biomasse de *Nitrobacter hamburgensis*, bactérie nitratante.

A partir d'un inoculum de *N. hamburgensis* aimablement fourni par le laboratoire d'Ecologie microbienne de l'université de Lyon 1 (Rhône-Alpes, 69) et maintenu dans un milieu mixotrophe (i.e. qui permet aux microorganismes de subvenir aux besoins de leur métabolisme par photosynthèse et par assimilation des composés organiques présents), un repiquage à été effectué en conditions aseptiques dans trois erlenmeyers de 500 mL avec un milieu identique. Après une période de croissance d'un mois, un nouveau repiquage a été réalisé dans trois erlenmeyers de 1000 mL cette fois-ci dans un milieu autotrophe (Tableau 12).

Tableau 12 : Milieux de culture pour *Nitrobacter* (d'après Bock *et al*, 1983 ; Schimdt *et al*, 1973)

	Milieu mixotrophe	*Milieu autotrophe*
$NaNO_2$	1 g	2 g
Na_2HPO_4	5 g	5 g
KH_2PO_4	0,5 g	0,5 g
Solution Fer-EDTA	5 mL	5 mL
Solution A	1 mL	1 mL
Solution B	10 mL	10 mL
Extrait de levure	1,5 g	-
Bactopeptone	1,5 g	-
Pyruvate de sodium	0,55 g	-
H_2O	qsp 1000 mL	qsp 1000 mL

Solution Fer-EDTA	
$FeSO_4$, $7H_2O$	77 mg
EDTA	103 mg
H_2O	qsp 50 mL

Solution A	
ZnSO4, 7 H2O	2 mg
CuSO4, 5 H2O	2 mg
Na2Mo4, 7H2O	2 mg
H2O	qsp 100 mL
Solution B	
MgSO4, 7 H2O	0,2 %

De tels repiquages ont permis l'obtention d'une quantité de biomasse suffisamment importante pour effectuer des perturbations biotiques significatives des communautés installées et d'acclimater la souche à des conditions de croissance libre en milieu agité. Au cours de cette perturbation, 10% de la biomasse totale de chacun des réacteurs expérimentaux ont été remplacés par une quantité équivalente de *N. hamburgensis*.

Un tel dispositif expérimental avec les mesures fonctionnelles et populationnelles réalisées permet de suivre simultanément la dynamique de plusieurs espèces assemblées en une communauté et les fonctions écosystémiques exprimées. Ceci nous permettra de réaliser une modélisation structurée de la communauté reposant sur un schéma réactionnel pertinent et tenant compte des interactions pouvant s'établir entre les différentes espèces assemblées. Néanmoins, avant cela, une étape importante est de parvenir à déterminer le rôle fonctionnel des différents phylotypes qui ont pu être détectés par SSCP.

VII. DE LA DÉTERMINATION DU RÔLE FONCTIONNEL DE DIFFÉRENTES ESPÈCES PRÉSENTES DANS UN ÉCOSYSTÈME MICROBIEN COMPLEXE

« La simplification du problème expérimental ne doit pas créer l'illusion que les phénomènes eux-mêmes soient simplifiés. »
Jacques Monod.

VII.1. Résumé de la problématique et de l'approche mise en œuvre pour y répondre

Si les microorganismes peuvent constituer des modèles biologiques pertinents pour répondre à des questions d'écologie générale notamment depuis l'avènement des outils d'analyse de la diversité microbienne, une limitation majeure de leur utilisation est la difficulté à déterminer le rôle fonctionnel des différentes espèces présentes dans un écosystème microbien complexe. En effet, une telle détermination s'avère nécessaire pour procéder à une modélisation structurée d'une communauté assemblée tenant compte des interactions trophiques et non-trophiques pouvant s'établir entre les espèces. Cette prise en compte de la diversité des interactions pourra alors éventuellement permettre de réconcilier les résultats théoriques avec les observations expérimentales et ainsi de mieux comprendre le principe d'exclusion compétitive et le paradoxe du plancton et plus généralement de mieux apprécier l'influence de la diversité sur le fonctionnement et la stabilité des écosystèmes. Pour répondre à cette problématique, nous avons élaboré une approche générique faisant intervenir des outils mathématiques et les techniques d'empreinte moléculaire en nous appuyant sur l'étude des bactéries nitrifiantes en chémostat.

En effet, le suivi fonctionnel et populationnel des deux chémostats nitrifiants A et B par des analyses physico-chimiques fréquentes a permis l'obtention de la dynamique précise de la biomasse totale en microorganismes présente dans chaque réacteur ainsi que la dynamique de chacun des composants intervenant au cours du processus de nitrification (i.e. azote résiduel, nitrite et nitrate). A partir de ces cinétiques, un premier travail de modélisation a pu être réalisé. Cette modélisation dite « macroscopique », basée sur le modèle de Monod, a consisté en l'élaboration d'un modèle dynamique de type bilan de matière représentant la réaction étudiée selon son schéma réactionnel simplifié faisant intervenir autant de communautés microbiennes fonctionnelles que de fonctions exprimées au niveau de l'écosystème. Dans notre cas, un tel modèle décrit donc l'oxydation de l'azote ammoniacal en nitrite par la communauté des bactéries ammonium-oxydantes (AOB) et l'oxydation du nitrite en nitrate par la communauté des bactéries nitrite-oxydantes (NOB) dans des conditions où l'oxygène a été considéré comme non limitant. A partir de ce modèle, un couple « d'observateurs » a pu être synthétisé permettant

d'estimer la concentration en biomasse de chacune des communautés microbiennes fonctionnelles, concentrations qu'il n'est pas possible d'obtenir, ou à de rares exceptions près, par des outils d'analyses moléculaires. En effet, les « observateurs » sont des outils mathématiques issus de la théorie des systèmes dynamiques qui permettent d'estimer des variables non-mesurées à partir de variables mesurées. Le développement d'observateurs réalisé au cours de cette thèse pour générer les concentrations des différentes communautés fonctionnelles en chémostat a fait l'objet d'une valorisation par un article spécifique (cf. Annexe). Parallèlement, la technique d'empreinte moléculaire par SSCP a permis d'obtenir la dynamique des concentrations des différentes « espèces » (au sens moléculaire, ou phylotypes) présentes dans chacun des réacteurs. Aussi, la question de la discrimination du rôle fonctionnel de ces phylotypes revenait à chercher la combinaison des phylotypes dont la somme des concentrations approxime le mieux la concentration en AOB générée par l'observateur et dans le même temps, la combinaison des phylotypes dont la somme des concentrations approxime le mieux la concentration estimée en NOB. Plusieurs stratégies peuvent être envisagées pour résoudre ce problème de distribution statistique des phylotypes dans AOB et NOB. La plus efficace aurait été de tester toutes les combinaisons possibles avec l'ensemble des phylotypes détectés pour ne garder que la meilleure. Néanmoins, compte tenu du fait que 42 phylotypes ont été détectés dans le chémostat A et 41 dans le chémostat B, cela représentait respectivement 2^{42} et 2^{41} combinaisons à tester ce qui s'est avéré irréalisable en termes de temps de calcul nécessaire. Aussi, une stratégie de tirage aléatoire d'un nombre limité de phylotypes a été réalisée pour chaque chémostat séparément. Celle-ci a consisté à tirer au hasard 10 phylotypes parmi tous ceux détectés dans un chémostat, à tester toutes les combinaisons de distribution possibles en AOB et NOB avec ces 10 phylotypes et au final à ne garder que la meilleure combinaison (i.e. celle approximant le mieux les concentrations en AOB et NOB au sens des moindres carrés). Ce processus de tirage aléatoire ayant été réalisé un grand nombre de fois (10 000 tirages soit 10 000 x 2^{10} combinaisons testées au total), il s'ensuit que pour chaque phylotype une probabilité d'appartenir à la communauté nitritante (AOB) et une probabilité d'appartenir à la communauté nitratante (NOB) ont été obtenues. Les résultats obtenus par cette méthode mathématique ont fait l'objet d'une validation expérimentale puis d'une valorisation par l'écriture d'un article soumis à Environmental Microbiology.

VII.1. Toward functional molecular fingerprints

Maxime Dumont[1], Jérôme Harmand[12], Alain Rapaport[2], Jean-Jacques Godon[1]

[1]Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, INRA UR050, Avenue des Etangs, Narbonne, France

[2]INRA-INRIA MERE Research Team, UMR-ASB, 2 place Viala, Montpellier, France

Submitted to Environmental Microbiology

Corresponding author:

Maxime Dumont

Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement

Avenue des Etangs

F-11100 Narbonne

France

Telephone number: +33 (0) 468 425 179

Facsimile number: +33 (0) 468 425 160

E-mail address: dumont@supagro.inra.fr

Abstract

One of the most important challenges in microbial ecology is to determine the ecological function of dominant microbial populations in their environment. In this paper we propose a generic method coupling fingerprinting and mathematical tools to achieve the functional assigning of bacteria detected in microbial consortia. This approach was tested on a nitrification bioprocess where two functions carried out by two different communities could be clearly distinguished. The mathematical theory of observers of dynamical systems has been used to design a dynamic estimator of the active biomass concentration of each functional community from the available measurements on nitrifying performance. Then, the combination of phylotypes obtained by fingerprinting that best approximated the estimated trajectories of each functional biomass was selected through a random optimization method. By this way, a nitritation or nitratation function was assigned to each phylotype detected in the ecosystem by means of functional molecular fingerprints. The results obtained by this approach were successfully compared to the information obtained from 16S rDNA identification. This original approach can be used on any biosystem involving *n* successive cascading bioreactions performed by *n* communities.

Keywords

Microbial ecology,
Functional assignation,
Nitrifying process,
Molecular fingerprinting,
Mathematical modeling,
Dynamic systems.

Introduction

In recent years, the use of molecular tools for a better understanding of microbial communities has been steadily on the increase. Fingerprint pattern analysis, mostly based on 16S rDNA sequences, appears to be one of the best established molecular tools in microbial ecology. The fingerprints, obtained by several techniques such as Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) or Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP), can be considered as giving an overall picture of the whole microbial ecosystem. In such pictures, bacterial communities appear as discrete bands through DGGE or as discrete peaks through SSCP, both of which emerge from the background signal. Progress in the analysis of molecular fingerprints has enabled researchers to extract increasing amounts of information about microbial ecosystems (Marzorati, Wittebolle et al. 2008). First, peaks or bands detected on these fingerprints were used to estimate and analyse the species richness, structure and dynamics of microbial communities (Muyzer and Smalla 1998; Loisel, Harmand et al. 2005). Secondly, statistical analyses were carried out to determine the influence of environmental parameters on microbial community structure (Fromin, Hamelin et al. 2002). Subsequently, the range-weighted richness reflecting the carrying capacity of an ecosystem was determined (Marzorati, Wittebolle et al. 2008). Recently, a newly-defined ecological index based on information given by molecular fingerprinting has also been proposed for characterizing microbial ecosystems (Marzorati, Wittebolle et al. 2008). Nevertheless, the information coded in the fingerprints have not yet been exploited for possibly determining the ecological function(s) of dominant microbial populations in their environment: in other words, “who does what”, which now represents one of the most important challenges in microbial ecology.

In this paper, we present a new generic method, coupling molecular fingerprints and mathematical tools, for allocating such functional roles to bacteria in their environment. To test this original approach, we have conducted experiments on a nitrifying ecosystem in which two functions (i.e. nitritation and nitratation) carried out by two specific microbial communities (the Ammonium-Oxidizing Bacteria community for nitritation and the Nitrite-Oxidizing Bacteria community for nitratation) could be clearly distinguished. Moreover, nitrifying bacteria present a strong link between their phylogeny and biological functions, which enabled us to confront results obtained by our mathematical method with the results given by 16S rDNA identification.

Results

Applied strategy

The procedure applied in the present study is presented in Figure 40.

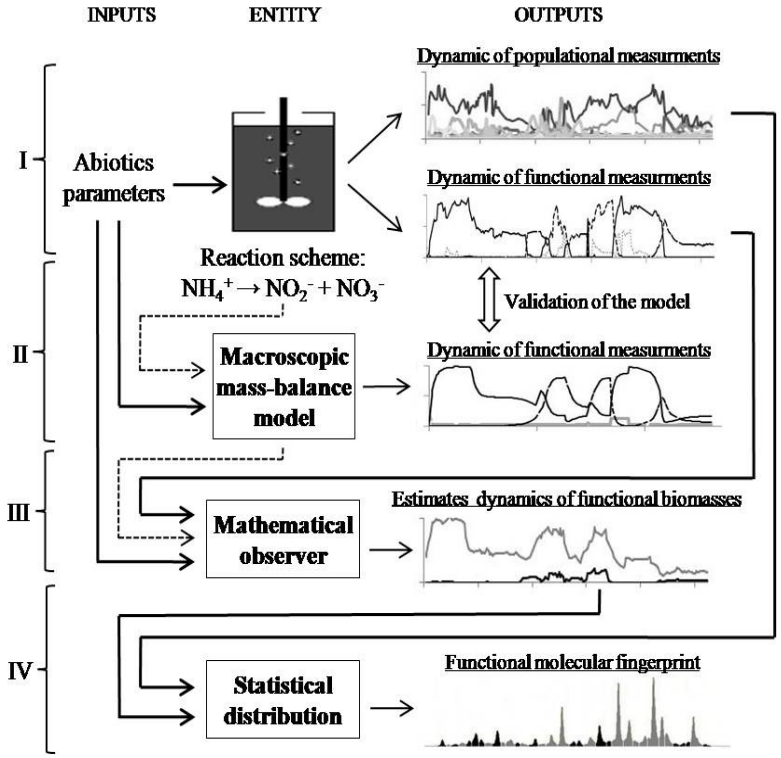


Figure 40: Theoretical scheme of the methodology used for functional community assigning of bacteria in their environment using observers and molecular fingerprinting. (I) Bioreactions in a given microbial ecosystem (II) Mathematical modeling of the bioreactions (III) Estimate of functional biomasses using a mathematical observer (IV) Functional assigning of molecular species present in the microbial ecosystem.

First, in a given microbial ecosystem, bioreactions were described on the basis of measurements of physical inputs (input substrate concentrations and flow rates) and outputs (the substrate and the total biomass concentrations) (Fig. 40. I).

Secondly, thanks to an understanding of the bioreaction under consideration, a mass-balance model of the "system" was built up (here, two reactions were studied, nitritation and nitratation, each one carried out by a different microbial community: the AOB community for nitritation and the NOB community for nitratation) that describes the time evolution of the concentrations of each population (Fig. 40. II).

Thirdly, the establishment of this dynamical model has allowed us to design a dynamical estimator based on the theory of observers. More precisely, the goal of an observer is to reconstruct or estimate the unmeasured variables of the model from the knowledge of inputs and online measurements of the system, which are here the biomass concentrations of each

functional community in the system (i.e., in the present case, the AOB and NOB concentrations) (Fig. 40. III).

Finally, from the estimates of the functional biomasses delivered by the observer, along with the dynamics of phylotype abundance revealed by molecular fingerprinting, functional assigning for each phylotype was performed by way of an optimization method. Functional molecular fingerprints were the final result of this approach (Fig. 40. IV).

This strategy was applied to data obtained from twin nitrifying chemostats (denoted A and B) which were maintained for 525 days under disturbed environmental parameters.

Dynamics of nitritation and nitratation functions

Nitrification is a cascading bioreaction where two functions are involved: nitritation, consisting in the oxidation of ammonium nitrogen into nitrites, and nitratation, the oxidation of nitrites into nitrates. Due to regular disturbances such as changes in operating temperature, variations in input substrate concentration, changes in the flow rate or biotic perturbations resulting from the addition of biomass, these two functions were fulfilled differently throughout the experimental period in the chemostats (Fig. 41).

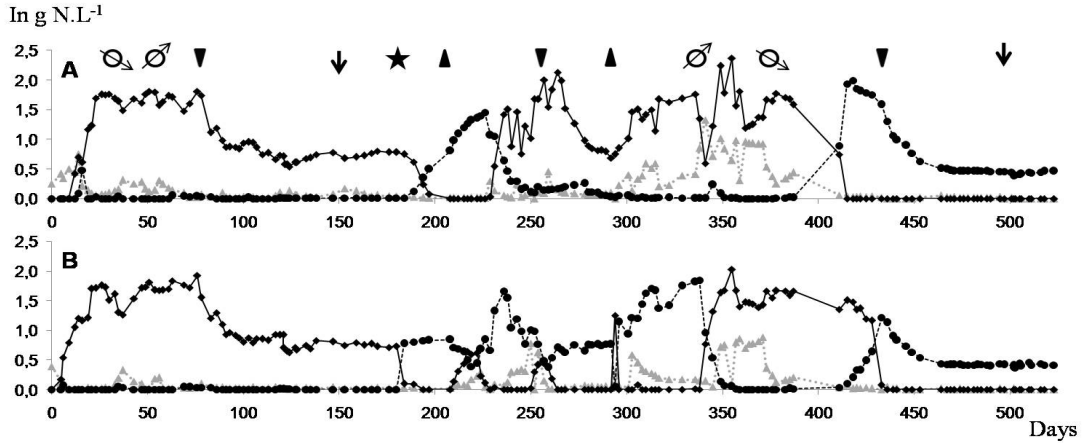


Figure 41: Nitrifying performances in the two regularly disturbed chemostats A and B. Black continuous line with diamond-shaped signs represents nitrite, dotted black line with round signs represents nitrates and dotted grey line with triangular signs represents residual ammonium concentrations expressed in g $N.L^{-1}$ throughout the duration of experiments (in days). Disturbances introduced during the kinetics in both reactors are indicated as follows: circle with arrow represents increasing or decreasing flow rate, black arrow represents biotic disturbance, a black triangular sign represents increasing or decreasing substrate concentration and black star represents a decreased in operating temperature from 30°C to 25°C.

From their inoculation up to day 183, only nitrite production was performed with high efficiency in both chemostats. A start of the nitratation function was obtained after modification of the operating temperature from 30°C to 25°C on day 183. At this time, both chemostats displayed differences in nitrifying performance. In chemostat A, nitrate production at first followed the increase in input substrate concentration applied on day 198.

After this initial increase, however, nitrate production quickly decreased, its total collapse leading to nitrite accumulation. In chemostat B, nitrate production seemed to be inhibited by the increase of input substrate concentration but was maintained, in contrast to chemostat A. In addition, the nitratation function in B followed the increase in input substrate concentration made on day 198 and was lost only after a major increase in the flow rate introduced on day 337. After restoration of this environmental parameter on day 372, the twin chemostats stopped showing functional divergence. Effectively, the nitratation function reappeared in both chemostats, maintaining high performance right to the end of the experimental procedure (day 525).

Dynamics of microbial communities estimated by the mathematical observer

In a nitrifying process, each effective function (i.e nitritation and nitratation) is carried out by a specific microbial community. The nitritation reaction is done by Ammonium Oxidizing Bacteria (AOB) whereas the nitratation reaction is done by Nitrite Oxidizing Bacteria (NOB).
The AOB and NOB concentrations, which best explain the nitrifying performances, were estimated using dedicated observers as described in Dumont *et al.* (2008) (Refer to Experimental procedures for details) taking into account the total biomass measurements (Fig. 42).

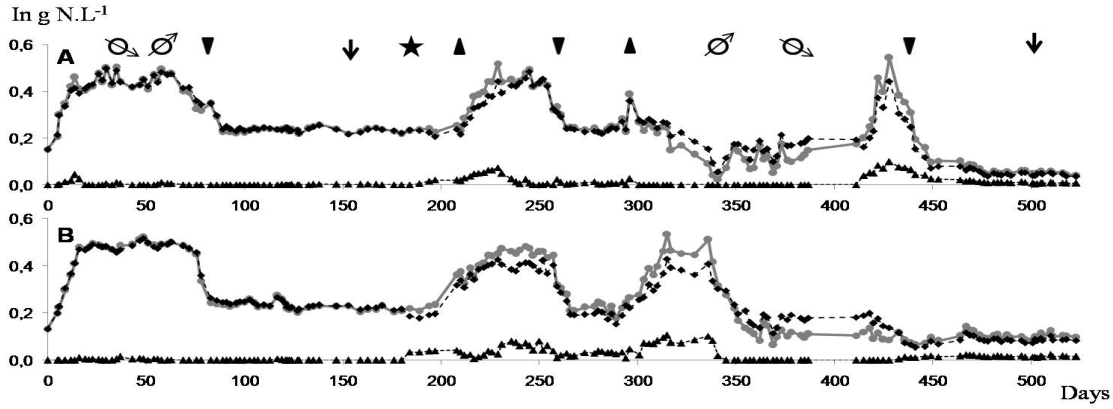


Figure 42: Evolution of functional communities and total biomass concentrations in both chemostats A and B. Grey continuous line with round signs represents dynamics of total biomass obtained by measurements, dotted black line with diamond-shaped signs represents active biomass of AOB community generated by observers, and dotted black line with triangular signs represents active biomass of NOB communities generated by observers expressed in $g.L^{-1}$. Disturbances made during the kinetics in both reactors are indicated as described in figure 41.

Estimated active AOB and NOB biomass showed evolutions similar to those of nitrite and nitrate concentrations, respectively. During the first period of the process, where only the nitritation function was observed in both chemostats, the estimated AOB concentration displayed equivalent values to total biomass measurements whereas the concentration of NOB appeared to be nil. During the period when nitrates were produced, NOB biomass registered relatively weak values in comparison to AOB biomass.

Dynamics of phylotypes detected by molecular fingerprints

During the experiment, 42 phylotypes were detected in chemostat A whereas 41 were detected in chemostat B, from 132 and 136 SSCP profiles, respectively (Fig. 43).

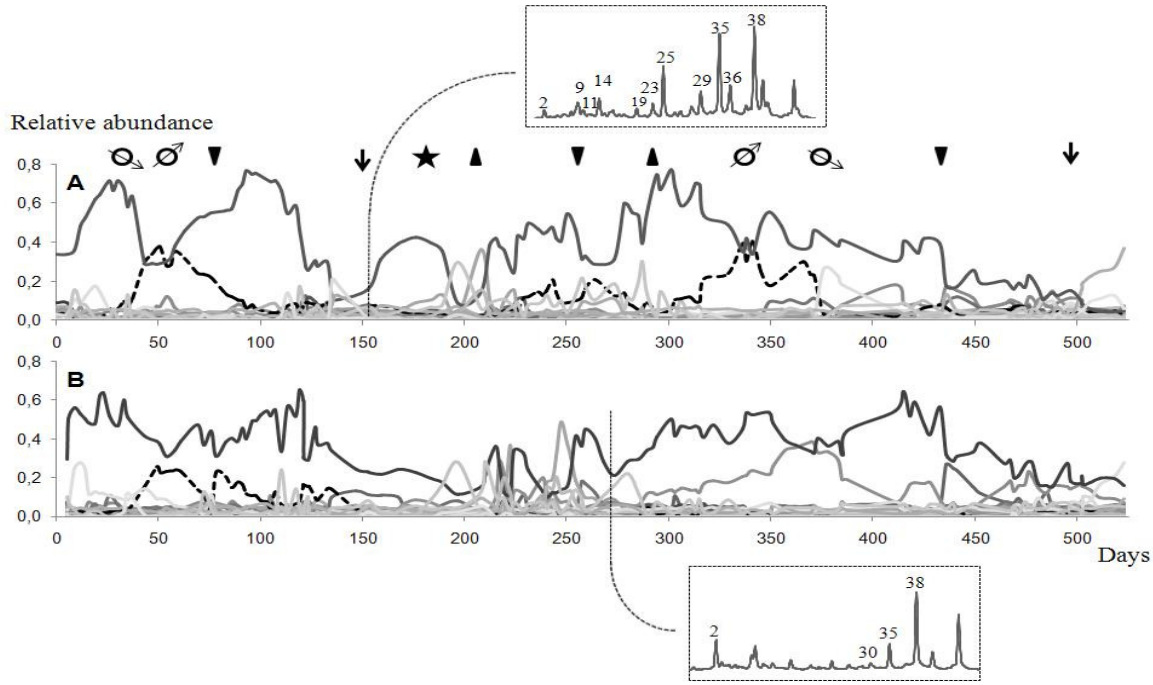


Figure 43: Relative abundance dynamics of the phylotypes detected by fingerprints. Disturbances created during the kinetics in both reactors are indicated as described in figure 2. Molecular fingerprints in boxed insert corresponding to samples from which 16S rDNA sequencing was carried out. The numbers under some peaks refer to identifications obtained by the method presented in tables 13 and 14.

After inoculation, the same phylotype in chemostats A and B was dominant with high relative abundance (70% of total biomass on average). For a short period of time, coexistence with another dominant phylotype (the same in both chemostats) was observed in response to a temporary break in the flow rate corresponding to the first disturbance (Fig. 43). The biotic disturbance made on day 121, consisting in the addition of nitrifying biomass (AOB and NOB) and which led to a light decrease in nitritation performance, had a major effect on the relative abundance of the dominant phylotype in both chemostats. Whereas in chemostat A this phylotype showed very responsive structural resilience, in chemostat B the phylotype continued to decrease slowly but remained dominant despite its weak relative abundance (above 20% of total biomass). Modification of the operating temperature from 30°C to 25°C on day 181 led to the emergence from the background of another phylotype which decreased quickly, probably due to the increase of the input substrate concentration on day 198. After this modification, the microbial structures of chemostats A and B diverged. In chemostat A, the initial dominant phylotype remained so, with high relative abundance; whereas in chemostat B, a marked successive alternation of major phylotypes was observed. These differences in the dynamics of microbial diversity might explain the differences in nitrification performance observed in both

chemostats at this time. After this period of divergence, both chemostats presented the same structural pattern as after inoculation, with an important domination of the same phylotypes. This domination was nevertheless upset after the last modification to input substrate concentration, carried out on day 432, when coexistence between several major phylotypes was observed. Finally, the second biotic disturbance, made on day 503 and consisting in the addition of NOB biomass, engendered a switch in the major phylotype in both chemostats.

Statistical assigning of phylotypes to a functional community

The combination of phylotype concentrations detected by SSCP which best approximated the estimated concentrations of functional communities were looked for by means of a random optimization method. Thus, the probability for each phylotype of belonging to the nitritation or the nitratation community was obtained and the phylotypes regrouped into three classes: AOB community, NOB community or not determined (Table 13).

Table 13: Statistical assigning of phylotypes to the AOB or the NOB community. Mean relative abundance was calculated for each phylotype during its period (in days) of presence. Phylotypes highlighted in black represent the AOB community, phylotypes highlighted in grey represent the NOB community and phylotypes highlighted in white represent no AOB and no NOB functional community. Bold peak numbers with an asterisk refer to assigned peaks (Figure 43 and Table 14).

	Chemostat A					**Chemostat B**				
Peaks	Presence along the kinetic (%)	Relative abundance (%)		Functional assignation (%)		Presence along the kinetic (%)	Relative abundance (%)		Functional assignation (%)	
		Mean	Max	AOB	NOB		Mean	Max	AOB	NOB
1	17	0.8	2.5	87	13	15	1.1	2.6	98	2
2*	32	1.4	6.3	14	86	24	0.9	2.2	43	57
3	14	1.2	2.9	34	66	13	1.0	3.4	72	28
4	-	-	-	-	-	27	1.2	4.5	90	10
5*	62	2.2	11.2	0	100	89	4.1	26.7	0	100
6	39	3.2	15.0	2	98	37	2.8	6.8	0	100
7	14	2.5	4.3	100	0	22	2.8	5.4	56	44
8	76	4.0	18.4	84	16	26	2.4	10.8	100	0
9*	27	2.4	5.8	34	66	42	2.1	7.7	26	74
10	18	2.8	9.1	95	5	20	1.7	4.7	6	94
11	20	2.4	12.7	100	0	14	1.7	6.9	52	48
12	23	4.3	8.4	99	1	9	3.1	8.5	100	0
13	34	3.4	11.8	12	88	92	2.5	7.5	1	99
14*	35	2.2	9.5	30	70	22	2.1	8.8	15	85
15	36	2.9	12.3	0	100	42	2.3	8.1	25	75
16	49	1.7	4.4	34	66	92	2.4	5.8	1	99
17	34	1.9	4.2	0	100	35	2.1	8.2	24	76
18	36	3.3	9.9	0	100	-	-	-	-	-
19*	18	1.8	4.1	0	100	29	1.5	3.3	21	79
20	21	1.7	3.4	6	94	35	1.5	4.6	82	18
21	45	1.7	6.1	1	99	22	1.4	3.5	45	55
22	25	1.0	2.0	0	100	36	1.8	6.6	0	100
23*	77	2.6	8.1	100	0	84	3.0	8.2	92	8
24	36	1.9	3.6	94	6	20	1.6	4.6	26	74
25*	64	3.2	11.3	95	5	92	3.4	18.1	90	10
26	38	2.4	4.6	4	96	20	1.6	4.0	100	0
27	19	7.2	11.8	14	86	42	6.5	23.2	40	60
28	48	2.9	7.4	92	8	36	2.9	13.3	98	2
29*	52	2.7	5.8	73	27	20	2.6	4.6	100	0
30*	18	4.4	11.5	6	94	78	2.6	10.3	9	91
31	27	1.8	4.6	6	94	30	2.6	13.2	20	80
32	62	3.0	17.5	2	98	58	2.4	6.4	0	100
33	49	4.0	36.4	90	10	99	5.0	49.0	100	0
34	10	2.5	6.9	45	55	-	-	-	-	-
35*	96	10.8	40.9	100	0	93	8.6	38.5	86	14
36	59	4.7	26.4	100	0	61	7.3	25.6	100	0
37*	100	5.6	37.3	100	0	98	5.0	27.9	100	0
38*	100	40.4	77.4	100	0	100	36.0	65.2	100	0
39	36	3.6	12.8	100	0	48	4.2	20.5	62	38
40	-	-	-	-	-	61	2.9	11.4	0	100
41	31	1.7	4.9	66	34	13	5.2	28.2	96	4
42	19	2.8	12.7	78	2	14	2.4	12.2	100	0
43	94	5.5	30.3	100	0	95	5.1	28.2	65	35
44	14	4.4	20.9	100	0	-	-	-	-	-

For chemostat A, functional community allocation was performed for 35 phylotypes. Nineteen molecular species, representing around 65 % of total biomass, were regrouped in the AOB community. These phylotypes were the major phylotypes detected in this chemostat, in terms of maximum relative abundance and length of presence during the lifetime of the

experiments. Sixteen, representing around 26 %, were regrouped in the NOB community and seven phylotypes, representing around 9 % of total biomass, were not assigned to either the AOB or the NOB community.

The results obtained for chemostat B were similar to those obtained for chemostat A. Functional allocation was performed for 33 phylotypes. Seventeen phylotypes representing around 60 % of the total biomass were regrouped in the AOB community; sixteen representing around 24 % were regrouped in the NOB community; and eight phylotypes representing around 15 % of total biomass were not assigned to either the AOB or the NOB community.

Molecular assigning of phylotypes to bacterial species

Assigning phylotypes detected by molecular fingerprinting to bacterial species was carried out by the sequencing of 16S rDNA of clones coming from two samples: one from chemostat A on day 153, the second from chemostat B on day 273 (Fig. 4). Thirteen phylotypes, observed in both chemostats through their SSCP peak migration, were identified (Table 14).

Table 14: Results of 16S rDNA sequencing identification carried out for thirteen phylotypes present in both chemostats and their functional assigning obtained by the mathematical approach. *, indicates the number of clones identified under the same name in the database, compared to the total number of clones obtained for each peak. Phylotypes highlighted in black represent the AOB community, phylotypes highlighted in grey represent the NOB community and phylotypes highlighted in white represent no AOB and no NOB functional community.

N° of peaks	Chem-ostat	Blast information				Nitrification function	
		Phylogenetic Identification	% of similarity	Accession number	Clones*	From 16S rDNA	From Observer
2	A	*Uncultured Nitrospirae sp.*	90%	EF490095	1/1	**NOB**	**NOB**
	B	-	-	-	-	-	ND
5	A	-	-	-	-	-	**NOB**
	B	*Uncultured Nitrobacter sp.*	100%	AM286398	1/1	**NOB**	**NOB**
9	A	*Nitrobacter vulgaris*	98%	EU041734	1/3	**NOB**	ND
	B	-	-	-	-	-	**NOB**
11	A	*Bradyrhizobium sp.*	99%	AB367691	1/1	ND	**AOB**
	B	-	-	-	-	-	ND
14	A	*Uncultured Sphingomonas sp*	100%	AB372255	1/1	ND	ND
	B	-	-	-	-	-	**NOB**
19	A	*Cyanobacter*	84%	EF150793	1/1	ND	**NOB**
	B	-	-	-	-	-	**NOB**
23	A	*Bacteroidetes*	93%	DQ167101	1/1	ND	**AOB**
	B	-	-	-	-	-	**AOB**
25	A	*Uncultured Flexibacter sp.*	97%	AB076886	4/5	ND	**AOB**
	B	-	-	-	-	-	**AOB**
29	A	*Uncultured Flexibacter sp.*	98%	AB076886	1/1	ND	**AOB**
	B	-	-	-	-	-	**AOB**
30	A	-	-	-	-	-	**NOB**
	B	*Bacteroidetes*	97%	AJ318191	1/1	ND	**NOB**
35	A	*Bacteroidetes*	97%	EF179859	1/1	ND	**AOB**
	B	*Bacteroidetes*	98%	EF179859	1/1	ND	**AOB**
37	A	*Variovorax paradoxus*	98%	EF203908	1/1	ND	**AOB**
	B	-	-	-	-	-	**AOB**
38	A	*Nitrosomonas eutropha*	100%	CP000450	2/3	**AOB**	**AOB**
	B	*Nitrosomonas eutropha*	100%	CP000450	3/4	**AOB**	**AOB**

These phylotypes represented 64% and 61.5% of the total fingerprint area in samples A and B, respectively. Among these thirteen phylotypes, only four were clearly associated with a nitrification function. One of the phylotypes was identified as a *Nitrosomonas* sp. (Table 14: peak number 13) corresponding to an autotrophic nitritation species (AOB community) and three were identified as autotophic nitratation species (NOB community): a *Nitrospirae* sp. and two *Nitrobacter sp*.

Comparison between statistical and molecular assigning

The results given by 16S rDNA sequencing for these phylotypes are in accordance with the results obtained by our mathematical technique (Table 14). *Nitrosomonas* was assigned to the AOB community with a probability of 100% in both chemostats whereas *Nitrospirae* and the two *Nitrobacter* were assigned to the NOB community with a probability of 86%, 100% and 66% in chemostat A and 57%, 100% and 74% in chemostat B, respectively.

Nine other phylotypes identified by 16S rDNA appeared to be heterotrophic bacteria but their function in the nitrifying ecosystem was not ascertained. So mathematical functional assigning obtained by our approach cannot be compared to 16S rDNA for these heterotrophic bacteria.

Discussion

The functional assigning of molecular fingerprints was obtained with the help of dedicated mathematical observers. This method required only the results of functional measurements along with the dynamics of the microbial community obtained by molecular fingerprinting. This method was tested on a nitrifying microbial community where two functions performed by two different communities could be clearly distinguished. Taking into account the link for nitrifying bacteria between phylogeny and biological function, the results obtained by our mathematical approach were confronted with those obtained by 16S rDNA identification. These results can be assessed at different levels.

At the community level, the results showed on average a total relative abundance of 65% and 60% for AOB and of 26 and 24% for NOB, in chemostats A and B respectively (Table 13). These results appear to be in the same range for each community, generally estimated at 2/3 – 1/3 for AOB and NOB respectively, in the nitrogen removal process (Li, Irvin et al. 2007).

At the phylotype level, a nitrifying ecosystem was chosen due to the strong link between phylogeny and biological functions which characterizes nitrifying bacteria (Purkhold, Pommerening-Roser et al. 2000) and which has permitted an experimental validation of our mathematical approach. Despite this assertion, only four of the phylotypes could be assigned unambiguously to a functional group by 16S rRNA gene sequence analysis and the same results were obtained for them using our mathematical approaches. This small number of phylotypes

clearly associated with a nitrification function highlights the limitations of this standard molecular method in addressing the question of "who does what", even in such a favorable case as nitrification. The four assigned bacteria: a *Nitrosomonas* (AOB), a *Nitrospirae* and two *Nitrobacter* (NOB) were those most often cited in the bibliography concerning nitrification bioprocess (Schroeder 1985). The dynamics of these phylotypes throughout the 523 days corresponded to the dynamics of functional measurements. Effectively, the phylotype identified as a *Nitrospirae* (Table 14: peak number 2) showed maximal abundance in both chemostats just after the modification of operating temperature, corresponding to the start of nitrate production. In the same way, the first identified *Nitrobacter* (table 14: peak number 5) displayed high maximum relative abundance, with 11.2% in chemostat A and 26.7% in chemostat B, maxima which were reached during the final period when environmental parameters corresponded to a stabilization of nitrate production in both chemostats. The other phylotype can be phylogenetically identified by sequencing but cannot be related to functional groups, as previous studies have already shown (Egli, Langer et al. 2003; Bougard, Bernet et al. 2006). These undetermined phylotypes can be considered as AOB, NOB or associated with either AOB or NOB. The example of peak number 35 (Table 14), which had been identified as a *Bacteroidetes* sp., is interesting (Fig. 43.). This phylotype grew after the first environmental modification (when the flow rate was temporarily stopped) and replaced as dominant the phylotype identified as *Nitrosomonas* sp. (AOB) without any consequences on nitrite production. Bacteroides were never found as AOB whereas our mathematical approach predicted that this phylotype belongs to an AOB community with a 100% probability. Nevertheless, different strains of bacteria such as *Pseudomonas*, *Bacillus, Diaphorobacter, Alcaligenes, Tiosphaera, Comamonas…* were already identified as heterotrophic AOB (Su, Yeh et al. 2006; Lin, Kong et al. 2007; Ahmad, Xu et al. 2008; Hayatsu, Tago et al. 2008). These bacteria have the same capability for degrading nitrogen as autotrophic AOB (Kim, Park et al. 2005). In the same way, heterotrophic NOB were also described (Kardenavis, Kapley et al. 2007).

Another assumption to explain the results obtained for these heterotrophic bacteria is to consider that these different phylotypes have no nitrification function but were in close interaction with the AOB or NOB phylotypes. That is why, in the present study, it seems to be more appropriate to talk about functional *community* assigning rather than functional assigning. Effectively, through the mathematical method presented here, we cannot determine exactly "who does what" (i.e. functional assigning), corresponding to which species performed nitrite or nitrate production. Nevertheless, we can determine "who is involved in what" (i.e. functional community assigning), or, in other words, which species interact to perform a given function in the ecosystem. Moreover, molecular techniques can be coupled advantageously with our mathematical approach. Effectively, these techniques, such as cloning-sequencing used here to

valid the results or Stable Isotope Probing (SIP) make it possible to determine "who does what" in an ecosystem whereas our method, enabled us to determine "who is involved in what". So, coupling both approaches can be used to determine which species interact to perform a given function in an ecosystem and, among these species, which are directly active in a given function.

Functional community assigning by mathematical approach could be applied to many other microbial ecosystems but this method, coupling mathematical observers and various molecular fingerprints, nevertheless shows certain limitations. The first is the requirement of clearly-defined functions which can be measured by chemical, enzymatic, physical, mechanical or other means. The second limitation is due to molecular fingerprint saturation. In high diversity ecosystems, sequence co-migrations arise. These co-migration events make molecular fingerprinting useless for ascertaining the dynamics of the phylotypes detected (Loisel, Harmand et al. 2005; Jossi, Fromin et al. 2006).

The main advantage of functional community assigning is that mathematical observers are independent of the kinetics of the process (e.g. growth rate, temperature…). These types of mathematical observers have proved to be suitable for various biological processes (Alcaraz-Gonzalez, Salazar-Pena et al. 2005). Another interesting advantage of this technique, compared to standard fitting methods such as the least-square one, is to obtain a filtering of the data. The estimation is provided recursively with time, guaranteeing that the estimation error converges toward zero, despite measurement noise or some uncertainties on the model. This leads to good robustness properties.

Moreover, only direct functional measurements and yield coefficients, which can be quite easily evaluated from experiments or from the literature, are needed to generate the active biomass of each functional community using these observers.

The other advantage of this approach is the possibility it gives of assigning an observed function to a known or unknown phylotype directly within a complex microbial community. Moreover, such assigning of functions *in situ* can be carried out for given environmental parameters or for biotic interactions. In microbial ecology, such assigning opens the door to interactive models and, thus, to a better understanding of the links between structural diversity and ecosystem functioning. In ecosystem engineering, it could be used to control the optimization of bioprocesses by testing different environmental conditions or assembled communities.

Thus, this approach can easily be used for all bioprocesses which function on a general mass-balance model of *n* successive cascading bioreactions carried out by n communities (i.e. in which the product of the ith reaction is the substrate of the $i+1^{th}$ reaction). Such processes include anaerobic digestion, cheese ecosystems, wastewater treatment, digestive tract activity...etc.

Experimental procedures

Bioreactor conditions and macroscopic measurements

The experimental set-up consisted of two continuously-mixed 6.5 L (working volume) all-glass chemostats inoculated beforehand with activated sludge from the municipal sewage treatment plant at Coursan (Aude, France). Both chemostats (A and B) were operated in strictly identical conditions over two years. Air flowrate was maximum to ensure good fluidization and provide enough oxygen for the nitrification process whereas pH was measured and maintained around 7 by the automatic addition of an alkaline solution. Chemostats A and B were fueled by the same synthetic mineral medium composed of ammonium sulfate (with concentration varying from 0.5 to 2 $g.L^{-1}$) as the nitrogen source and a mineral solution.

The total biomass was measured by calculating the weight of 50 mL of sample after drying 24h at 105°C, minus the weight of the synthetic medium dried under the same conditions and the weights of nitrite and nitrate.

Chemical analysis consisted of off-line quantification of residual ammonium, nitrites and nitrates by an ion chromatography system (Dionex 100) using conductivity detection.

Sampling and extraction of total genomic DNA

Twenty milliliter samples were collected from the middle of each chemostat three times per hydraulic retention time. The samples were centrifuged at 13,000 rpm (10 min, 20°C). Supernatants were collected for chemical analysis whereas pellets were re-suspended in 1 mL of 4 M guanidine thiocyanate Tris-HCl 0.1 M at pH 7.5 and 300 µL of 10% N-lauroyl sarcosine. Aliquots of 500 µL were placed in 2 mL screw-cap microcentrifuge tubes and stored at -20°C before DNA extraction. The extraction and purification of total genomic DNA were performed with the Qiagen DNA stool mini kit, following the manufacturer's instructions.

SSCP analysis and 16S rDNA identification

For SSCP analysis, a short fragment (200 bp) of the V3 region of the 16S rDNA gene was PCR amplified using the universal bacterial primers W49 (ACGGTCCAGACTCCTACGGG) and 6-FAM labelled W104 (TTACCGCGGCTGCTGGCAC) (Eurogentec, Belgium), and Pfu Turbo DNA polymerase (Stratagene, Holland), as described by Wery *et al.* (2008). SSCP capillary electrophoresis with an ABI 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems) was done using the protocol described by Wery *et al.* (2008). SSCP raw data were exported into the easy-to-handle csv format using the Chromagna shareware (developed by Dr. Mark J. Miller at the US National Institute of Health) and statistics were performed using SAFUM (Zemb et al., 2007) and the Matlab 6.5 software (MathWorks). The dynamics of each phylotype were obtained from the kinetics of molecular fingerprints using SAFUM (Zemb, Haegeman et al. 2007). Using the

internal SSCP standard (Rox), this open-source program first aligns all the fingerprints of the kinetics. Then it calculates the area under each peak for each fingerprint. The total area generated by the signal is normalized to 1 so that the relative abundance of a peak can be compared from one fingerprint to another and in this way the dynamics of the abundance of each peak (i.e. phylotype) can be obtained. Finally, the proportion of the background (i.e. difference between total area and area of all peaks) was subtracted from the total biomass measurement; then the abundance of each peak was multiplied by the total biomass remaining in order to obtain the dynamics of the concentration of each phylotype. Identification of bacterial peaks revealed on the SSCP profiles was obtained as described in Dabert *et al.* (2001). Each sequence was identified by correlation to the closest species in the sequence database (Genbank), using the BLAST algorithm.

Mathematics tools

Macroscopic model used

Bioreactions were considered as dynamic systems with defined inputs (flow rate, substrate concentrations…) and outputs (concentrations of reaction components). From such a systemic point of view, a macroscopic mass-balance model can be developed as follows:

$$\begin{aligned}
&\frac{dX_A}{dt} = (\mu_A(S_1) - D)X_A \\
&\frac{dX_B}{dt} = (\mu_B(S_2) - D)X_B \\
&\frac{dS_1}{dt} = -\frac{\mu_A(S_1)}{Y_A}X_A + (S_{in} - S_1)D \\
&\frac{dS_2}{dt} = \frac{\mu_A(S_1)}{Y_A}X_A - \frac{\mu_B(S_2)}{Y_B}X_B - S_2D \\
&\frac{dS_2}{dt} = \frac{\mu_B(S_2)}{Y_B}X_B - S_3D
\end{aligned} \qquad [1]$$

where: X_A and X_B represent the concentrations of AOB and NOB, S_{in}, S_1, S_2 and S_3 are respectively the ammonium input, residual ammonium, nitrites and nitrates measured concentrations, Y_A and Y_B are the yield coefficients of AOB and NOB, μ_A and μ_B are the growth rates of AOB and NOB, D is the dilution rate (ratio of the input flow rate and the volume).

Design of the observers

The macroscopic model used can generate AOB and NOB concentrations from functional measurements (S_{in}, S_1, S_2 and S_3) but requires unknown bioreaction kinetics, μ_A and μ_B. To counter this drawback, a new system called an "observer" was designed based on the macroscopic model in order to estimate X_A and X_B without prior knowledge of the growth rates μ_A and μ_B.

An observer (Bastin and Dochain 1990) is a mathematical entity originating from the theory of dynamical systems. In the present case, it was built up using the macroscopic mass-balance model [1]. We used the mass invariance property of the model [1] in considering the following changes of variables:

$$Z_1 = \frac{X_A}{Y_A} + S_1 \quad \text{and} \quad Z_2 = \frac{X_B}{Y_B} + S_1 + S_2$$

The derivatives of these new variables permit to obtain the two independent following systems:

$$\frac{dZ_1}{dt} = -D(Z_1 - S_{in}) \quad \text{and} \quad \frac{dZ_2}{dt} = -D(Z_2 - S_{in})$$

From these two systems, two independent observers can be derive which guarantees the convergence of the estimation: that $\lim_{t\to\infty}\left|\hat{X}_A - X_A\right| = 0$ and $\lim_{t\to\infty}\left|\hat{X}_B - X_B\right| = 0$. These two observers use the available inputs S_1 and S_2 to obtain $\hat{X}_A$ and $\hat{X}_B$ estimates X_A and X_B independently of μ_A and μ_B as follows:

$$\frac{d\hat{Z}_1}{dt} = -D(\hat{Z}_1 - S_{in}) \quad \text{and} \quad \frac{d\hat{Z}_2}{dt} = -D(\hat{Z}_2 - S_{in})$$

$$\text{and } \hat{X}_A = Y_A(\hat{Z}_1 - S_1)\ ;\ \hat{X}_B = Y_B(\hat{Z}_2 - S_1 - S_2)$$

Indeed, it can be shown that $\hat{X}_A$ and $\hat{X}_B$ converge toward X_A and X_B. Because of this property, such systems were called "observer" or sometime "software sensor". In addition, taking advantage that we measure the total biomass: $X_T = X_A + X_B$, the robustness and the performance of these observers can be improved in coupling them in the following way:

$$\frac{d\hat{Z}_1}{dt} = -D\left(\hat{Z}_1 - S_{in}\right) + G_1(\hat{X}_A + \hat{X}_B - X_T)$$
$$\frac{d\hat{Z}_2}{dt} = -D\left(\hat{Z}_2 - S_{in}\right) + G_2(\hat{X}_A + \hat{X}_B - X_T)$$

where: G_1 and G_2 are tuning parameters (See Dumont et al., 2008 for more details).

Optimization procedure

The final step in the procedure consisted in an optimization procedure to find the combination of phylotypes detected by SSCP which best explained the biomass trajectories generated by the observer. The total number of possible combinaisons of assignments being too high to test all of them, instead a random selection method has been used. A random lot of 10 phylotypes was taken from the total number of detected phylotypes and this sampling process was repeated 10,000 times. This proportion was chosen after a preliminary study had shown such values were sufficient to approximate the functional community without any loss of information and, also, because random optimization with these values appeared to be feasible in terms of computer

calculation time. For each random lot, the combination of these 10 molecular species, which best approximated the active biomass of the functional communities, enabled us to assign them to either the NOB or the AOB community. After 10,000 repetitions of random selection of lots of 10 phylotypes, the probability of each phylotype belonging to the AOB or the NOB community was ascertained. A statistical analysis of these probabilities in the form of a K mean analysis (XLSTAT) was carried out to obtain the three functional assignation groups: AOB community, NOB community, not determined.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the help of, Nicolas Bernet, Valérie Bru, Bart Haegeman, Jérôme Hamelin, Claude Lobry and Frank Poly whose support that made this study possible.

VIII. DE LA MODÉLISATION DU MAILLAGE D'INTERACTIONS ENTRE LES ESPÈCES PRÉSENTES DANS UN ÉCOSYSTÈME MICROBIEN COMPLEXE

« *Les composantes essentielles d'une communauté ne sont pas les individus mais les relations qui existent entre eux.* »
Arnold Toynbee.

VIII.1. Résumé de la problématique et de l'approche mise en œuvre pour y répondre

Le principe d'exclusion compétitive stipule que, à l'équilibre et pour des conditions environnementales fixées, le nombre d'espèces pouvant coexister dans un milieu donné ne peut dépasser le nombre de substrats limitants. Ce principe a été mis en évidence à la fois par la modélisation de relations proies-prédateurs en écologie générale (modèle de Lotka-Volterra) et par la modélisation des écosystèmes microbiens en chémostats (modèle de Monod). Néanmoins, ce principe est largement remis en question par les observations expérimentales ainsi que par les observations en milieu naturel faisant part de la coexistence d'un grand nombre d'espèces, supérieur au nombre de substrats limitants disponibles ce qui a conduit à l'expression du « paradoxe du plancton ».

Afin de réconcilier les résultats théoriques avec les phénomènes observés, une grande variété de nouveaux modèles de chémostats a été proposée consistant généralement en l'incorporation de fluctuations dans les paramètres environnementaux et notamment dans la concentration en flux de matière entrant dans le système. De tels modèles, s'ils permettent d'expliquer la coexistence de plusieurs espèces, modifient donc les propriétés idéales des chémostats stipulant que le flux de matière entrant est constant au cours du temps. Peu d'études se sont intéressées à la possibilité que les interactions non-trophiques, telles que le mutualisme ou la facilitation, puissent être un moteur de la coexistence dans le cadre des propriétés idéales du chémostat.

Au cours de la thèse, nous avons élaboré un modèle basé sur les équations de Monod intégrant toutes les interactions (i.e. trophiques et non-trophiques, inter et intra-spécifiques) pouvant s'établir entre différentes espèces assemblées dans une communauté. Ce travail a été réalisé en s'appuyant sur les données issues du suivi des chémostats nitrifiants en considérant quatre espèces dont les fonctions dans l'écosystème ont été préalablement établies par notre approche mathématique et validées par des outils moléculaires. Ainsi, la modélisation des interactions a concerné une communauté constituée de deux populations de bactéries nitritantes et de deux populations de bactéries nitratantes soit « 2+2 » espèces coexistant sur « 1+1 »

substrats limitants. Il s'agit là, à notre connaissance, de la première tentative visant à confronter des données expérimentales issues d'empreintes moléculaires aux simulations délivrées par un modèle de type bilan de matière comprenant davantage de biomasses que de fonctions exprimées. La comparaison des sorties du modèle de chémostat classique sans et avec la considération des interactions biotiques vis-à-vis des données fonctionnelles et populationnelles mesurées a permis de mettre en évidence que les interactions pouvant s'établir entre les espèces peuvent expliquer la coexistence de plus d'espèces que le nombre de substrats limitants identifiés. En effet, tandis que le modèle sans interactions ne permet pas, ou alors très ponctuellement, la coexistence des deux populations nitritantes d'une part et des deux populations nitratantes d'autre part comme cela a été observé, le modèle avec interactions présente une très bonne corrélation avec les données mesurées. De plus, il apparaît également que les fonctions exprimées par l'écosystème considéré (i.e. la nitritation et la nitratation dans notre modèle d'étude) sont fortement influencées par le réseau d'interactions biotiques. En effet, tandis que le modèle sans interactions génère la production de nitrite uniquement et donc prévoyait l'expression d'une seule des deux fonctions possibles, le modèle avec interactions génère la production de nitrite et de nitrate présentant ainsi une bonne capacité de prédiction lorsque comparé aux données mesurées. Enfin, ce travail de modélisation a conduit à l'obtention d'un réseau virtuel d'interactions permettant de mieux comprendre les relations entre les quatre espèces considérées. Ce réseau virtuel présente une majorité d'interactions positives. Il apparaît notamment que les deux espèces nitritantes entretiennent une relation mutualiste et de facilitation chacune envers les deux espèces nitratantes. Ces dernières présentent une relation bilatérale de sens opposé entre elles et chacune des deux espèces nitratantes entretient une relation positive avec l'une des espèces nitritantes et négative avec l'autre de façon inversée. En ce qui concerne les interactions intra-spécifiques, les quatre espèces présentent une forte densité-dépendance négative à l'exception d'une des deux espèces nitratantes présentant une forte densité-dépendance positive.

Cette modélisation des interactions pouvant s'établir entre différentes espèces assemblées dans une communauté fait l'objet d'un travail de publication, en cours, afin d'être soumise dans Journal of Microbial Ecology.

VIII.2. Coexistence in a nitrifying chemostat: a model of microbial interaction

Maxime Dumont[1], Jean-Jacques Godon[1], Roger Arditi[2], Jérôme Harmand[13]

[1]Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, INRA UR050, Avenue des Etangs, Narbonne, France

[2]Ecologie des Populations et Communautés, AgroParisTech, Paris, France

[3]INRA-INRIA MERE Research Team, UMR-ASB, 2 place Viala, Montpellier, France

In preparation to submission to Microbial Ecology

Corresponding author:

Maxime Dumont

Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement

Avenue des Etangs

F-11100 Narbonne

France

Telephone number: +33 (0) 468 425 179

Facsimile number: +33 (0) 468 425 160

E-mail address: dumont@supagro.inra.fr

ABSTRACT

For several species in competition for a single substrate, the well-known competitive exclusion principle states that no more than one species can be present at steady state in a chemostat. However, this theoretical principle is very often given the lie by experimental and natural observations where numerous species live together. To bridge the gap between mathematical theory and observed phenomena, a variety of mathematical models has been developed over the last decades. Nevertheless, for the most part, these models have explained coexistence by variations in abiotic parameters over time while biotic interactions have been largely ignored. Moreover, the few studies which have concerned biotic interactions have often remained purely theoretical and seldom been confronted with real data. In the present study, we have developed a model of classic chemostat taking into account inter- and intra-species microbial interaction. The model was then optimized on the basis of functional and population data obtained from a nitrifying chemostat operated over two years in fluctuating environmental conditions. Comparison of the optimization obtained for the model with and without interactions shows that interactions can lead to the coexistence of two ammonium-oxidizing bacteria and two nitrite-oxidizing bacteria in competition for ammonium and nitrite respectively. Additionally, not only coexistence but also ecosystem functions might be strongly mediated by the network of microbial interactions. Effectively, only one (nitritation) of the two functions (nitritation and nitratation) carried out by the nitrifying chemostat was performed by the virtual nitrifying community considered in the model without interactions whereas both were performed with the interaction model. Finally, the virtual network of interactions we obtained is also discussed.

Keywords

Competitive exclusion

Microbial interactions

Nitrifying bacteria

Coexistence

Chemostat model

Ecosystem functions

INTRODUCTION

The well-known "competitive exclusion" principle stipulates that, at equilibrium, the number of coexisting competing species cannot exceed the number of growth-limiting resources available to them (Lotka and Volterra). However, in naturally systems, the number of coexisting species frequently exceeds the number of limiting resources. This phenomenon is often called the "paradox of the plankton" (Schippers, Verschoor et al. 2001).

Several mathematical models have been developed to describe the effect of competitive exclusion on the coexistence of different species and, thus, on species diversity in natural ecosystems and "chemostat-type" bioreactors (Saikaly and Oerther 2003; Sree Hari Rao and Raja Sekhara Rao 2005). Theoretical and experimental studies of a chemostat with time-constant operating conditions have shown that two microbial populations in competition for a single substrate cannot coexist. The slower-growing species in the given operating conditions will be washed out. In such a case, coexistence is predicted theoretically for discrete values of the chemostat dilution rate only when the curves of species' specific growth rates as a function of a limiting nutrient concentration intersect. The dilution rate must have exactly the value at which the specific growth rates of the two populations in the chemostat are identical. However, this type of coexistence is structurally unstable and cannot be obtained in practice because of random fluctuations in the chemostat dilution rate. To bridge the gap between mathematical theory and observed phenomena in chemostats and in nature, a variety of mathematical models has been developed over the last decades. In all such models, the idealized assumptions chemostat have been modified (Hebeler, Schmidt et al. 2006). Some studies rely upon nonequilibrium conditions to promote species diversity by preventing competitive equilibrium. One such example is the variability in resource supply ratios. When nutrients were supplied to the chemostat in pulses, oscillations in the abundance of species prevented competitive equilibrium from occurring and permitted the coexistence of a greater number of species that the number of growth-limiting resources (Sommer 1985; Huisman and Weissing 2000). In the same way, some studies explain coexistence in chemostat by variation of solids retention times (Saikaly and Oerther 2003). But only a very limited number of studies have pointed out that other microbial interactions than competition can also lead to steady-state coexistence. The potential significance of non-trophic interactions such as facilitation and biotic disturbance has been largely overlooked by the food web scientific community (Berlow, Neutel et al. 2004).

In this paper, we present a modification of the classic model of a chemostat taking into account biotic interactions which can occur between species in a microbial community (i.e. which represent inter- and intra-species interactions). This model was compared to data recorded

from a nitrifying chemostat operated over two years with variable inputs. Nitrification is an aerobic two-step microbial process in which ammonium is oxidized to nitrate by two distinct groups of chemolithoautotrophic bacteria. Aerobic ammonium-oxidizing bacteria (AOB), such as *Nitrosospira* and *Nitrosomonas*, oxidize ammonium to nitrite, and aerobic nitrite-oxidizing bacteria (NOB), such as *Nitrospira* and *Nitrobacter*, oxidize the nitrite further to nitrate (Bock and Wagner 2001; Koops and Pommerening-Rôser 2001). During the two year period of the experiment, two kinds of measurement were made: functional (i.e. residual ammonium, nitrite and nitrate measurements) and populational (i.e. total biomass measurements and determination by Single Strand Conformation Polymorphism of the abundance of bacteria present in the chemostat). Using an original mathematical approach, a functional community assignation (i.e. in AOB or NOB community) was performed for each phylotype detected in the chemostat (Dumont, Rapaport et al. 2008). The model of microbial interaction was optimized on the basis of the two most abundant phylotypes of each functional community. In this way, we obtained a network of virtual interactions linking the four different species present in the nitrifying community. Moreover, this web of interactions can prevent competitive exclusion and explains the coexistence of the phylotypes as observed in the nitrifying chemostat. In addition, not only coexistence but also ecosystem functions is strongly mediated by the microbial interactions web.

METHODS

Nitrifying chemostat conditions

The experimental set-up consisted of a continuously-mixed 6.5 L (working volume) all-glass chemostat inoculated beforehand with activated sludge from the municipal sewage treatment plant of Coursan (Aude, France), operated over two years. The air flow-rate was maximum to ensure good fluidization and provide enough oxygen for the nitrification process. pH was monitored and maintained around 7 by the automatic addition of an alkaline solution. The chemostat was fueled by a synthetic mineral medium composed of ammonium sulfate as the nitrogen source (with a concentration varying from 0.5 to 2 $g.L^{-1}$) and a mineral solution.

Nitrifying performance measurements

Functional measurements were carried out by chemical analyze consisting of off-line quantification of residual ammonium, nitrites and nitrates using an ion chromatography system (Dionex 100) based on the detection of conductivity.

Microbial community measurements

During the experiment, two kinds of population measurement were made. The first consisted in determinating the total biomass present in the chemostat by calculating the weight of 50 mL of

sample after drying 24h at 105°C, minus the weight of the synthetic medium dried under the same conditions and minus the weight of nitrite and nitrate. The second kind of population measurement determinated the abundance of the different species contained in the total biomass by Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP). Twenty millimeter samples were collected from the middle of the chemostat three times per hydraulic retention time. The samples were centrifuged at 13,000 rpm (10 min, 20°C). Supernatants were collected for chemical analysis whereas pellets were re-suspended in 1 mL of 4 M guanidine thiocyanate Tris-HCl 0.1 M at pH 7.5 and 300 µL of 10% N-lauroyl sarcosine. Aliquots of 500 µL were placed in 2 mL screw-cap microcentrifuge tubes and stored at -20°C before DNA extraction. The extraction and purification of total genomic DNA were performed with the Qiagen DNA stool mini kit, following the manufacturer's instructions. For SSCP analysis, a short fragment (200 bp) of the V3 region of the 16S rDNA gene was PCR-amplified using the universal bacterial primers W49 (ACGGTCCAGACTCCTACGGG) and 6-FAM labelled W104 (TTACCGCGGCTGCTGGCAC) (Eurogentec, Belgium), and Pfu Turbo DNA polymerase (Stratagene, Holland), as described by Wery *et al.* (2008). SSCP capillary electrophoresis with an ABI 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems) was done using the protocol described by Wery *et al.* (2008). SSCP raw data were exported into the easy-to-handle csv format using the Chromagna shareware (developed by Dr. Mark J. Miller at the US National Institute of Health) and statistics were performed using the Matlab 6.5 software (MathWorks).

Model development

The model developed in this study is based on mass balance equations for a conventional, completely-mixed chemostat derived from the pioneer work of Monod, Novick and Szilard and given by the following set of differential equations (Monod 1950; Novick and Szilard 1950) :

$$\begin{cases} \dot{S} = D(Sin - S) - \mu(S)X \\ \dot{X} = (\mu(S) - D)X \end{cases}$$

where S and X represent the concentrations of nutrient (or substrate) and biomass. S_{in} denotes the concentration of nutrient in the input flow, and D the dilution rate. The function µ(S) is the growth rate of the population (for instance a Monod function). The yield factor of the reaction is kept equal to one, as this can be done using a suitable choice of units. One can easily check that the concentrations of substrate and biomass at equilibrium are either (Sin, 0), in which case the chemostat is said to be "washed out", or the equilibrium (S^*, S^*_{in}-S^*) that fulfills $\mu(S^*)=D^*$.

This standard dynamic model of chemostat can easily be adapted to a nitrifying bioprocess, as follows:

$$\frac{dX_A}{dt} = (\mu_A(S_1) - D)X_A$$

$$\frac{dX_B}{dt} = (\mu_B(S_2) - D)X_B$$

$$\frac{dS_1}{dt} = -\frac{\mu_A(S_1)}{Y_A}X_A + (S_{in} - S_1)D$$

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{\mu_A(S_1)}{Y_A}X_A - \frac{\mu_B(S_2)}{Y_B}X_B - S_2D$$

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{\mu_B(S_2)}{Y_B}X_B - S_3D$$

With

$$\mu_A = \mu_{max_A}\frac{S_1}{S_1 + K_{S_1}}$$

$$\mu_B = \mu_{max_B}\frac{S_2}{S_2 + K_{S_2}}$$

where X_A and X_B represent the concentrations of AOB and NOB respectively. This nitrifying chemostat model can be modified to consider microbial interactions between two AOB and two NOB, as follows:

$$\frac{dX_i}{dt} = (\mu_i(S_1) - D)X_i + (\sum_{j=1}^{4} \propto_{ij} X_j)X_i \; ; \; with\ i = 1,2$$

$$\frac{dX_i}{dt} = (\mu_i(S_2) - D)X_i + (\sum_{j=1}^{4} \propto_{ij} X_j)X_i \; ; \; with\ i = 3,4$$

$$\frac{dS_1}{dt} = (S_{in} - S_1)D - \frac{1}{Y_A}\sum_{i=1}^{2}(\mu_i(S_1) + \sum_{j=1}^{4} \propto_{ij} X_j)\, X_i$$

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{1}{Y_A}\sum_{i=1}^{2}(\mu_i(S_1) + \sum_{j=1}^{4} \propto_{ij} X_j)\, X_i - \frac{1}{Y_B}\sum_{i=3}^{4}(\mu_i(S_2) + \sum_{j=1}^{4} \propto_{ij} X_j)\, X_i - S_2D$$

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{1}{Y_B}\sum_{i=3}^{4}(\mu_i(S_2) + \sum_{j=1}^{4} \propto_{ij} X_j)\, X_i - S_3D$$

where α_{ij} represents the influence of the species j on the growth rate of species i. This influence can be positive, negative or nil according to the sign and the value of α_{ij}. In this model, the interactions are assumed to be constant for the abundance of a given species j. The growth of a phylotype is made possible even in the absence of substrate, reflecting the possible use of cell rubbish as resource. Notice that if $\alpha_{ij}=0$; $\mu_1=\mu_2=\mu_A$; $\mu_3=\mu_4=\mu_B$ and $X_1(0)+X_2(0)=X_A(0)$; $X_3(0)+X_4(0)=X_B(0)$ it is exactly the standard dynamical model of nitrifying reaction in chemostat.

Optimization of the model on the experimental data

A generic method coupling universal fingerprinting and mathematical tools was performed on the phylotypes detected by SSCP to achieve a functional assigning of these phylotypes to one of the two nitrifying functions (Dumont et al., submitted). Finally, the microbial interactions model

mentioned below was optimized on the kinetic of the two more abundant species (in term of concentration and time of presence along the two years experiments) of each functional community. Thus, two phylotypes in competition for the same substrate was studied for each of the two nitrifying functions. Parameters of the model - growth rate and half constant saturation for each phylotype along with yield coefficient for each functional community - were obtained beforehand by optimization on the experimental data of the nitrifying chemostat model without interactions (Table. 15).

Table 15: Kinetic parameters of the microbial interactions model

	AOB_1	AOB_2	NOB_1	NOB_2
Maximum growth rate, µmax (h^{-1})	0.45	0.50	0.27	0.27
Half saturation constant, Ks (mg/L)	0.30	0.48	0.65	0.70
Yield coefficient, Y	0.18		0.10	

Then, the estimation of the parameters was manually refined taking into account the microbial interactions by means of αij coefficients having values between [-1,1]. These model parameters appear to be in accordance with bibliographic references (Bougard 2004).

RESULTS

Nitrifying performance

Due to regular disturbances which included changes in operating temperature, variations in input substrate concentration, changes in the flow rate or biotic perturbations resulting from the addition of biomass, the two nitrifying functions (i.e. nitritation and nitratation) were carried out differently throughout the experimental period in the chemostat (Fig. 44).

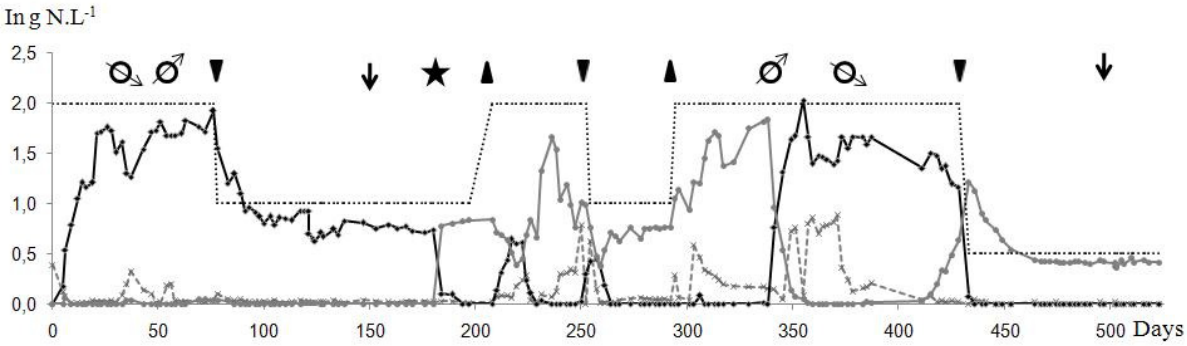


Figure 44: Nitrifying performances in the regularly disturbed chemostat. Black continuous line with diamond-shaped signs represents nitrite, dotted black line with round signs represents nitrates and dotted grey line with triangular signs represents residual ammonium concentrations expressed in g $N.L^{-1}$ throughout the duration of experiments (in days). Disturbances introduced during the kinetics in both reactors are indicated as follows: circle with arrow represents increasing or decreasing flow rate, black arrow represents biotic disturbance, a black triangular sign represents increasing or decreasing substrate concentration and black star represents a decreased in operating temperature from 30°C to 25°C.

From its inoculation up to day 183, only nitrite production was performed with high efficiency. A start of the nitratation function was obtained only after the modification of the operating temperature which was cooled from 30°C to 25°C on day 183. Though nitrate production seemed to be inhibited by the increase of input substrate concentration, the function was maintained and followed the increase in input substrate concentration made on day 198. Nitratation was lost only after a major increase in the flow rate introduced on day 337. After restoration of this environmental parameter on day 372, the nitratation function reappeared in the chemostat, maintaining high performance right to the end of the experimental procedure (day 525).

Microbial community

Total biomass present in the chemostat was measured throughout the experiment (Fig. 45). Results obtained show a good correlation with the dynamics of the ammonium concentration input except after the major increase in the flow rate (Fig. 44). Forty-one phylotypes were detected in the chemostat from a kinetic of 136 SSCP profiles. Relative abundance given by SSCP for each of them was transformed into concentration by multiplication with the values of total biomass (Fig. 45).

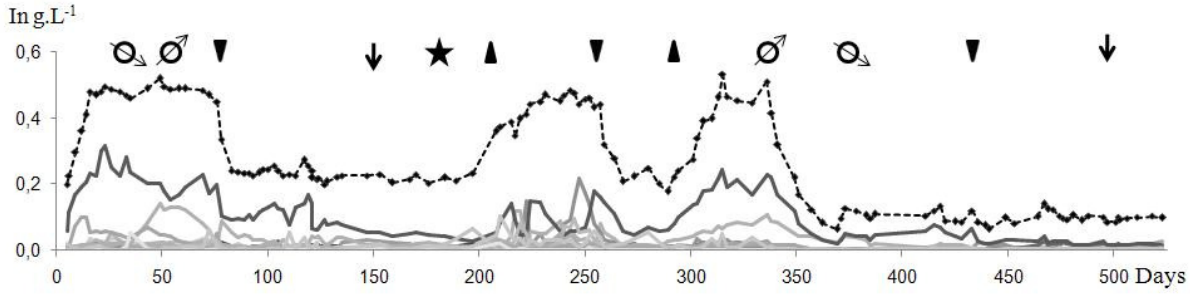


Figure 45: Microbial community in the chemostat. Dotted black line with diamond-shaped signs represents the total biomass, others continuous grey level lines represents the dynamics of the 41 phylotypes detected by fingerprints in the nitrifying chemostat expressed in g.L-1 throughout the duration of experiments (in days). Disturbances created during the kinetics in the chemostat are indicated as described in figure 44.

After inoculation, a phylotype was dominant with high relative abundance (60% of total biomass on average). For a short period of time, coexistence with another dominant phylotype was observed in response to a temporary break in the flow rate corresponding to the first disturbance. The biotic disturbance made on day 121, consisting in the addition of nitrifying biomass (AOB and NOB) and which led to a slight decrease in nitritation performance, had a major effect on the relative abundance of the dominant phylotype in the chemostat. Modification of the operating temperature from 30°C to 25°C on day 181 led to the emergence from the background of another phylotype which decreased quickly, probably due to the increase of the input substrate concentration on day 198. After this modification, a marked successive

alternation of major phylotypes was observed. After this period, the chemostats presented the same structural pattern as after inoculation, with important domination by the same phylotypes. This domination was nevertheless upset after the last modification to input substrate concentration, took place on day 432, when coexistence between several major phylotypes was observed. Finally, the second biotic disturbance, made on day 503 and consisting in the addition of NOB biomass, engendered a switch in the main phylotype in the chemostat.

Coexistence of 2+2 species on 1+1 growth-limiting resources by microbial interactions

The results of the microbial interactions model optimized on the basis of experimental data are presented in figure 46.

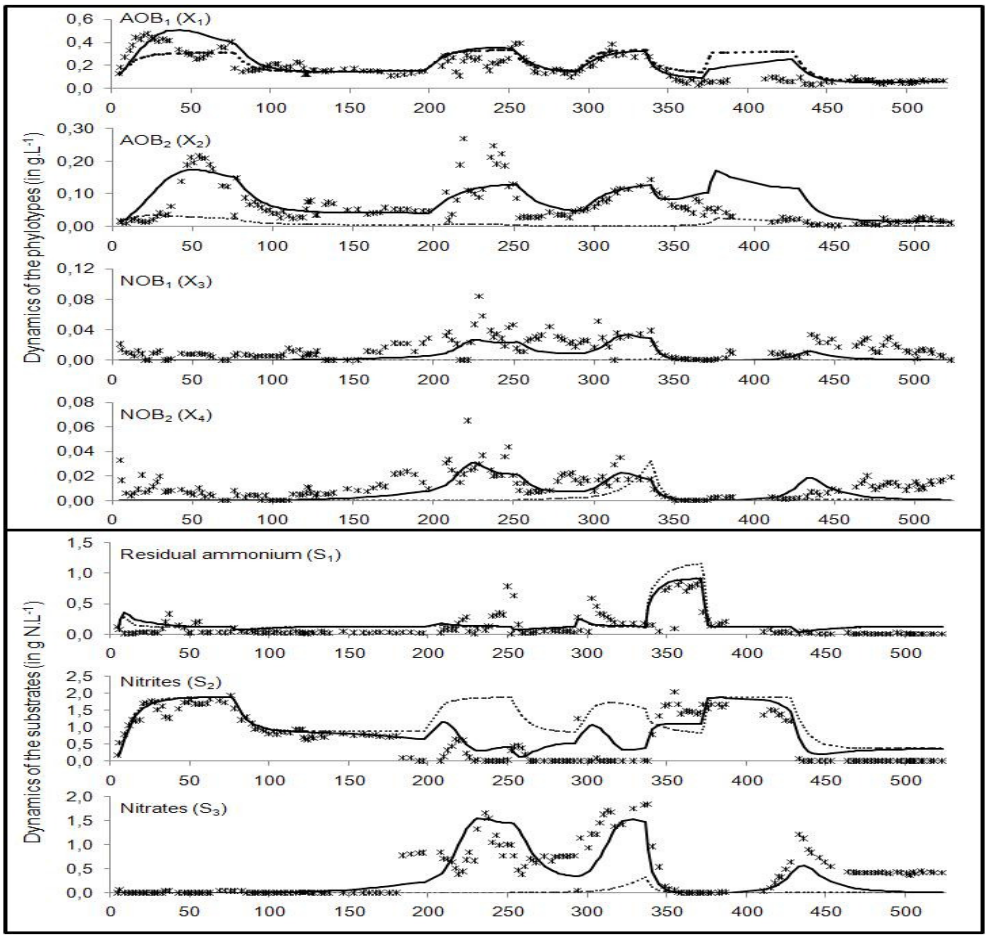


Figure 46: Optimization of the microbial interactions model on the experimental data. Cross signs represent the experimental data, continuous black line represents results of the optimization of the microbial interactions model, and dotted black line represents results of the optimization of the model without interactions.

In comparison with the experimental dynamics, the interaction model presented was a good match with the measurement data and was always better than the model without interactions. Effectively, for population data, the model with interactions presented a good correlation with experimental bacterial kinetics for all of the four phylotypes studied. The divergence occurring from d=375 and d=430 between the experimental data and estimates of the model for the two

AOB can be explained by a washing-out of the chemostat in response to the increase in the flow rate made on d=337. For functional data, the model with interactions presented satisfactory estimates for residual ammonium, nitrites or nitrates. On the other hand, though the model without interactions correlates well with the kinetics acquired by SSCP for the first AOB, it did not do so for the second AOB. For NOB, the model without correlations gave poor results. In effect, model estimates were not satisfactory for either of the two phylotypes. This poor approximation of the population dynamics was also revealed by a shunt of the nitrate and an accumulation of nitrites in almost all the experimental kinetics.

It is clear that, when microbial interactions were not taking into account, the model does not predict the coexistence of 2+2 species on 1+1 growth-limiting resources. Moreover, microbial interactions having important effects on the growth rate of both AOB and NOB community (Fig. 47).

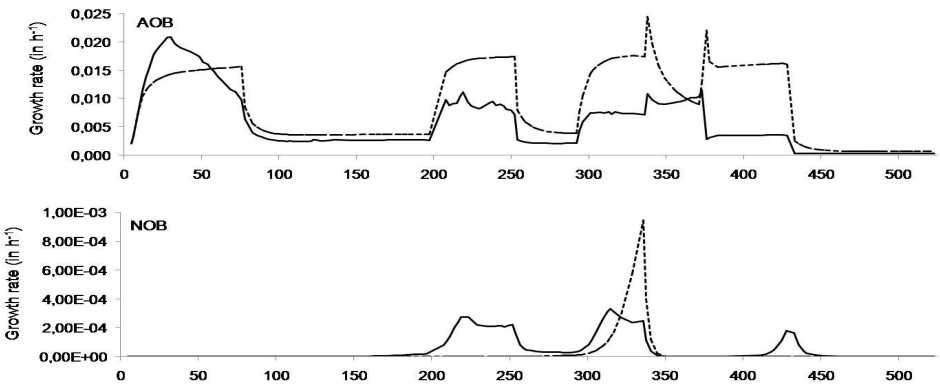


Figure 47: Growth rate (in H^{-1}) of AOB and NOB functional communities composed of two phylotypes for each one. At the top, continuous black line represents the growth rate of AOB community when interactions were considered and dotted black line represents the growth rate when interactions were not taking account. At the bottom, continuous black line represents the growth rate of NOB community when interactions were considered and dotted black line represents the growth rate when interactions were not taking account.

Effectively, biotic interactions decrease the growth rate of AOB community and increase the growth rate of NOB community in comparison of results obtains without considering interactions.

Virtual interactions web

By using microbial interactions model, we can obtain a web of virtual interactions linking the different phylotypes with the values, corresponding to the intensity, of each of the interactions (Fig. 47 and Table 16).

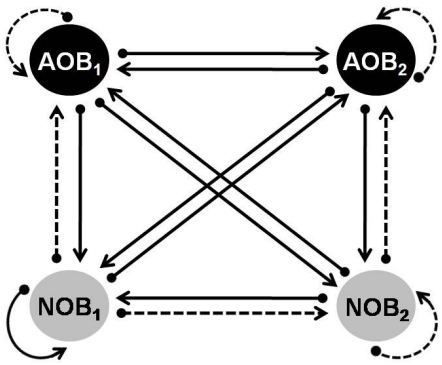


Figure 48: Virtual interactions web between nitrifying bacteria obtained by the model. Continuous black line represents positive interaction and dotted black line represents negative interaction between two phylotypes.

Table 16: Interactions coefficients (αij) of the microbial interactions model.

		X_j			
		AOB_1	**AOB_2**	**NOB_1**	**NOB_2**
X_i	**AOB_1**	-0.54	0.98	-0.75	0.68
	AOB_2	0.29	-0.78	0.98	-0.57
	NOB_1	0.81	0.40	0.97	0.46
	NOB_2	0.46	0.99	-0.99	-0.99

In the network of 16 interactions contained in the model, only 6 appear as negative interactions. The 10 other interactions all proved to be positive. No nil interaction was revealed. Concerning interactions between both AOBs, no competition appeared but, in opposite, strong facilitation notably of the second AOB on the first one (α=0.998). However, strong intra-specific competition appeared for each of both AOB with α=-0.54 and α=-0.78 respectively. These two ammonium-oxidizing phylotypes exercise interactions of facilitation with both nitrite-oxidizing phylotypes. However, they can point out that every AOB exercise a stronger facilitation on one of both NOB in a supplementary way. Effectively, AOB_1 present a high facilitation against NOB_1 (α=0.81) and a medium one against NOB_2 (α=0.46) while AOB_2 present a medium facilitation against NOB_1 (α=0.40) and a high one against NOB_2 (α=0.99). Concerning interactions between the two nitrite-oxidizing phylotypes, NOB_1 had a high negative impact on NOB_2 (α=-0.99) while NOB_2 exercise a moderate facilitating impact on NOB_1 (α=0.46). High intra-specific facilitation appear for NOB_1 (α=0.97) whereas strong intra-specific competition appeared for NOB_2 (α=-0.99). Concerning the type of interaction which maintains NOB in relation to AOB, a supplementary structure appeared. Effectively, each NOB exercised a positive and a negative effect on both AOBs. Whereas NOB_1 had a negative impact on AOB_1 (α=-0.75) and a positive one on AOB_2 (α=0.99), for NOB_2 it was the opposite: positive impact on AOB_1 (α=0.68) and negative on AOB_2 (α=-0.57).

DISCUSSION

A populationnal and functional monitoring for two years of a nitrifying chemostat with time-varying environmental conditions put in an obvious place the coexistence of numerous species in the middle of culture fed by ammonium as source of nitrogen. Effectively, the data indicates that, throughout the period of the study, rapid significant changes occurred in the species composition of the bacterial community (Fig. 45). Some mathematical results predict that there are situations where dynamic microbial communities are the norm and "steady-state" conditions do not exist (Saikaly and Oerther 2004). This theoretical observation is supported by several recent studies which have shown experimentally that the composition of a microbial community is dynamic. One such example is the study carried out by Kaeplpat and Grady (2002) in which they examined, using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) targeting 16S ribosomal RNA, the structure of the bacterial community in a laboratory-scale sequencing batch reactor (Kaewplpat and Grady 2002). The DGGE data showed that the bacterial community was highly dynamic and this dynamic behavior was observed during the initial 17 days of reactor operation and continued throughout the experiment. Studies using anaerobic reactors have also shown that the structure of bacterial communities is dynamic. Fernandez et al. (1999) studied community dynamics in a functionally stable methanogenic reactor over a period of 605 days (Fernandez, Huang et al. 1999). The results of this study showed that the bacterial community structure was dynamic, following a chaotic behavior pattern even though the reactor was operated under stable conditions. In a similar study, Zumstein et al. (2000) showed that the bacterial community structure in an anaerobic digester operating under constant environmental conditions (feeding, temperature and pH) over a two-year period was also dynamic (Zumstein, Moletta et al. 2000). In the present study, we have similarly observed a dynamic structure in the bacterial community. However, in our case, we cannot test the chaotic nature of these dynamics: because environmental conditions fluctuate, the Liapunov exponents do not enable us to draw conclusions (Tempkin and Yorke 2007).

So both the theoretical and experimental studies discussed above suggest that microbial communities in aerobic and anaerobic bioreactors are dynamic. **We speculate that this dynamic behavior could be caused, in part, by the microbial interactions linking the different species in a community.** In macrosystem ecology, several models have been established that represent intra- and inter-species interactions in food webs (Berlow, Neutel et al. 2004). The most widely-used model has been the multispecies Lotka-Volterra model which is a simple model for measuring interaction, based on a linear relationship for a given species between its growth rate and the population of each member species in the community. This model has already been used

to describe microbial interactions within a cheese microbial community (Mounier, Monnet et al. 2008). In the present study, we applied this interaction coefficient structure (α_{ij}) to the classic nitrifying chemostat model. **Comparisons of the optimization on the experimental data obtained for the classic nitrifying chemostat model with and without microbial interactions show that microbial interactions can lead coexistence.** The prime focus on predator-prey links in much of the research to date on interactions strengths in food webs has meant that the potential significance of non-trophic interactions such as competition, facilitation and biotic disturbance, has been largely ignored (Berlow, Neutel et al. 2004). Effectively, because food web models focus by definition exclusively on trophic interactions, they implicitly assume that predation is the most important process regulating community structure and dynamics. Moreover, while models of complex food webs implicitely incorporate exploitative competition among most species, they generally ignore any form of resource competition among the basic species (Williams and Martinez 2000; Drossel and MacKane 2003). This can be explained by the fact that, in food networks, nutrients flow via trophic links and, for this reason, trophic interactions have a fundamental character due to the principle of mass conservation. Concerning the "competitive exclusion principle" and the "paradox of the plankton" in chemostats, a variety of mathematical models has been developed over the last decades. But in the same way, microbial interactions were ignored and in all such models the idealized chemostat assumptions have been modified (Hebeler, Schmidt et al. 2006). Some studies rely upon nonequilibrium conditions to promote species diversity by preventing competitive equilibrium. One such example is the variability in resource supply ratios. When nutrients were supplied to the chemostat in pulses, oscillations in the abundance of species prevented competitive equilibrium from occurring and permitted the coexistence of a number of species greater than the number of growth-limiting resources (Sommer 1985; Huisman and Weissing 2000). In the same way, some studies explain coexistence in chemostats by a variation in solids retention times (Saikaly and Oerther 2003). Only a very limited number of studies have shown interest in microbial interactions. Hebeler et al. (2006) explained coexistence in a chemostat as a result of metabolic by-products (Hebeler, Schmidt et al. 2006). In their study, they found experimental evidence for a specific metabolic property of *Staphylococcus aureus* which produced acetate (a by-product). In a mixed culture, this can have an activating effect (as a secondary substrate) as well as an inhibiting effect on the other species (by reducing pH value). Huisman and Weissing (2000) showed, in a study based on modeling, that the number of coexisting species may exceed the number of limiting resources when internal system feedback indices oscillations and chaos which occurs if the species displace each other in a cyclic fashion (Huisman and Weissing 2000). However, this appears to be a rare phenomenon in parameter space, requires a very precise

parameterization of the community members and is sensitive to the introduction of new species and the removal of species already present (Schippers, Verschoor et al. 2001). Nevertheless, in microbial ecology few authors have considered interactions empirically and directly whereas a long history experimental and theoretical ecology, with its much longer has elucidated how predation interacts with other non-trophic processes such as interference competition, facilitation, disturbance, environmental stress, productivity and recruitment, to regulate species distribution and abundance (Chase, Abram et al. 2002; Fox and MacGrady-Steed 2002; Post 2002; Montoya and Solé 2003).

Additionally, not only coexistence but also ecosystem functions might be strongly mediated by the network of microbial interactions. Effectively, when interactions have been taking into account, the optimization model has matched well the functional experimental data. In contrast, without interactions, only one of the two functions performed in the nitrifying chemostat was carried out by the virtual nitrifying community present in the model. Understanding links between biotic interactions, biodiversity structure and the functioning of an ecosystem remains one of the main challenges in ecology. Nevertheless, increasing numbers of studies conclude that the network of biotic interactions plays an important role in the efficiency of an ecosystem or bioprocess (Duffy 2002; Montoya and Solé 2003). In the same way, Arditi et al. (2005) have modeled non-trophic effects in food webs by the incorporation in the model of the possibility of a functional change in the trophic interaction between two species caused by a third species (Arditi, Michalski et al. 2005). Their results have shown that the probability of obtaining a super-efficient ecosystem (i.e. in which 90% or more of the nutrients are concentrated in the biomass) increases with the number of non-trophic interactions. In microbial ecology, studies interesting to bio-augmentation have generally shown that in bio-augmented chemostat, in which we can assume there is a higher number of interactions than in unaugmented chemostat, there is a better level of recovery of functions and activity (Boon, Top et al. 2003; Qu, Zhou et al. 2005).

Finally, the model integrating microbial interactions make it possible to obtain a network of virtual interactions linking the different species present in our system. There is a higher number of positive interactions (62%) than negative. In particular, we can note that no competition occurred between *Nitrosomonas eutropha* and *Bacteroidetes* (AOB_1 and AOB_2, respectively) but, on the contrary, there was mutualism or facilitation. This can be explained by the production of dual by-products from *N. eutropha* to *Bacteroidetes* and *Bacteroidetes* to *N. eutropha,* as proposed by Hebeler et al. (2006). Another explanation might to assume be the strong intra-species competition in both AOB populations, which can be compared to the study

of Ruan et al. (2007). This author considered a two-competitor/one prey model and explained the coexistence of the two competitors by density-dependent mortality for one of the two species (Ruan, Ardito et al. 2007). This assumption would also explain the coexistence of both NOBs. The dependence of the NOB on the nitrites produced by the AOBs is reflected in the results of the model by positive effects of both AOBs on both NOBs. In contrast, the negative effect of each NOB on one of the two AOBs seems to be more difficult to explain. One hypothesis is the competition for oxygen between the two functional communities but it was shown that reducing oxygen leads to the formation of nitrite instead of nitrate (Sliekers, Haaijer et al. 2005). Moreover, nitrite-oxidizing bacteria appear to be poor competitors for oxygen compared with pure cultures of AOB (Laanbroek and Gerards 1993). Another hypothesis is that there may be a negative density effect from the NOB to the AOB.

To sum up, we have developed a model of a classic nitrifying chemostat to study the interaction of four species within two functional groups: two AOBs and two NOBs. The network of virtual interactions obtained explains the coexistence of these 2+2 species on 1+1 growth-limiting resources. Therefore, a more complete model should include multi-functional groups of organisms, including nitrifying and denitrifying heterotrophs, phosphorus-accumulating organisms… In addition, this study focused on the impact of interactions within a single trophic level (bacteria). The effects of the presence of higher trophic levels such as ciliates (predators) and carnivores (top predators) should also be considered.

IX. DE L'INFLUENCE DE PERTURBATIONS BIOTIQUES SUR LA DIVERSITÉ ET LE FONCTIONNEMENT DE BACTÉRIES NITRIFIANTES EN CHÉMOSTATS

« Du bout de l'horizon accourt avec furie le plus terrible des enfants que le Nord eût porté jusque-là dans ses flancs. L'Arbre tient bon ; le Roseau plie... »
Jean de la Fontaine.

Au cours de notre suivi des chémostats nitrifiants, deux perturbations biotiques ont été appliquées aux communautés nitrifiantes installées dans les chémostats expérimentaux : une perturbation globale et une ciblée. L'analyse de l'influence de ces perturbations sur la diversité et le fonctionnement des bactéries nitrifiantes, présentée ci-dessous, constitue des résultats complémentaires au travail de modélisation des interactions.

IX.1. L'influence de la perturbation biotique globale

La perturbation globale, réalisée à t=121 jours après inoculation a consisté en le renouvellement de 10% de la biomasse des chémostats A et B par une biomasse issue du réacteur de réserve présentant une structure de communauté différente (cf. chapitre VI.4.2.1.).

IX.1.1. L'influence populationnelle de la perturbation biotique globale

Du point de vue populationnel, les effets de la perturbation biotique globale peuvent être suivis par l'analyse de la distance euclidienne entre les profils SSCP obtenus juste avant le renouvellement de biomasse et les profils obtenus après. En effet, la distance euclidienne permet d'apprécier la différence de structure de communauté entre deux profils, définis par deux vecteurs $x_{1,n}$ et $y_{1,n}$, par la relation :

$$DE = \sqrt{\sum_{i=1}^{n} |x_k - y_k|^2}$$

avec « x » et « y » correspondant à l'aire des pics d'un profil

Suivant cette distance euclidienne, il apparait que la perturbation a bien engendré une augmentation de la diversité dans les deux communautés microbiennes. Néanmoins, les deux chémostats présentent des réponses quelque peu différentes (Fig. 49).

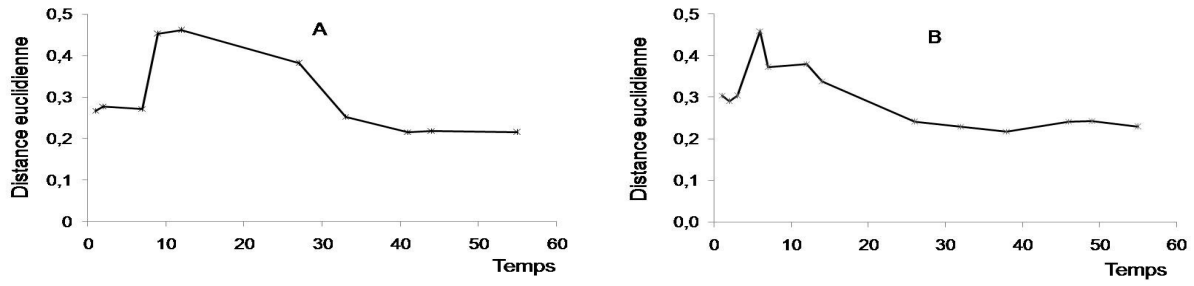


Figure 49 : Evolution de la distance euclidienne entre le profil SSCP obtenu juste avant la perturbation biotique globale consistant en le renouvellement de 10% de la biomasse présente dans chaque chémostat par une biomasse nitrifiante plus diverse issue d'un réacteur de réserve.

Dans le chémostat A, l'effet de la perturbation semble intervenir relativement tard après son application. En effet, ce n'est que huit jours après renouvellement de la biomasse qu'une augmentation importante de la distance euclidienne est relevée (Fig. 40, A) tandis que la réaction semble quasi-instantanée dans le réacteur B (Fig. 40, B). De plus, la communauté A présente une résilience relativement longue, car il faut attendre plus de 30 jours avant de noter un retour à l'état initial contre « seulement » environ 20 jours pour la communauté B. Ainsi, le chémostat A présenterait une meilleur résistance au choc mais une résilience plus lente que le chémostat B. Une telle différence de comportement pourrait éventuellement s'expliquer par des différences dans le maillage d'interactions liant les espèces déjà assemblées dans les communautés avant la perturbation. La modélisation de ces interactions pour les deux systèmes pourrait permettre de tester cette hypothèse.

IX.1.2. L'influence fonctionnelle de la perturbation biotique globale

La perturbation biotique globale semble également avoir eu des effets sur le fonctionnement des chémostats. En effet, les mesures chimiques montrent une baisse de la production de nitrite dans les deux chémostats immédiatement après la perturbation (Fig. 50).

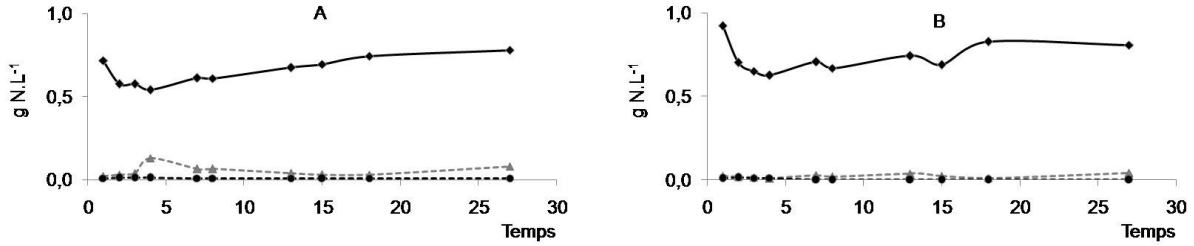


Figure 50 : Suivi des concentration en nitrite (courbe noire continue), nitrates (courbe noire en pointillé) et de l'azote résiduel (courbe crise en pointillé) en g N.L-1 après application de la perturbation biotique globale consistant en le renouvellement de 10% de la biomasse présente dans chaque chémostat par une biomasse nitrifiante plus diverse issue d'un réacteur de réserve.

Cette baisse de la production de nitrite s'effectue sans augmentation dans la concentration des autres composants de la réaction de nitrification conduisant à un bilan de matière incomplet pour les deux chémostats. Ce résultat pourrait s'expliquer par la compétition entre bactéries nitritantes

avec une accaparation de l'azote par les espèces « invasives » qui s'en serviraient pour leur croissance et leur maintenance dans les chémostats. Par ailleurs, il est à noter que malgré le fait que la biomasse introduite exprimait les deux fonctions, nitritante et nitratante, dans le réacteur de réserve d'où elle est issue, la production de nitrate reste totalement nulle dans les deux chémostats après perturbation.

IX.2. L'influence de la perturbation biotique ciblée

La perturbation ciblée, réalisée à t=502 jours après inoculation a consisté en le renouvellement de 20% de la biomasse des chémostats A et B par une biomasse de la bactérie nitratante *Nitrobacter hamburgensis* préalablement cultivée en condition de souche pure (cf. chapitre VI.5.2.2.).

IX.2.1. L'influence populationnelle de la perturbation biotique ciblée

Du point de vue populationnel, les effets de la perturbation biotique ciblée peuvent être suivis par l'analyse de la distance euclidienne de la même manière que précédemment (Fig. 51).

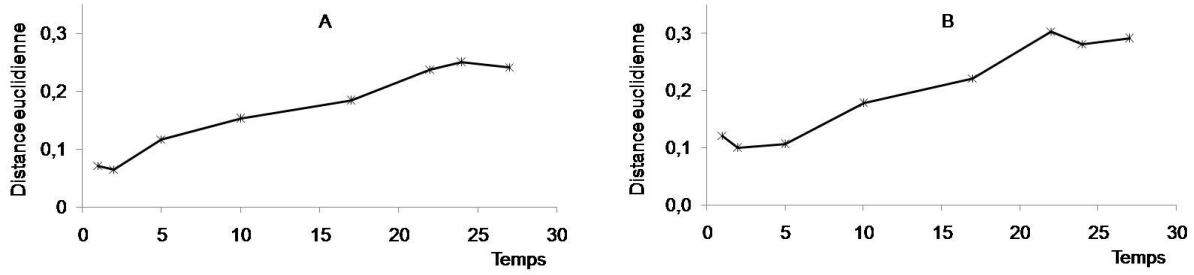


Figure 51 : Evolution de la distance euclidienne entre le profil SSCP obtenu juste avant la perturbation biotique ciblée consistant en le renouvellement de 20% de la biomasse présente dans chaque chémostat par une biomasse de la bactérie nitratante *Nitrobacter hamburgensis*.

Suite à la perturbation, la distance euclidienne croit progressivement pour les deux communautés nitrifiantes A et B. De plus, cette divergence par rapport à l'état initial s'accompagne d'une diminution de la diversité microbienne. En effet, tandis que les chémostats A et B présentaient un indice de Simpson d'une valeur respective de 2,65 et 2,45 avant l'introduction de la culture de *Nitrobacter*, celle-ci diminue à 1,79 et 2,03 respectivement. Ainsi, suite à cette perturbation, aucun des chémostats ne résilie mais au contraire chacun voit sa structure de communauté grandement modifiée se traduisant notamment par l'émergence d'une nouvelle espèce nitritante majoritaire. Cette dernière correspond à *Bacteroidetes* prise en compte dans la modélisation des interactions réalisée pour le chémostat B sous la dénomination AOB_2. De plus, *Nitrobacter hamburgensis* présente une abscisse de migration en SSCP correspondant au pic numéro 5 des profils soit à la séquence identifiée comme *Nitrobacter sp* par clonage-séquençage (cf Tableau 2, page 13). Ce phylotype a également été considéré dans la

modélisation des interactions sous la dénomination NOB_1. Or la modélisation a établi que NOB_1 entretenait une forte relation mutualiste avec AOB_2 (α=0,9) et une forte relation négative avec AOB_1 (α=-0,9) correspondant à *Nitrosomonas eutropha*, soit le phylotype majoritaire avant la perturbation. Ainsi, l'augmentation du nombre d'individus de la population de *Nitrobacter* aurait fortement avantagé la population de *Bacteroidetes* aux dépens de celle de *Nitrosomonas* conduisant au switch populationnel observé.

IX.2.2. L'influence fonctionnelle de la perturbation biotique ciblée

Du point de vue fonctionnel, aucune modification n'a été observée que ce soit au niveau de la production de nitrite ou de celle de nitrate (Fig. 52).

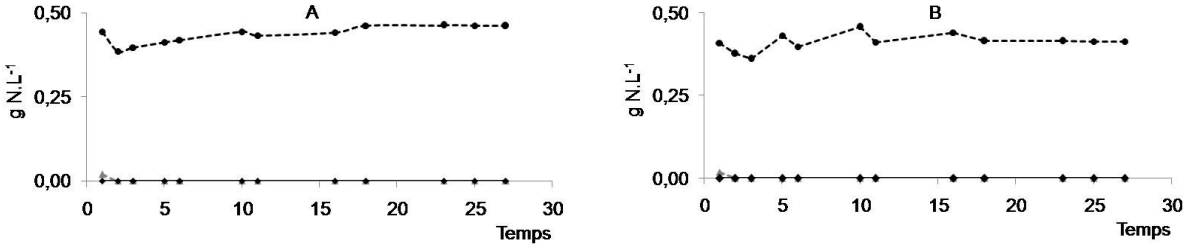


Figure 52 : Suivi des concentration en nitrite (courbe noire continue), nitrate (courbe noire en pointillés) et de l'azote résiduel (courbe crise en pointillés) en g N.L-1 après application de la perturbation biotique globale consistant en le renouvellement de 10% de la biomasse présente dans chaque chémostat par une biomasse nitrifiante plus diverse issue d'un réacteur de réserve.

Ainsi, le switch populationnel observé consécutif à la perturbation ciblée s'est réalisé sans influence sur le fonctionnement macroscopique des chémostats.

Discussion générale, Conclusion et perspectives

Où il sera question :

- *Du potentiel des chémostats en écologie microbienne*
- *De la difficulté de la modélisation des systèmes microbiens*
- *De la pertinence des approches transdisciplinaires*

Dans la première partie de cette thèse consacrée à l'Ecologie générale, nous avons synthétisé les connaissances relatives à la complexité du vivant et au fonctionnement des écosystèmes. Nous avons souligné les barrières subsistant entre les biologistes et les mathématiciens conduisant à la production de nombreux jeux de données n'ayant pas fait l'objet d'analyses mathématiques ainsi qu'à la production d'un grand nombre de modèles purement théoriques, jamais confrontés à des mesures réelles et qui par là même peuvent s'avérer biologiquement fantaisistes. Nous avons montré qu'une telle dichotomie pouvait conduire à des résultats contradictoires lorsqu'il s'agit d'étudier le lien entre la diversité biologique et la stabilité et/ou la productivité des écosystèmes ainsi que lorsqu'il s'agit d'étudier la coexistence d'espèces différentes dans un milieu présentant un nombre limité de ressources disponibles. Dans la seconde partie de ce manuscrit, consacrée plus spécifiquement à l'Ecologie microbienne, nous avons souligné que les caractéristiques des écosystèmes microbiens en font des modèles d'étude pertinents pour aborder ces questions importantes de l'écologie générale par une approche expérimentale et théorique. Néanmoins l'utilisation de ceux-ci demeure marginale notamment du fait de la difficulté à extraire certaines informations clés telles que le rôle fonctionnel des différentes espèces présentes dans un écosystème microbien donné. Au cours de cette thèse, **nous avons proposé une méthode générique sans *a priori* faisant intervenir des empreintes moléculaires et des outils de l'automatique, des observateurs, pour assigner une des fonctions étudiées d'un écosystème donné à chacun des différents phylotypes détectés**. Cette méthode de traitement a été appliquée à des données expérimentales issues du suivi de bactéries nitrifiantes en chémostats. Les résultats obtenus par cette approche ont été validés par le clonage-séquençage de l'ADNr 16S des phylotypes, les bactéries nitrifiantes étant caractérisées par un fort lien phylogénie-fonction (Purkhold, Pommerening-Roser et al. 2000). Cette méthode d'assignation fonctionnelle présente l'avantage d'être indépendante des cinétiques de la réaction étudiée telles que le taux de croissance, la température, le pH... Seuls les coefficients de rendement de chaque communauté fonctionnelle sont nécessaires pour permettre l'estimation de leur biomasse respective par les observateurs que nous avons élaborés. Ainsi, cette approche peut facilement être transposable à tout écosystème pour lequel il est possible de réaliser des mesures permettant d'établir un schéma réactionnel et pour lequel la diversité biologique est « lisible » c'est-à-dire qui ne sature pas les empreintes moléculaires, de manière à bien discriminer les différents phylotypes. Cette méthode générique permettant de déterminer « qui est impliqué dans quelle fonction » peut avantageusement être couplée avec les méthodes moléculaires classiques permettant de déterminer « qui fait quoi » dans un écosystème comme par exemple les techniques de SIP, pour Stable Isotope Probing (Neufeld, Dumont et al. 2007), ou de FISH-MAR, pour Fluorescence In Situ hybridization avec Microautoradiography (Lee, Nielsen et al.

1999; Ouverney and Fuhrman 1999). Un tel couplage permettrait (i) de discriminer, par notre approche, les différentes communautés fonctionnelles c'est-à-dire les différents phylotypes en interactions pour une fonction donnée (ii) de déterminer, par les approches classiques, les phylotypes qui dans chaque communauté contribuent activement à la fonction considérée. Ainsi, cela permettrait de différencier les interactions trophiques des interactions rhéagogiques, telles que définies par Arditi et al. (2005), dans un écosystème microbien donné.

Les empreintes moléculaires apparaissent comme des outils pertinents en écologie microbienne. En effet, elles permettent, par une même mesure, d'avoir accès à la dynamique des phylotypes, à la structure et à la richesse spécifique de la communauté assemblée dans un écosystème donné (Muyzer and Smalla 1998; Loisel, Harmand et al. 2005), à caractériser le flux énergétique qui le parcours par un nouvel indice écologique (Marzorati, Wittebolle et al. 2008) et désormais à avoir accès au rôle fonctionnel des différents phylotypes. Il ne fait pas de doute que d'autres informations se cachent encore sous ces profils de pics et/ou de bandes et seront progressivement mises au jour, permettant d'améliorer notre connaissance du monde microbien. Ces informations seront d'autant plus pertinentes en étant utilisées comme des entrées de modèle d'interactions permettant d'apporter des éléments de réponse quant à des questions centrales de l'écologie générale.

Au cours de notre thèse, **nous avons réalisé une telle modélisation des interactions intra et interspécifiques, trophiques et non-trophiques pouvant s'établir entre différents phylotypes assemblés.** Ce travail, qui est à notre connaissance la première tentative visant à confronter des données expérimentales aux simulations délivrées par un modèle de type bilan de matière comprenant plus de biomasses que de fonctions exprimées, a permis de mettre en évidence l'importance de considérer les différents types d'interactions pour une meilleure compréhension du lien diversité-fonctionnement d'un écosystème. En effet, les résultats que nous avons obtenus montrent que le maillage d'interactions peut expliquer la coexistence de plusieurs espèces qui semblent en compétition pour un même substrat limitant. De plus, il apparaît que les fonctions exprimées par l'écosystème sont fortement influencées par le réseau d'interactions biotiques. Cette modélisation nous a également conduit à l'obtention d'un réseau virtuel d'interactions permettant de mieux comprendre les relations entre les quatre phylotypes, deux nitritants et deux nitratants, que nous avons considérés. Ce réseau nous a fourni des informations pertinentes pour analyser la dynamique des phylotypes en réponse aux perturbations biotiques globales et ciblées que nous avons appliquées à nos chémostats expérimentaux. Ces derniers, associés aux outils d'analyses moléculaires et d'automatique se sont ainsi révélés être des outils intéressants pour des études d'écologie microbienne.

X.1. Le potentiel des chémostats en écologie microbienne

Les chémostats fournissent des modèles expérimentaux qui sont d'autant plus intéressants qu'ils permettent d'étudier de façon précise un certain nombre de facteurs pouvant influencer le maintien de la diversité et le fonctionnement de la communauté qui y est assemblée. Ainsi, nous avons pu tester les effets de perturbations abiotiques et biotiques sur la résistante et/ou résilience des espèces présentes. Il serait notamment intéressant d'approfondir l'influence des perturbations biotiques sur la structure de la communauté ainsi que sur les fonctions exprimées au niveau de l'écosystème. Des perturbations globales et ciblées pourraient ainsi être renouvelées avec des intensités graduelles qui permettraient de mieux caractériser les capacités de résistance et/ou de résilience. Les perturbations globales pourraient être effectuées avec des biomasses encore plus diverses et acclimatées ou non aux conditions opératoires en chémostats par exemple en introduisant de la boue activée issue d'une station d'épuration ou encore avec une biomasse issue du sol. Les perturbations ciblées pourraient également être réalisées avec d'autres souches de bactéries nitratantes ainsi qu'avec des bactéries nitritantes. Un autre aspect qui serait également intéressant d'étudier vis-à-vis de ces perturbations est l'influence de l'histoire des communautés assemblées sur leur capacité de résilience et résistance. En effet, des études récentes ont mis en évidence qu'un écosystème « garderait en mémoire » les événements passés (Zemb 2006). Dans le cadre de notre dispositif expérimental, une même perturbation pourrait être mise en place sur les chémostats A et B ayant déjà fait l'objet de nombreuses perturbations et sur les chémostats D et E qui ont été maintenus dans des conditions constantes. Il pourrait être également intéressant de réaliser les mêmes perturbations biotiques sur des chémostats maintenus strictement dans les mêmes conditions opératoires et environnementales mais inoculés avec des biomasses différentes.

Par ailleurs, au cours de notre thèse, nous avons pu constater que deux chémostats opérés de façon strictement identiques et inoculés avec la même biomasse microbienne pouvaient diverger fonctionnellement et populationnellement. En effet, tandis que le chémostat A perdait la fonction nitratante à t=240 jours et présentait une faible diversité microbienne, le chémostat B conservait l'expression des deux fonctions de la nitrification et présentait une diversité microbienne plus importante. Une hypothèse qui peut être émise pour expliquer ces résultats est l'hypothèse virus. Les virus, qui sont une cause majeure de la mortalité des bactéries, sont de plus en plus considérés comme des acteurs importants de l'activité et de la structuration de communautés microbiennes aquatiques (Wommack and Colwell 2000). En effet, il apparaît que les virus peuvent réguler la diversité bactérienne dans la mesure où une bactérie qui viendrait à dominer dans un écosystème et donc à augmenter la taille de sa population, augmenterait du même coup

les probabilités de rencontrer et de se faire infester par un virus (Thingstad and Lignell 1997). Cette assertion constitue « l'hypothèse virus » également connu sous la dénomination « killing the winner » (littéralement : « tuer le meilleur » étant sous entendu que le « meilleur » est le vainqueur de la sélection naturelle). Après infestation et lyse de la cellule hôte par le virus, les débris cellulaires seraient relargués dans le milieu contribuant ainsi au pool de matière organique disponible pour les autres bactéries présentes dans l'écosystème (Fuhrman 1999). Quelques rares études expérimentales ont été réalisées pour tenter de mieux caractériser l'influence de ces virus sur le fonctionnement et la structure des communautés. Il a ainsi pu être mis en évidence une corrélation positive entre le nombre de virus et la quantité de biomasse microbienne dans un milieu donné (Heldal and Bratbak 1991; Maranger and Bird 1995). D'autres études, portant sur l'activité des bactéries ont révélé que la région où la production bactérienne était la plus élevée correspondait à celle où se trouvait le plus grand nombre de virus (Maranger, Bird et al. 1994). Ainsi, dans le cadre de nos chémostats nitrifiants, nous pourrions envisager qu'un virus puisse être à l'origine de la plus grande diversité mesurée dans le chémostat B en engendrant une diminution de l'espèce majoritaire, qui se trouvait être la bactérie nitritante *Nitrosomonas eutropha* juste avant la divergence observée, favorisant du même coup les bactéries nitratantes et donc le maintient des deux fonctions. Il existe quelques protocoles expérimentaux permettant l'isolement et l'indentification de virus à partir d'échantillons liquides (Alonso, Rodriguez et al. 1999; Jiang, Fu et al. 2003; Zemb, Urios et al. 2008). Aussi, il serait possible de suivre, parallèlement à la dynamique des phylotypes et des fonctions exprimées, la dynamique des virus présents dans les chémostats afin de mieux caractériser leur rôle potentiel dans la divergence de chémostats jumeaux. Par ailleurs, cette divergence observée soulève des interrogations quant à l'approche mise en œuvre pour la modélisation des systèmes microbiens.

X.2. La difficulté de la modélisation des systèmes microbiens

X.2.1. La question du chaos déterministe

Comme nous l'avons vu précédemment (chapitre II.2.2.3), certains systèmes dynamiques peuvent s'avérer très sensibles aux petites variations de leurs conditions initiales telles que le nombre d'individus dans les populations considérées ou encore la présence ou non de virus dans la communauté. Ces variations peuvent ensuite prendre d'énormes proportions, générant des trajectoires « imprévisibles » et conduisant à la définition du chaos déterministe. Le mathématicien russe Alexander Lyapunov (1857-1918) a particulièrement étudié ce phénomène et a développé un outil permettant de mesurer la vitesse à laquelle ces petites variations peuvent s'amplifier. Cet outil, appelé « exposant de Lyapunov » (noté LE), mesure en fait le degré de

sensibilité d'un système dynamique à une variation infinitésimale de ses conditions initiales. Son expression mathématique est la suivante :

$$LE = \lim_{n\to\infty} \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} \ln|(f'(X_{i-1}))|$$

avec « n » correspondant au nombre d'itérations et « X » au nombre d'individus dans la population.

Selon l'exposant de Lyapunov, un système sensible à de très petites variations des conditions initiales aura une valeur positive tandis qu'elle sera négative si ces variations n'ont pas d'effets à long terme sur le système. Pour illustrer simplement ce propos, les résultats obtenus avec le modèle logistique défini par $X_{i+1} = \mu X_i(1 - X_i)$ et sa représentation sous forme du diagramme de Feigenbaum peuvent être utilisés (Fig. 53).

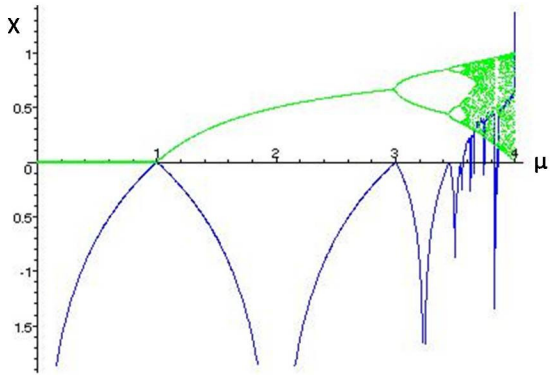


Figure 53 : Dynamiques d'une population selon le modèle logistique, ou de Verhulst, en fonction de la valeur des paramètres X_0 et r. En vert, représentation sous forme du diagramme de Feigenbaum. En bleu, valeurs de l'exposant de Lyapunov correspondant.

Il apparaît bien que les valeurs négatives de l'exposant de Lyapunov correspondent aux valeurs du taux de croissance (μ) pour lesquelles le système se stabilise avec le temps. De plus, plus la valeur de l'exposant de Lyapunov est grande et négative, plus le système est stable. Inversement, lorsque le système passe la porte d'entrée sur le chaos, les valeurs de l'exposant deviennent positives.

Récemment, une étude a mis en évidence, en utilisant l'exposant de Lyapunov, que des bactéries nitritantes et nitratantes en chémostat pouvaient présenter une dynamique chaotique (Graham, Knapp et al. 2007). Ces auteurs ont suivi par PCR quantitative l'évolution des AOB et de deux NOB (*Nitrospira* et *Nitrobacter*) dans trois chémostats différant par leur taux de dilution. Ils ont ainsi montré que plus la valeur du taux de dilution est forte, plus la dynamique des bactéries nitrifiantes est chaotique. Néanmoins, une critique qui peut être faite à leur étude est d'avoir testé l'exposant sur les cinétiques obtenues pendant 200 jours immédiatement après l'inoculation des réacteurs par une forte quantité de boue activée issue d'une station d'épuration.

En effet, ces auteurs ont rempli leurs réacteurs avec 33% de boues activées et 67% d'un milieu synthétique minéral comparable au notre, avant de les alimenter uniquement avec du milieu synthétique. Ce faisant, Graham et al. ont donc fortement perturbé les populations bactériennes présentes dans les boues en modifiant radicalement et rapidement leur environnement. Ainsi, l'aspect chaotique des dynamiques des AOB et des NOB pourrait être dû à cette importante perturbation.

En ce qui nous concerne, l'inoculum a fait l'objet d'une longue acclimatation de 10 mois avant que le suivi des chémostats ne commence réellement. De plus, le taux de dilution que nous avions fixé était très faible. Nous n'avons pas pu tester l'exposant de Lyapunov sur la dynamique des phylotypes que nous avons obtenue par SSCP pour les chémostats A et B du fait des nombreuses perturbations réalisées. L'exposant pourrait néanmoins être testé pour les réacteurs stables D et E mais nous ne disposons pas d'un nombre suffisant de points dans les cinétiques populationnelles, une grande partie des analyses moléculaires n'ayant pas encore été réalisée. Bien que cette hypothèse du chaos déterministe ne doive pas être négligée et mériterait effectivement d'être testée, il ne semble pas que les chémostats A et B présentent une telle dynamique. En effet, en dehors de la phase de divergence, les deux chémostats sont très semblables en ce qui concerne la structure de la population avec la même espèce majoritaire, et les mêmes phases de coexistence entre plusieurs espèces majoritaires. La divergence des chémostats jumeaux telle que nous l'avons observée pourrait davantage s'expliquer par un comportement « neutre » de la dynamique des phylotypes détectés par SSCP.

X.2.2. La question de la neutralité

Au cours du chapitre II.1. nous avons décrit sommairement les deux grandes approches qui peuvent être utilisées pour la modélisation des systèmes dynamiques : l'approche stochastique et l'approche déterministe. Dans le cadre de notre étude, nous avons opté pour une approche déterministe en représentant le schéma réactionnel de la réaction de nitrification par des équations différentielles, cette approche étant de loin la plus utilisée en Ecologie car respectant les principes de sélection naturelle et notamment le concept de « fitness » (i.e. ou d'avantage sélectif ce qui revient à dire que des individus mieux adaptés à des conditions données auront une capacité plus importante à avoir une descendance et donc à transmettre leurs gènes). Le modèle neutre s'oppose au concept de « fitness » en considérant qu'aucune espèce ne possède d'avantages sélectifs et donc que seul le « hasard » détermine la structure de la communauté. Cette évolution aléatoire peut se concevoir à chaque temps élémentaire en suivant les pas suivants (Volkov, Banavar et al. 2003) :

- Avec une probabilité 1-m, deux individus sont tirés aléatoirement parmi la communauté assemblée. S'il s'avère que ces deux individus sont identiques alors aucun changement n'est apporté. S'ils sont différents, l'un d'eux est retiré tandis que l'autre est dédoublé. Cela correspond donc à la mortalité d'un individu et au renouvellement de celui-ci par une naissance.
- Avec une probabilité m, un individu de la communauté assemblée est tiré aléatoirement et est remplacé par un individu extérieur à la communauté (i.e. issu de la métacommunauté par un flux de migration).

Le modèle neutre de Hubbell simule l'évolution d'une communauté suivant les règles évoquées ci-dessus par un système d'équations de probabilité. Ainsi, la divergence observée entre nos deux chémostats expérimentaux A et B pourrait être étudiée à la lumière d'un tel modèle. Il apparaît que les jeux de données que nous avons obtenus au cours de notre thèse sont pertinents pour ce travail de modélisation à venir (cf. Poster, « Microbial diversity and neutral chemostat » figurant en annexe). En particulier, le modèle neutre suggère que les groupes rares n'évoluent pas à la même vitesse que les groupes plus abondants. Dans le cas de nos systèmes nitrifiants, il serait alors possible de mettre en rapport les vitesses de divergence et les abondances relatives des bactéries nitritantes et des bactéries nitratantes obtenues par fingerprints. Néanmoins, dans la mesure où cette approche « neutre » contredit le principe philosophique de causalité qui n'est pas contredit par les lois de la physique, on peut se demander s'il existe réellement des systèmes stochastiques et si une telle approche est pertinente en écologie de façon générale et en écologie microbienne plus particulièrement. Emile Borel, à qui l'on doit la définition rigoureuse de la notion de probabilité, notait non sans humour : « La caractéristique des phénomènes que nous appelons fortuits ou dus au hasard (ou stochastiques), c'est de dépendre de causes trop complexes pour que nous puissions les connaitre toutes et les étudier ». Aussi, utiliser des modèles déterministes permettant de tester pas à pas différentes hypothèses quant à la structuration et au fonctionnement des écosystèmes semble plus en conformité avec nos connaissances de l'écologie et de l'évolution des espèces. Néanmoins, un problème qui se pose alors et que nous avons rencontré au cours de notre travail de modélisation déterministe est la question du niveau d'intégration de la diversité biologique dans les modèles mathématiques.

X.2.3. La question du niveau d'intégration de la diversité biologique dans les modèles mathématiques

X.2.3.1. Le niveau de diversité spécifique

Au cours de notre thèse, l'espèce a constitué le niveau d'étude de la diversité du monde microbien. Il a pu être remarqué que le terme « espèce » était néanmoins employé sous certaines

conditions par la précision : « au sens moléculaire », conduisant à sa substitution par le terme « phylotype ». Cette précision rend compte de la difficulté des microbiologistes à définir clairement une espèce. En effet, la définition classique d'une espèce biologique (i.e. « Communauté d'êtres vivants reconnaissables par leurs caractères et capables de se reproduire sexuellement entre eux en donnant naissance à une progéniture fertile » (Lherminer and Solignac 2000)) ne peut être appliquée aux bactéries du fait de l'absence de reproduction sexuée et des phénomènes de transferts horizontaux de gènes. Par ces échanges génétiques, une bactérie peut recevoir des gènes d'une autre bactérie, issus de virus, ou même présent dans leur milieu, et renouveler ainsi 10, 20 ou même 90% de ses gènes (Margulis and Sagan 2002). Ceci conduit donc à la possibilité de sexualité sans reproduction, la sexualité étant définie comme « un processus de mélange ou d'union de gènes (i.e. de morceaux d'ADN) de sources distinctes ». Si toutes les souches de bactéries peuvent mettre en commun tous leurs gènes alors il n'existe pas, au sens strict, de véritables espèces dans le monde des bactéries. Aussi, selon les termes des bactériologistes canadiens Sorin Sonea et Maurice Panisset, « les bactéries formeraient un organisme unique, une entité capable de génie génétique à l'échelle de la planète. Il s'agirait donc d'un seul et unique clone, complexe, composé de cellules hautement différenciées » (Sonea and Panisset 1983).

Il apparaît donc que la notion d'espèce en écologie microbienne n'a que peu de légitimité si ce n'est justement comme référenciel du niveau d'étude de la diversité, qu'il est malgré tout nécessaire de définir clairement. En 1987, un comité spécialisé, nommé par l'International Committee on Systematic Bacteriology (ICSB) a donné une première définition phylogénétique de l'espèce bactérienne qui se base sur les homologies d'ADN. Ainsi, selon ce comité, une espèce est définie génétiquement comme le rassemblement de souches ayant des homologies d'ADN suffisamment importantes pour que la valeur d'hybridation atteigne plus de 70% et que la différence de température de dénaturation soit inférieure à 5°C (Stackerbrandt and Goebel 1994). Compte tenu des progrès effectués dans l'étude de la systématique bactérienne, L'international Committee on Systematics of Prokaryotes (ICSP) a désigné un nouveau comité pour réévaluer la notion d'espèce bactérienne. Ce nouveau comité s'est réuni en février 2002 à l'université de Gand (Belgique) et a formulé des propositions supplémentaires tout en conservant l'étude des pourcentages d'hybridation et la stabilité thermique comme référence (Stackerbrandt, Frederiksen et al. 2002). Néanmoins, ces définitions ne présentent que peu d'intérêt lorsqu'il s'agit d'étudier la diversité microbienne dans un échantillon naturel ou plus généralement issu d'un écosystème complexe car elles ne sont pas applicables et n'ont pas nécessairement de réalité biologique.

Dans le cadre de notre étude, c'est la technique d'empreinte moléculaire SSCP basée sur la région V3 de l'ADNr 16S qui nous a permis de définir des « espèces » bactériennes. En effet, comme nous l'avons vu, les fingerprints constituent de bons outils pour étudier les communautés microbiennes dans la mesure où il s'agit de techniques parfaitement reproductibles qui permettent d'avoir accès à une diversité spécifique définie de manière constante d'un échantillon à un autre même si cette définition n'a pas nécessairement de sens biologique. Néanmoins, si les dynamiques de phylotypes obtenues par ces techniques de fingerprints peuvent constituer des entrées de modèles d'interactions inter- et intra-spécifiques, leurs utilisations sont limitées du fait du nombre de paramètres importants des modèles mathématiques correspondants. De plus, l'optimisation de tels modèles à partir de données mesurées requière une grande puissance de calcul ce qui se traduit par des temps de calcul extrêmement long. Ainsi, alors que nous avions détecté plus d'une quarantaine de phylotypes dans chacun de nos deux réacteurs expérimentaux, ces limitations nous ont contraint à ne considérer que quatre « espèces » en interactions (deux nitritantes et deux nitratantes dont les rôles fonctionnels ont préalablement été identifiés par notre méthode de discrimination mathématique et validées par clonage-séquençage) et à ne pouvoir réaliser l'optimisation de ce modèle que sur les données issues du réacteur B. Bien que l'on puisse supposer que la puissance de calcul des ordinateurs dont nous disposons ne cessera d'augmenter dans les années qui viennent et que la modélisation des interactions est la plus à même de permettre une meilleure compréhension du lien diversité-fonctionnement des écosystèmes, d'autres niveaux d'intégration de la diversité biologique dans la modélisation mathématique peuvent être envisagés.

X.2.3.2. Le niveau de diversité métabolique

La limitation en nombre de paramètres des modèles mathématiques, de la capacité de calcul des ordinateurs ainsi que la difficulté d'établir une définition robuste du concept d'espèce en microbiologie soulèvent effectivement le problème de la méthode d'observation de différentes bactéries assemblées dans une communauté. Aussi, plutôt que de chercher à discriminer différents « phylotypes » par une analyse de la région V3 de l'ADNr 16S comme nous l'avons fait au cours de nos travaux, il serait possible de considérer uniquement les gènes fonctionnels responsables des fonctions exprimées par les microorganismes. De cette manière, il serait possible de caractériser une communauté microbienne non plus en relation avec le concept d'espèce dont la définition prête à polémique en écologie microbienne mais en relation avec les voies énergétiques traversant le compartiment biologique des écosystèmes. Il s'agirait donc de décrire un écosystème en termes de réseau de métabolismes sans détailler le contexte cellulaire dans lequel ils s'effectuent. Néanmoins, une telle approche présente deux inconvénients. Le

premier est que les outils moléculaires permettant de cibler un gène fonctionnel particulier sont très limités et concernent généralement uniquement les fonctions majeures exprimées par un écosystème. Ceci conduit donc en quelque sorte à « ne voir que ce que l'on connait déjà » ainsi qu'à ne pas tenir compte d'une grande partie de la diversité microbienne et donc des interactions pouvant s'établir au sein d'une communauté fonctionnelle (cf « who does what » versus « who is involved in what » dans la discussion de l'article « Toward functional molecular fingerprint », chapitre VI.2.). Par ailleurs, la présence d'un gène fonctionnel dans un environnement donné ne veut pas forcément dire que ce gène est actif à l'instant considéré. Pour éviter ces écueils, il serait possible d'utiliser une méthode analogue à celle nous ayant permis de discriminer le rôle fonctionnel des microorganismes dans un écosystème complexe. En effet, à partir de données fonctionnelles, de la mesure de la biomasse totale et d'un schéma réactionnel bien adapté, il serait possible de générer la biomasse fonctionnelle active pour chacune des fonctions exprimées à l'aide d'un observateur mathématique et d'utiliser ces données simulées comme des entrées de modèle. Ce dernier pourrait également tenir compte des interactions pouvant s'établir entre les différentes biomasses actives. Néanmoins, une telle approche ne permettrait pas de tenir compte de la diversité et de la structuration des « espèces » microbiennes au sein de chaque communauté fonctionnelle active. Aussi, il serait intéressant d'exprimer la dynamique des communautés non pas en termes de concentrations en individus (i.e. biomasse) mais en termes d'un indice de diversité, tel que l'indice de Simpson, qui permettrait de refléter la richesse spécifique et l'abondance de la population de chaque espèce au sein de chaque communauté. Il est à noter qu'un tel travail a récemment été entrepris au Laboratoire de Biotechnologies de l'Environnement de Narbonne dans le cadre d'une approche de modélisation stochastique (VanPeteghem, Zemb et al. 2008). Concernant l'approche déterministe, ce travail s'avère plus délicat car contrairement au modèle neutre où chaque espèce est considérée comme équivalente et présente donc le même taux de croissance, la notion de fitness est respectée ce qui conduit à un ensemble de combinaisons de variables (i.e. de taux de croissance différents notamment) pour décrire l'évolution des différentes fonctions exprimées.

Ainsi, le choix du niveau d'intégration de la diversité biologique dans les modèles dépendra des outils d'analyse du monde microbien, des connaissances et possibilités dans l'aspect mathématique ainsi que de l'objectif du travail de modélisation qui lui-même définira le type de modèle pertinent pour y répondre.

X.2.4. La question du type de modélisation

Comme nous l'avons vu précédemment (chapitre III.3.2.), il existe un grand nombre de modèles différents ce qu'Israel qualifie de véritable « zoo » (Israel 1996). Compte tenu de la

grande diversité qu'ils représentent, il est difficilement envisageable de procéder à une classification exhaustive de ces modèles. Néanmoins, plusieurs catégories peuvent y être distinguées parmi lesquelles nous retiendrons particulièrement :

- Les modèles explicatifs qui servent à expliquer des phénomènes complexes par des mécanismes plus fondamentaux, plus élémentaires (Gouzé 1995). De tels modèles peuvent être utilisés pour tester des hypothèses permettant d'expliquer un comportement observé. Ainsi, le modèle de Lotka-Volterra peut être considéré comme un modèle explicatif dans la mesure où il permet d'expliquer les oscillations décalées d'une population de proies et d'une population de prédateurs. De la même manière, le modèle d'interactions que nous avons élaboré au cours de notre travail de thèse entre dans cette catégorie en expliquant la coexistence de plusieurs espèces en compétition pour un même substrat limitant. De tels modèles constituent des moteurs de réflexion ou encore ce qu'Israel qualifie de « sonde conceptuelle que l'on plonge dans la réalité » (Israel 1996).
- Les modèles d'automatique qui sont construits pour être ensuite intégrés dans un algorithme dont l'objectif global peut être de nature assez variée. Il peut s'agir en effet de développer une loi de commande pour réguler le système étudié ou l'amener vers un certain état auquel cas on parlera de contrôleur, d'estimer des variables ou des flux du système qui ne peuvent être mesurés par l'intermédiaire d'observateurs, de détecter et/ou de diagnostiquer une anomalie dans le fonctionnement du système. En général, les analyses nécessaires pour élaborer de tels algorithmes ne sont envisageables que pour une complexité du modèle relativement simple.

Ces différentes catégories de modèles sont difficilement conciliables, mais ne sont pas totalement déconnectées pour autant. En effet, la formalisation d'un modèle multi-objectif permettant tout à la fois d'expliquer, de prédire et de contrôler demeure un idéal qui paraît impossible à atteindre. Néanmoins, les travaux portant sur la croissance de microorganismes en chémostats faisant intervenir des outils moléculaires et physico-chimiques pour le suivi populationnel et fonctionnel peuvent constituer un point de convergence de ces différents types de modélisation. En effet, la complexité de la diversité biologique peut, dans une certaine mesure, être contrôlée en chémostats et il existe un corpus de lois assez bien établi pour la modélisation de ces bioprocédés (schéma réactionnel, bilan de matière, modèle de Monod). Par ailleurs, le chémostat présente l'avantage de pouvoir servir de modèle d'étude pour la compréhension des écosystèmes complexes ce qui implique un travail de modélisation explicatif (et éventuellement prédictif) mais constitue également un outil pour la dépollution des eaux urbaines ou la production de produits alimentaires ce qui implique un travail de modélisation

afin de mieux contrôler la bioréaction qui s'y produit et ainsi en augmenter le rendement. Ainsi, une approche transdisciplinaire s'avère pertinente pour l'étude et la modélisation de tels systèmes.

X.3. La pertinence des approches transdisciplinaires

En adoptant une démarche transdisciplinaire au cours de notre travail, nous avons montré qu'il était possible d'amener des éléments de réponse pertinents à des questions importantes en Ecologie. Ainsi, la détermination du rôle des différentes bactéries assemblées dans les fonctions exprimées au niveau de l'écosystème a pu être proposée grâce à la combinaison des connaissances issues de la microbiologie, des mathématiques, du génie des procédés et de l'automatisme. Il est évident qu'aucune de ces sphères de compétences prise séparément n'aurait été en mesure de proposer une méthode aussi générique. Une telle collaboration nécessite une bonne définition des problèmes posés ainsi qu'une certaine convergence de points de vue. En effet, si nous considérons le schéma réactionnel de la nitrification en chémostat telle que nous l'avons étudiée, différentes représentations peuvent être effectuées :

- Une représentation très simplifiée courante dans le génie des procédés et l'automatique notamment et qui conçoit le compartiment biologique comme une boîte noire. Ceci reflète le fait que dans ces domaines il s'agit surtout de contrôler et/ou d'optimiser un bioprocédé en jouant sur les paramètres biotiques. Les connaissances biologiques n'apparaissent alors pas fondamentales dans la mesure où les effets de variations des paramètres de contrôle sont appréciés directement sur les fonctions exprimées.
- Une représentation très complexe tenant compte des différents groupes fonctionnels, des bactéries lithotrophes, hétérotrophes, qui peut également considérer les bactéries et les Archaea, les différents produits co-métabolisés…etc. Une telle représentation sera plutôt l'apanage des microbiologistes et des biochimistes désireux de décrire la complexité du bioprocédé.

La nécessité de trouver un compromis alliant simplicité pour permettre l'analyse mathématique et complexité pour une bonne représentation du vivant constitue un apport bénéfique mutuel aux différents champs disciplinaires. De la même façon, la modélisation d'un système biologique nécessite une démarche progressive qui n'est pas forcément évidente pour un microbiologiste de formation qui aura tendance à vouloir aller directement vers un modèle complexe considérant beaucoup d'espèces en interactions. Des collaborations avec des modélisateurs permettent d'éviter de tels écueils et de vérifier la pertinence du modèle et de l'optimisation de celui-ci sur les données expérimentales à chaque étape.

Ainsi, le monde microbien, ses outils de culture tels que le chémostat et les outils d'analyse de sa diversité telles que les empreintes moléculaires constituent un ensemble très intéressant

tant pour améliorer nos connaissances en écologie que pour répondre à des objectifs concrets comme la dépollution de l'eau ou la production d'énergies alternatives (i.e. biogaz, biocarburants). Il ne fait aucun doute que l'utilisation de ce formidable potentiel sera d'autant plus pertinente que les projets de recherche seront transdisciplinaires.

Références bibliographiques, liste des illustrations, liste des tableaux

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Aarssen, L. W. (1997). "High productivity in grassland ecosystems: effected by species diversity or productive species." OIKOS 80: 183-184.

Ahmad, N., H. Xu, et al. (2008). "Enhanced biological nutrient removal by the alliance of a heterotrophic nitrifying strain with a nitrogen removing ecosystem." Journal of Environmental Sciences 20: 216-223.

Alcaraz-Gonzalez, V., R. Salazar-Pena, et al. (2005). "A tunable multivariable nonlinear robust observer for biological systems." Biological modelling 328: 317-325.

Alexander, M., K. C. Marshall, et al. (1960). "Autotrophy and heterotrophy in nitrification." Translation of International Congress in Soil Science 7th. Madison, Wisconsin, United State of America: 586-591.

Alonso, M. C., J. Rodriguez, et al. (1999). "Enumeration and isolation of viral particles from oligotrophic marine environments by tangential flow filtration." International Microbiology 2: 227-232.

Amann, R., J. Snaidr, et al. (1996). "In situ visualization of high genetic diversity in a natural microbial community." Journal of bacteriology 178(12): 3496-3500.

Andrews, J. (1968). "A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrate." Biotechnology and bioengeenering 10: 707-723.

Andrews, J. H. (1991). "Comparative Ecology of microorganisms and macroorganisms." Editions of Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Anthonisen, A. C., R. C. Loehr, et al. (1976). "Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid." Journal of the Water Pollution Control Federation 48(5): 835-852.

Arditi, R., J. Michalski, et al. (2005). "Rheagogies : modelling non-trophic effects in food webs." Ecological Complexity 2: 249-258.

Atlas, R. M. and R. Bartha (1998). "Microbial Ecology: Fundamentals and Applications." Editions Benjamin Cummings, London, England Vol. 4.

B

Bail, O. (1929). "Ergebnisse experimenteller populationsforschung." Zeitung Immun-Forsch 60: 10-15.

Bailey, J. E. and D. F. Ollis (1986). "Biochemical engineering fundamentals." McGraw-Hill.

Bano, N., S. Ruffin, et al. (2004). "Phylogenetic composition of Arctic Ocean archaeal assemblages and comparison with Antarctic assemblages." Applied and Environmental Microbiology 70: 781-789.

Barghoorn, E. S. and J. W. Schopf (1966). "Microorganisms three billion years old from the Precambrian of South Africa." Science 152(3723): 758-763.

Bastin, G. and D. Dochain (1990). "On-line estimation and adaptative control of bioreactors." Elsevier.

Bell, G. (2001). "Neutral macroecology." Science 293: 2413-2418.

Berlow, E. L., A. M. Neutel, et al. (2004). "Interaction strengths in food webs: issues and opportunities." Journal of Animal Ecology 73: 585-598.

Bernard, O. (2004). "La modélisation des systèmes biologiques : Allers-retours le long des fleuves qui circulent entre l'océan du réel et le lac des modèles." Habilitation à diriger des recherches: 1-95.

Bertness, M. D., G. H. Leonard, et al. (1999). "Testing the relative contribution of positive and negative interactions in rocky intertidal communities." Ecology 80: 2711-2726.

Bock, E., H. P. Koops, et al. (1986). "Cell biology of nitrifying bacteria." In: Nitrification, pp. 17-38. Prosser J.I. (ed), IRL Press, Oxford.

Bock, E., H. P. Koops, et al. (1989). "Nitrifying bacteria." In Autotrophic bacteria Schlegel H.G. and Bowien B. editions Springer-Verlag, Berlin: 81-96.

Bock, E., H. P. Koops, et al. (1991). "The biochemistry of nitrifying microorganisms." Shively J.M. and Barton L.L. editions, Academic Press, London, England: 171-200.

Bock, E. and M. Wagner (2001). "Oxidation of inorganic nitrogen compounds as an energy source." In: Dworkin M. et al (eds). The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community. Springer, Berlin, Heidelberg New York.

Bohannan, B. J. M. and R. E. Lenski (2000). "The relative importance of competition and predation varies with productivity in a model community." American Naturalist 156: 329-340.

Boon, N., E. M. Top, et al. (2003). "Bioaugmentation as a Tool To Protect the Structure and Function of an Activated-Sludge Microbial Community against a 3-Chloroaniline Shock Load." Applied and Environmental Microbiology 69(3): 1511-1520.

Bothe, H., G. Jost, et al. (2000). "Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments." FEMS Microbiology reviews 24(5): 673-690.

Bougard, D. (2004). "Traitement biologique d'effluents azotés avec arrêt de la nitrification au stade nitrite." Thèse INRA-Laboratoire de Biotechnologies de l'Environnement.

Bougard, D., N. Bernet, et al. (2006). "Influence of closed loop control on microbial diversity in a nitrification process." Water Science and Technology 53(4-5): 85-93.

Britton, N. F. (2004). "Essential mathematical biology." Editions Springer: 370 p.

Bruno, J. F. and M. I. O'Connor (2005). "Cascading effects of predator diversity and omnivory in a marine food web." Ecology letters 8(10): 1048-1056.

C

Caldeira, M. C., A. Hector, et al. (2005). "Species richness, temporal variability and resistance of biomass production in a Mediterranean grassland." Oikos 110(1): 115-123.

Cardinale, B. J. (2002). "Species diversity enhances ecosystem functioning through interspecific facilitation." Nature 415: 426-429.

Cavalier-Smith, T. (2006). "Cell evolution and Earth history: stasis and revolution." Philosophical transactions of the British Royal Society 361: 969-1006.

Chase, J. M., P. A. Abram, et al. (2002). "The interaction between predation and competition: a review and synthesis." Ecology Letters 5: 302-315.

Cohen, J. E., F. Briand, et al. (1990). "Community food webs : data and theory." Editions Springer-Verlag, Berlin.

Contois, D. E. (1959). "Kinetics of bacterial growth : relationship between population density and specific growth rate f continuous cultures." The Journal of general microbiology 21: 40-50.

Costanza, R., R. dArge, et al. (1997). "The value of the world's ecosystem services and natural capital." Nature 387(6630): 253-260.

Crerar, D. A., A. G. Fischer, et al. (1980). "Metallogenium and biogenic deposition of manganese from Precambrian to recent time." In Geology and geochemistry of manganese. Editions Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, Deutshland vol. III: 285-303.

D

Dabert, P., B. Sialve, et al. (2001). "Characterisation of the microbial 16S rDNA diversity of an aerobic phosphorus-removal ecosystem and monitoring of its transition to nitrate respiration." Journal of Applied Microbiology and Biotehnology 55: 500-509.

Daims, H., J. L. Nielsen, et al. (2001). "In situ characterization of Nitrospira-like nitrite oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants." Applied and Environmental Microbiology 67(11): 5273-5284.

De Angelis, D. L. (1975). "Stability and connectance in food web models." Ecology 56: 238-243.

Deruiter, P. C., A. M. Neutel, et al. (1995). "Energetics, Patterns of Interaction Strengths, and Stability in Real Ecosystems." Science 269(5228): 1257-1260.

Dochain, D. (1986). "On line parameter estimation, adaptive state estimation and control of fermentation processes." Ph.D thesis, Université Catholique de Louvain-la-Neuve, Belgique.

Dodd, M. E., J. Silvertown, et al. (1994). "Stability in the Plant-Communities of the Park-Grass-Experiment - the Relationships between Species Richness, Soil-Ph and Biomass Variability." Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 346(1316): 185-193.

Drake, J. A., G. R. Huxel, et al. (1996). "Microcosms as models for generating and testing community theory." Ecology 77(3): 670-677.

Drossel, B. and A. J. MacKane (2003). "Modelling food webs." In Handbook of Graphs and Networks (eds S. Bornholdt and H.G. Schuster), pp. 218-247. Wiley-VCH, Berlin.

Duffy, J. E. (2002). "Biodiversity and ecosystem function: the consumer connection." Oikos 99: 201-219.

Duffy, J. E., J. P. Richardson, et al. (2003). "Grazer diversity effects on ecosystem functioning in seagrass beds." Ecology letters 8: 301-309.

Dumont, M., A. Rapaport, et al. (2008). "Observers for microbial ecology - How including molecular data into bioprocess modeling." Proceeding of the 16th Mediterranean conference on control and automation.

E

Egli, K., C. Langer, et al. (2003). "Community analysis of ammonia and nitrite oxidizers during start-up of nitritation reactors." Appl Environ Microbiol 69(6): 3213-22.

Farnleitner, A., N. Kreuzinger, et al. (2000). "Comparative analysis of denaturing gradient gel electrophoresis and temporal temperature gradient gel electrophoresis in separating Escherichia coli uidA amplicons differing in single base substitutions." Applied and Environmental Microbiology 30: 427-431.

Feigenbaum, M. J. (1980). "The metric universal properties of period doubling bifurcations and the spectrum for a route to turbulence." Annals of the New York academy of Sciences 357: 330-336.

Fernandez, A., S. Huang, et al. (1999). "How stable is stable ? Function versus community composition." Applied and Environmental Microbiology 65: 3697-3704.

Fischesser, B. and M. Dupuis-Tate (1996). "Le guide illustré de l'Ecologie." Editions de La Martinière.

Fontaine, C., I. Dajoz, et al. (2006). "Functional diversity of plant-pollinator interaction webs enhances the persistence of plant communities." PLoS Biology 4: 29-135.

Fox, G. E., K. Pechman, et al. (1977). "Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to prokaryotic systematics." Journal of Systematic in Bacteriology 27: 44-57.

Fox, J. W. and J. MacGrady-Steed (2002). "Stability and complexity in microcosm communities." Journal of Animal Ecology 71: 749-756.

France, K. E. and J. E. Duffy (2006). "Consumer diversity mediates invasion dynamics at multiple trophic levels." OIKOS 113: 515-529.

Fredrickson, S. A. (1977). "Behavior of mixed cultures of microorganisms." Annual Reviews of Microbiology 31: 63-87.

Fromin, N., J. Hamelin, et al. (2002). "Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns." Environmental Microbiology 4: 634-643.

Frontier, S., D. Pichod-Viale, et al. (2004). "Ecosystème : Structure, Fonctionnement, Evolution." Editions Dunod 3ième édition: 550 p.

Fuhrman, J. A. (1999). "Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects." Nature 399: 541-548.

Fussmann, G. F., M. Loreau, et al. (2007). "Eco-evolutionary dynamics of communities and ecosystems." Functional Ecology 21: 465-477.

Gardner, M. R. and W. R. Ashby (1970). "Connectance of a large (cybernetic) systems: critical values for stability." Nature 228: 780-784.

G

Gause, G. F. (1934). "The struggle for existence." Editions Williams and Wilkins, Baltimore, USA.

Giller, P. S., U. G. Berninger, et al. (2004). "Biodiversity effects on ecosystem functioning : emerging issues and their experimental test in aquatic environments." OIKOS 104: 423-436.

Gleick, J. (1999). "La théorie du chaos : vers une nouvelle science." Editions Flammarion, collection Champs, Paris, France: 431 p.

Godon, J. J., F. Duthoit, et al. (2001). "Utilisation d'une technique d'empreinte moléculaire dans l'étude d'écosystèmes microbiens complexes. Application à la fabrication d'un fromage au lait cru "l'AOC Salers"." Lait 81: 257-262.

Godon, J. J., E. Zumstein, et al. (1997). "Microbial 16S rDNA diversity in an anaerobic digester." Water Science and Technology 36(7): 49-55.

Gouzé, J. L. (1995). "Analyse mathématique qualitative de modèles biologiques." Mémoire d'habilitation à diriger des recherches, Université de Nice.

Graham, D. W., C. W. Knapp, et al. (2007). "Experimental demonstration of chaotic instability in biological nitrification." The International Society for Microbial Ecology Journal 12(1-9).

Grant, P. R. (1999). "The ecology and evolution of Darwin's finches." Princeton University Press, Oxford, England.

Greenleaf, W. E. (1926). "The influence of volume of culture medium and cell proximity on the rate of reproduction of infusoria." Journal of Experimental Zoology 46: 143-167.

Grime, J. P., V. K. Brown, et al. (2000). "The response of two contrasting limestone grasslands to simulated climate change." Science 289(5480): 762-765.

Grover, J. P. (1997). "Resource competition." Editions Chapman and Hall, New York, USA Population and community biology series 19.

H

Hairston, N. G., F. E. Smith, et al. (1960). "Community structure, population control, and competition." American Naturalist 94: 421-425.

Hall, G. H. (1986). "Nitrification in lakes." In: Nitrification, pp. 127-156. Prosser J.I. (ed), IRL Press, Oxford.

Hanaki, K., C. Wantawin, et al. (1990). "Nitrification at low levels of dissolved oxygen with and without organic loading in a suspended-growth reactor." Water Research 24(3): 297-302.

Hansen, S. R. and S. P. Hubbell (1980). "Single-nutrient microbial competition: qualitative agreement between experimental and theoretically forecast outcomes." Science 207: 1491-1493.

Harder, W., J. G. Kuenen, et al. (1977). "A review of microbial selection in continuous culture." Journal of Applied Bateriology 43: 1-24.

Harding, G. (1960). "The competitive exclusion principle." Science 131: 1292-1297.

Havens, K. (1992). "Scale and structure in natural food webs." Science 257(1107-1109).

Hayashi, K. (1991). "PCR-SSCP: a simple and sensitive method for the detection of mutations in genomic DNA." PCR Methods Applications 1: 34-38.

Hayatsu, M., K. Tago, et al. (2008). "Various players in the nitrogen cycle: diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification." Soil science and plant nutrition 54: 33-45.

Hebeler, J., J. K. Schmidt, et al. (2006). "Coexistence in the chemostat as a result of metabolic by-products." Journal of Mathematical Biology 53: 556-584.

Hector, A., B. Schmid, et al. (1999). "Plant diversity and productivity experiments in European grasslands." Science 286(5442): 1123-1127.

Heldal, M. and G. Bratbak (1991). "Production and decay of viruses in aquatic environments." Marine Ecology Progress Series 72: 205-212.

Hillier, S. H., D. W. H. Walton, et al. (1990). "Calcareous Grasslands, Ecology and Management." Bluntisham editions, Huntingdon, England.

Holland, J. N., D. L. DeAngelis, et al. (2002). "Population dynamics and mutualism Functional responses of benefits and costs." American Naturalist 159(3): 231-244.

Holling, C. S. (1973). "Resilience and stability of ecological systems." Annual Rewiev of Ecology and Systems 4: 1-23.

Horner-Devine, M. C., M. A. Leibold, et al. (2003). "Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity." Ecology Letters 6(7): 613-622.

Hubbell, S. P. (2001). "The unified neutral theory of biodiversity and biogeography." Princeton University Press, Oxford: 375 p.

Hughes, A. R. and J. J. Stachowicz (2004). "Genetic diversity enhances the resistance of a seagrass ecosystem to disturbance." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(24): 8998-9002.

Huisman, J. and F. J. Weissing (1999). "Biodiversity of plankton by species oscillations and chaos." Nature 402: 407-410.

Huisman, J. and F. J. Weissing (2000). "Coexistence and resource competition." Nature 4: 407-432.

Hutchinson, G. E. (1957). "Concluding remarks." Proceedings of Cold Spring Harbour Symposium on quantitative biology 22: 415-427.

Hutchinson, G. E. (1961). "The paradox of the plankton." American Naturalist 95(882): 137-145.

Hutson, M. A. (1997). "Hidden treatments in ecological experiments: re-evaluating the ecosystem function of biodiversity." Oecologia 110: 449-460.

Huxley, T. H. (1888). "The struggle for existence and its bearing upon Man." Nineteenth Century 23: 161-180.

I

Israel, G. (1996). "La mathématisation du réel." Seuil.

J

Jacob, F. (2002). "Qu'est-ce que la Vie ?" Editions Odile Jacob, Paris, France.

Jessup, C. M., R. Kassen, et al. (2004). "Big questions, small worlds : microbial model systems in ecology." Trends in Ecology and Evolution 19(4): 189-197.

Jetten, M. S. M., S. Logemann, et al. (1997). "Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds." Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology 71(1-2): 75-93.

Jiang, S., W. Fu, et al. (2003). "The vertical distribution and diversity of marine bacteriophage at a station off Southern California." Microbial Ecology 45: 399-410.

Jossi, M., N. Fromin, et al. (2006). "How elevated pCO2 modifies total and metabolically active bacterial communities in the rhizosphere of two perennial grasses grown under field conditions." FEMS Microbial Ecology 55: 339-350.

Jost, C. (2000). "Predator-prey theory : hidden twins in ecology and microbiology." Forum 90(1): 202-208.

Juretschko, S., G. Timmermann, et al. (1998). "Combined molecular and conventional analysis of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: Nitrosococcus mobilis and Nitrospira-like bacteria as dominant populations." Applied and Environmental Microbiology 64(8): 3042-3051.

K

Kaewplpat, K. and J. Grady (2002). "Microbial population dynamics in laboratory-scale activated sludge reactors." Water Science and Technology 46: 19-27.

Kahmen, A., J. Perner, et al. (2005). "Diversity-dependent productivity in semi-natural grasslands following climate perturbations." Functional Ecology 19(4): 594-601.

Kardenavis, A. A., A. Kapley, et al. (2007). "Simultaneous nitrification and denitrification by diverse Diaphorobacter sp." Applied Microbiology Biotechnology 77: 403-409.

Kerr, B., M. A. Riley, et al. (2002). "Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock-paper-scissors." Nature 418(6894): 171-174.

Killham, K. (1986). "Heterotrophic nitrification." In: Nitrification, pp. 117-126. Prosser J.I. (ed), IRL Press, Oxford.

Kim, J. K., K. J. Park, et al. (2005). "Aerobic nitrification-denitrification by heterotrophic Bacillus strain." Bioressource Tehnology 96: 1897-1906.

Knowles, G., A. L. Downing, et al. (1965). "Determination of kinetic constants for nitrifying bacteria in mixed culture, with the aid of an electronic computer." Journal of General Microbiology 38: 263-278.

Koops, H. P. and A. Pommerening-Rôser (2001). "Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species." FEMS Microbial Ecology 37: 1-9.

Kowalchuk, G. A., A. W. Stienstra, et al. (2000). "Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria in soil of successional grasslands of the Drentesche A (The Netherlands)." FEMS Microbiology Ecology 31(3): 207-215.

Kremen, C., N. M. Williams, et al. (2004). "The area requirements of an ecosystem service: Crop pollination by native bee communities in California." Ecology Letters 7: 1109-1119.

Kuenen, J. G. and L. A. Robertson (1988). "Ecology of nitrification and denitrification." In: The nitrogen and sulphur cycles, pp. 161-218. Cole J.A. and Fergusson S.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge.

Kuijper, L. D. J., B. W. Kooi, et al. (2003). "Omnivory and food web dynamics." Ecological Modelling 163: 19-32.

L

Laanbroek, H. J. and S. Gerards (1993). "Competition for limiting amounts of oxygen between Nitrosomonas europaea and Nitrobacter winogradsky grown in mixed continuous cultures." Archives of Microbiology 159: 453-459.

Lane, D. J., B. Pace, et al. (1985). "Rapide determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis." Proceeding of the National Academic in Science of the United State of America 82: 6955-6959.

Lawton, J. H. (1995). "Ecological experiments with model systems." Science 269: 328-331.

Laylor, L. R. (1978). "A comment on randomly constructed model ecosystem." American Naturalist 112: 445-447.

Lee, N., P. H. Nielsen, et al. (1999). "Combination of Fluorescent In Situ Hybridization and Microautoradiography, a New Tool for Structure-Function Analyses in Microbial Ecology." Applied and Environmental Microbiology 65(3): 1289-1297.

Leibold, M. A. (1995). "The niche concept revisited: mechanistic models and community context." Ecology 75: 1371-1382.

Lemesle, V. and J. L. Gouzé (2004). "Hybrid bounded error observers for uncertain bioreactor models." Bioprocess and Biosystems Engineering 27: 311-318.

Lherminer, P. and M. Solignac (2000). "L'espèce: définitions d'auteurs." Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie 323(2): 153-165.

Li, B., S. Irvin, et al. (2007). "The variation of nitrifying bacterial population sizes in a sequencing batch reactor (SBR) treating low, mid, high concentrated synthetic wastewater." JOURNAL OF ENVIRONMENTAL ENGINEERING AND SCIENCE 6(6): 651-666.

Lin, Y., H. Kong, et al. (2007). "Isolation and characterization of a new heterotrophic nitrifying Bacillus sp strain." Biomedical and Environmental Sciences 20: 450-455.

Lindeman, R. L. (1942). "The trophic-dynamic aspect of Ecology." Ecology 23: 399-418.

Liu, W., T. Marsh, et al. (1997). "Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment lengtg polymorphisms of gene encoding 16S rRNA." Environmental Microbiology 63: 4516-4522.

Lobry, C. and J. Harmand (2004). "A study about the coexistence of N species in the presence of a single resource."

Loisel, P., J. Harmand, et al. (2005). "Denaturing gradient electrophoreses (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity." Environmental Microbiology 3: 43-52.

Loreau, M. (1998). "Biodiversity and ecosystem functioning: A mechanistic model." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95(10): 5632-5636.

Loreau, M. and W. Ebenhoh (1994). "Competitive exclusion and coexistence of species with complex life cycles." Theoretical Population Biology 46: 58-77.

Loreau, M. and A. Hector (2001). "Partitioning selection and complementarity in biodiversity experiments." Nature 412: 72-76.

Loreau, M., S. Naeem, et al. (2001). "Biodiversity and ecosystem functioning : current knowledge and future challenges." Science 294(October 26): 804-808.

Lovelock, J. (1979). "Gaia, A new look at life on Earth." Oxford University Press.

Lueders, T. and M. W. Friedrich (2003). "Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and mcrA genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts." Applied and Environmental Microbiology 69: 320-326.

M

Mac Arthur, R. H. (1955). "Fluctuations of animal populations, and a measure of community stability." Ecology 36: 533-536.

Mac Arthur, R. H. (1967). "The limiting similarity, convergence and divergence of coexisting species." American Naturalist 101: 377-385.

Mac Arthur, R. H. and E. O. Wilson (1967). "The theory of island biogeography." Princeton University Press, Oxford.

Mac Grady-Steed, J., P. M. Harris, et al. (1997). "Biodiversity regulates ecosystem predictability." Nature 390: 162-165.

Macgillivray, C. W., J. P. Grime, et al. (1995). "Testing Predictions of the Resistance and Resilience of Vegetation Subjected to Extreme Events." Functional Ecology 9(4): 640-649.

Madritch, M. D. and M. D. Hunter (2003). "Intraspecific litter diversity and nitrogen deposition affect nutrient dynamics and soil respiration." Oecologia 136: 124-128.

Maranger, R. and D. F. Bird (1995). "Viral abundance in aquatic systems: a comparison between marine and fresh waters." Marine Ecology Progress Series 121: 1-3.

Maranger, R., D. F. Bird, et al. (1994). "Viral and bacterial dynamics in Arctic sea ice during the spring algal bloom near Resolute, N.W.T., Canada." Marine Ecology Progress Series 111: 121-127.

Margulis, L. and M. J. Chapman (1998). "Endosymbioses: cyclical and permanent in evolution." Trends in Microbiology 6(9): 342-345.

Margulis, L. and D. Sagan (2002). "L'Univers bactériel." Editions du Seuil: 339 p.

Martinez, N. D. (1992). "Constant connectance in community food webs." American Naturalist 139: 1208-1218.

Martinez, N. D. (1994). "Scale-dependent constraints on food-web structure." American Naturalist 144: 935-1218.

Marzorati, M., L. Wittebolle, et al. (2008). "How to get more out of molecular fingerprints: pratical tools for microbial ecology." Environmental Microbiology 10(6): 1571-1581.

Mathieu, J. P. (1991). "Dictionnaire de physique." Eyrolles: 567 p.

May, R. M. (1976). "Simple mathematical models with very complicated dynamics." Nature 261: 459-467.

May, R. M. (1981). "Theoretical Ecology, principles and applications." Editions Sinauer Associates, Oxford, England.

McCann, K., A. Hastings, et al. (1998). "Weak trophic interactions and the balance of nature." Nature 395(6704): 794-798.

Meers, J. L. (1971). "Effect of dilution rate on the outcome of chemostat mixed culture experiments." Journal of General Microbiology 67: 359-361.

Memmott, J., N. M. Waser, et al. (2004). "Tolerance of pollinisation networks to species extinctions." Proceedings of the Royal Society of London: Biological Sciences 271: 2605-2611.

Michalski, J. and R. Arditi (1999). "The complexity-stability problem in food web theory. What can we learn from exploratory models." Advances in Environmental and Ecological Modelling 4: 91-119.

Moeseneder, M. M., J. M. Arrieta, et al. (1999). "Optimization of Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis." Applied and Environmental Microbiology 65: 3518-3525.

Monod, J. (1950). "La technique de culture continue." Annales de l'Institut Pasteur 79: 390-410.

Montoya, J. M. and R. V. Solé (2003). "Topological properties of food webs: from real data to community assembly models." Oikos 102: 614-622.

Mooney, H. A. and E. E. Cleland (2001). "The evolutionary impact of invasive species." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98: 5446-5451.

Mounier, J., C. Monnet, et al. (2008). "Microbial interactions within a cheese microbial community." Applied and Environmental Microbiology 74(1): 172-180.

Moyer, C., F. Dobbs, et al. (1994). "Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaï." Applied and Environmental Microbiology 60: 871-879.

Mulder, C. P. H., D. D. Uliassi, et al. (2001). "Physical stress and diversity-productivity relationships: the role of positive interactions." Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 98: 6704-6708.

Muller-Landau, H. C. (2002). "Assessing recruitment limitation: concepts, methods and case-studies from tropical forest." Seed dispersal and frugivory: Ecology, Evolution and Conservation 5: 35-53.

Muyzer, G. (1999). "DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems." Current Opinion in Microbiology 2: 3217-3322.

Muyzer, G. and K. Smalla (1998). "Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology." Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology 73(1): 127-141.

N

Naeem, S. (1998). "Species redundancy and ecosystem reliability." Conservation Biology 12(1): 39-45.

Naeem, S., L. J. Thompson, et al. (1994). "Declining Biodiversity Can Alter the Performance of Ecosystems." Nature 368(6473): 734-737.

Nagy, L. A. (1974). "Transvaal stromatolite: first evidence for the diversification of cells about $2.2x10^9$ years ago." Science 183: 514-516.

Narihiro, T. and Y. Sekiguchi (2007). "Microbial communities in anaerobic digestion processes for waste and wasterwater treatment: a microbiological update." Current Opinion in Biotechnology 18(3): 273-278.

Nathan, R. and H. C. Muller-Landau (2000). "Spatial patterns of seed dispersal, their determinants and consequences for recruitment." Trends in Ecology and Evolution 15(7): 278-285.

Neufeld, J., M. Dumont, et al. (2007). "Methodological Considerations for the Use of Stable Isotope Probing in Microbial Ecology." Microbial Ecology 53(3): 435-442.

Neutel, A. M., J. A. P. Heesterbeek, et al. (2002). "Stability in real food webs: Weak links in long loops." Science 296(5570): 1120-1123.

Nogueira, R., L. F. Melo, et al. (2002). "Nitrifying and heterotrophic population dynamics in biofilm reactors: effects of hydraulic retention time and the presence of organic carbon." Water Research 36(2): 469-481.

Novick, A. and L. Szilard (1950). "Experiments with the chemostat on spontaneous mutations of bacteria." Proceeding of the National Academic in Science of the United State of America 36: 708-719.

O

Odum, E. P. (1953). "Fundamentals of ecology." Saunders editions, Philadelphia, USA.

Ogier, J. C., O. Son, et al. (2002). "Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis." Applied and Environmental Microbiology 68: 3691-3701.

Olson, J. M. (1970). "The Evolution of photosynthesis." Science 168: 438-446.

Ouverney, C. C. and J. A. Fuhrman (1999). "Combined Microautoradiography-16S rRNA Probe Technique for Determination of Radioisotope Uptake by Specific Microbial Cell Types In Situ." Applied and Environmental Microbiology 65(4): 1746-1752.

P

Pace, M. L., J. J. Cole, et al. (1999). "Trophic cascades revealed in diverse ecosystems." Trends in Ecology and Evolution 14: 483-488.

Paine, R. (2002). "Trophic control of production in a rocky intertidal community." Science 296: 736-739.

Paine, R. T. (1992). "Food-Web Analysis through Field Measurement of Per-Capita Interaction Strength." Nature 355(6355): 73-75.

Painter, H. A. (1970). "A review of litterature on inorganic nitrogen metabolism in microorganisms." Water Research 4: 393-450.

Pallen, M. and N. J. Mattzke (2006). "From the Origin of species to the origin of bacterial flagella." Nature 4: 784-790.

Park, T. (1948). "Experimental studies of interspecific competition. Competition between populations of the flour beetles *Tribolium confusum* and *Tribolium castaneum*." Ecological Monographs 98: 265-308.

Park, T. (1954). "Experimental studies of interspecific competition. Temperature, humidity and competition in two species of *Tribolium*." Physiological Zoology 27: 177-238.

Park, T. (1957). "Experimental studies of interspecific competition. Relation of initial species proportion to the competitive outcome in populations of Tribolium." Physiological Zoology 30: 22-40.

Pearl, R. and S. L. Parker (1922). "On the influence of density of population upon the rate of reproduction in Drosophila." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 8: 212-219.

Peitgen, H. O., H. Jurgens, et al. (1992). "Chaos and fractals: new frontiers of science and quot." Editions Springer-Verlag, Berlin, Deutschland.

Perrier, E. (1996). "La philosophie zoologique avant Darwin." Editions F. Alcan, Paris, France.

Persson, F., T. Wik, et al. (2002). "Distribution and activity of ammonia oxidizing bacteria in a large full-scale trickling filter." Water Research 36(6): 1439-1448.

Pfisterer, A. B., J. Joshi, et al. (2005). "Rapid decay of diversity-productivity relationships after invasion of experimental plant communities." Basic Applied Ecology 5: 5-14.

Pimm, S. L. (1982). "Food webs." Chapman and Hall editions, London, England.

Poduska, R. A. and J. F. Andrews (1975). "Dynamics of nitrification in the activated sludge process." Journal of the Water Pollution Control Federation 47(11): 2599-2620.

Popper, K. (1972). "La connaissance objective." Editions Flammarion.

Post, D. M. (2002). "The long and short of food-chain length." Trends in Ecology and Evolution 17: 169-277.

Purkhold, U., A. Pommerening-Roser, et al. (2000). "Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: Implications for molecular diversity surveys." Applied and Environmental Microbiology 66(12): 5368-5382.

Putman, R. J. and S. D. Wratten (1984). "Principles of Ecology." Editions Croon Helm, London, England.

Q

Qu, Y., J. Zhou, et al. (2005). "Microbial community dynamics in bioaugmented sequencing batch reactors for bromoamine acid removal." FEMS Microbiology letters 246: 143-149.

R

Raskin, L., L. K. Poulsen, et al. (1994). "Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization." Applied and Environmental Microbiology 60: 1241-1248.

Ringel, M. S., H. H. Hu, et al. (1996). "The stability and the persistence of mutualisms embedded in community interactions." Theoretical Population Biology 50: 281-297.

Rixen, C. and C. P. H. Mulder (2005). "Improved water retention links high species richness with increased productivity in artic tundra moss communities." Theoretical Population Biology 50: 281-297.

Roszak, D. B. and R. R. Colwell (1987). "Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count." Applied and Environmental Microbiology 53: 2889-2893.

Roszak, D. B., D. J. Grimes, et al. (1984). "Viable but nonrecoverable stage of Salmonella enteritidis in aquatic systems." Canadian Journal of Microbiology 30: 334-338.

Rowann, A. K., G. Moser, et al. (2003). "A comparative study of ammonia-oxidizing bacteria in lab-scale industrial wastewater treatment reactors." Water Science and Technology 48(3): 17-24.

Ruan, S., A. Ardito, et al. (2007). "Coexistence in competition models with density-dependent mortality." Biological modelling 330: 845-854.

Rudolph, V. H. W. (2007). "The interaction of cannibalism and omnivory: Consequences for community dynamics." Ecology 88(11): 2697-2705.

S

Saikaly, P. E. and D. B. Oerther (2003). "Bacterial competition in activated sludge: theoretical analysis of varying solids retention times on diversity." Microbial Ecology 48: 274-284.

Saikaly, P. E. and D. B. Oerther (2004). "Bacterial competition in activated sludge: theoretical analysis of varying solids retention times on diversity." Microbial Ecology 48: 274-284.

Sanguin, H., A. Herrera, et al. (2006). "Development and validation of a prototype 16S rRNA-based taxonomic microarray for Alphaproteobacteria." Environmental Microbiology 8(2): 289-307.

Sarkai, K., Y. Ikehata, et al. (1996). "Nitrite oxidation by heterotrophic bacteria under various nutritional and aerobic conditions." Journal of Fermentation and Bioengineering 6: 613-617.

Schippers, P., A. M. Verschoor, et al. (2001). "Does "supersaturated coexistence" resolve the "paradox of the plankton" ?" Ecology letters 4: 404-407.

Schluter, D. (1994). "Experimental evidences that competition promote divergence in adaptative radiation." Science 266: 798-801.

Schoener, T. (1974). "Resource partitioning in ecological communities." Science 185: 27-39.

Schramm, A., D. Debeer, et al. (1998). "Identification and activities in situ of Nitrospira and Nitrospira spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor." Applied and Environmental Microbiology 64(9): 3480-3485.

Schroeder, E. D. (1985). "Nitrification in activated sludge processes." Comprehensive Biotechnology Vol. 4. Oxford: Pergamon Press: 871-880.

Schwieger, F. and C. C. Tebbe (1998). "A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation-polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis." Applied and Environmental Microbiology 64: 4870-4876.

Sghaier, H., K. Ghedira, et al. (2008). "Basal DNA repair machinery is subject to positive selection in ionizing-radiation-resistant bacteria." BMC Genomics 9: 297-302.

Shannon, E. and W. Weaver (1962). "The mathematical theory of communication." The University of Illinois Press, Urbana, Illinois, USA.

Shelford, V. and F. Clements (1939). "Bio-Ecology." John Wiley editions, Illinois, USA.

Sibuet, D. C. and K. Olu (1998). "Biogeography, diversity and fluid dependence of deep-sea cold-seep communities at active and passive margins." Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography 45: 517-567.

Simpson, E. H. (1949). "Measurement of diversity." Nature 163: 672-688.

Sliekers, A. O., S. C. Haaijer, et al. (2005). "Competition and coexistence of aerobic ammonium- and nitrite-oxidizing bacteria at low oxygen concentrations." Applied and Environmental Microbiology 68: 808-817.

Sommer, U. (1985). "Comparison between steady state and non-steady state competition: experiments with natural phytoplankton." Limnology and Oceanography 30: 335-346.

Sonea, S. and M. Panisset (1983). "Introduction à la nouvelle bactériologie." Montreal University Press: 143 p.

Sorensen, B. H. and S. E. Jorgensen (1993). "The removal of nitrogen compounds from watewater." Elsevier, Amsterdam, Netherlands Studies in environmental sciences.

Spehn, E. M., A. Hector, et al. (2005). "Ecosystem effects of biodiversity manipulations in European grasslands." Ecological Monographs 75(1): 37-63.

Sree Hari Rao, V. and P. Raja Sekhara Rao (2005). "Mathematical models of the microbial populations and issues concerning stability." Chaos, Solitons and Fractals 23: 657-670.

Stachowicz, J. J., J. F. Bruno, et al. (2007). "Understanding the effects of marine biodiversity on communities ans ecosystems." Annual Review of Ecology Evolution and Systematics 38: 739-766.

Stackerbrandt, E., W. Frederiksen, et al. (2002). "Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52: 1043-1047.

Stackerbrandt, E. and B. M. Goebel (1994). "Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology." International Journal of Systematic Bacteriology 44: 846-849.

Stackerbrandt, E. and F. Rainey (1995). "Partial and complete 16S rDNA sequences, their use in generation of 16S rDNA phylogenetic trees and their implications in molecular ecological studies." Molecular Microbial Ecology 4: 27-34.

Stephanopoulos, G., A. Aristidou, et al. (1998). "Metabolic Engineering." Elsevier Science.

Su, J. J., K. S. Yeh, et al. (2006). "A strain of Pseudomonas sp. isolated from piggery wastewater treatment systems with heterotrophic nitrification capability in Taiwan." Current Microbiology 53: 77-81.

T

Taylor, S. L. (1988). "The construction and turnover of complex community models having generalized Lotka-Volterra dynamics." Journal of Theoretical Biology 135: 569-588.

Tempkin, J. A. and J. A. Yorke (2007). "Spurious Lyapunov exponents computed from data." SIAM Journal on Applied Dynamical Systems 6(2): 457-474.

Teske, A., E. Alm, et al. (1994). "Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria." Journal of Bacteriology 176(21): 6623-6630.

Thebault, E. and M. Loreau (2003). "Food-web constraints on biodiversity-ecosystem functioning relationships." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100(25): 14949-14954.

Thébault, E. and M. Loreau (2006). "The reationship between biodiversity and ecosystem functioning in food webs." Ecological Research 21: 17-25.

Theron, J. and T. E. Cloete (2000). "Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments." Critical Review of Microbiology 26: 37-57.

Thingstad, F. T. and R. Lignell (1997). "Theoretical models for the control of bacterial growth rate abundance, diversity and carbon demand." Aquatic Microbial Ecology 13: 19-27.

Tilman, D. (1996). "Biodiversity: population versus ecosystem stability." Ecology 77: 350-353.

Tilman, D. (1996). "Productivity and sustainability influenced by biodiversity in grassland ecosystems." Nature 379: 718-720.

Tilman, D. and J. A. Downing (1994). "Biodiversity and stability in grasslands." Nature 367: 165-175.

Tilman, D., C. Lehman, et al. (1998). "Diversity-stability relationships: Statistical inevitability or ecological consequence ?" American Naturalist 151(3): 277-282.

Tilman, D., C. L. Lehman, et al. (1997). "Plant diversity and ecosystem productivity: Theoretical considerations." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94(5): 1857-1861.

Tilman, D., P. B. Reich, et al. (2001). "Diversity and productivity in a long-term grassland experiment." Science 294: 843-845.

Tokeshi, M. (1999). "Species coexistence: ecological and evolutionary perspectives." Cambridge University Press, England.

Travisano, M. and P. B. Rainey (2000). "Studies of adaptative radiation using model microbial systems." American Naturalist 156: 35-44.

Troumbis, A. Y., P. G. Dimitrakopoulos, et al. (2000). "Hidden diversity and productivity patterns in mixed Mediterranean grasslands." OIKOS 90: 549-559.

Tunnicliffe, V., A. G. Mac Arthur, et al. (1998). "A biogeographical perspective of the deep sea hydrothermal Vent fauna." Advances in Marine Biology 34: 355-442.

V

Van der Heijden, M. G. A., J. N. Klironomos, et al. (1998). "Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity." Nature 396(6706): 69-72.

Van Niel, E. W. J., P. A. M. Arts, et al. (1993). "Competition between heterotrophic and autotrophic nitrifiers for ammonia in chemostat cultures." FEMS Microbiology Ecology 102: 109-118.

VanPeteghem, D., O. Zemb, et al. (2008). "Dynamics of neutral biodiversity." Mathematical Biosciences 212(1): 88-98.

Vignais, P. (2001). "La biologie, des origines à nos jours: une histoire des idées et des Hommes." Grenoble Sciences éditions: 473 p.

Volkov, I., J. R. Banavar, et al. (2003). "Neutral theory and relative species abundance in ecology." Nature 424: 1035-1037.

W

Walker, B. (1992). "Biological diversity and ecological redundancy." Conservation Biology 6: 18-23.

Wardle, D. A. (2001). "Experimental demonstration that plant diversity reduces invasibility: evidence of a biological mechanism or a consequence of sampling effect ?" OIKOS 95: 161-170.

Watson, S. W., E. Bock, et al. (1989). "Nitrifying bacteria." In Bergey's manual of systematic bacteriology The Williams and Wilkins Co editions, Baltimore: 1808-1834.

Wery, N., V. Bru-Adam, et al. (2008). "Dynamics of Legionella spp. And bacterial populations during the proliferation of L. pneumophila in a cooling tower facility." Applied and Environmental Microbiology 4: 30-37.

Whitehead, A. N. (1922). "The Principle of Relativity with Applications to Natural Science." Cambridge University Press, England.

Whitham, T. G., W. P. Young, et al. (2003). "Community and ecosystem genetics: A consequence of the extended phenotype." Ecology 84(3): 559-573.

Williams, R. J. and N. D. Martinez (2000). "Simple rules yield complex food webs." Nature 404: 180-183.

Winogradsky, M. S. (1888). "Recherches sur les organismes de la nitrification." Annales de l'Institut Pasteur 5: 257-275.

Woese, C. R. (1987). "Bacterial evolution." Microbiological Review 51: 221-271.

Woese, C. R. and G. E. Fox (1977). "Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms." Proceeding of the National Academic in Science of the United State of America 74: 5088-5090.

Woese, C. R., O. Kandler, et al. (1990). "Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya." Proceeding of the National Academic in Science of the United State of America 87(12): 4576-4579.

Wommack, K. E. and R. R. Colwell (2000). "Virioplankton: Viruses in aquatic ecosystems." Microbiology and Molecular Biology reviews 64(1): 69-114.

Wong, T., A. Amidi, et al. (2007). "Evolution of the bacterial flagellum." Microbe 2(7): 335-340.

Wootton, J. T. (1994). "Putting the Pieces Together - Testing the Independence of Interactions among Organisms." Ecology 75(6): 1544-1551.

Wyffels, S., P. Boeckx, et al. (2004). "Nitrogen removal from sludge reject water by a two-stage oxygen-limited autotrophic nitrification denitrification process." Water Science and Technology 49(5-6): 57-64.

Y

Yachi, S. and M. Loreau (1999). "Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: The insurance hypothesis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96: 1463-1468.

Z

Zemb, O. (2006). "L'écosystème a-t-il une mémoire ? Importance de l'histoire sur la résilience fonctionnelle de communautés bactériennes hétérotrophes marines et anaérobies." Thèse de Doctorat, Université Montpellier II, France: 252 p.

Zemb, O., B. Haegeman, et al. (2007). "SAFUM: statistical analysis of SSCP fingerprints using PCA projections, dendrograms and diversity estimators." Molecular Ecology Notes 7(5): 767-770.

Zemb, O., L. Urios, et al. (2008). "Efficient method to isolate and purify viruses of bacteria from marine environments." Letters in Applied Microbiology 47(1): 41-45.

Zumstein, E., R. Moletta, et al. (2000). "Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis." Environmental Microbiology 2(1): 69-78.

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Schéma représentant les interactions s'établissant dans un écosystème donné..... **21**

Figure 2 : Valeurs de la richesse spécifique correspondant au nombre d'espèces coexistant dans un espace considéré. Les individus sont représentés ici par des carrés et les espèces par des couleurs, l'ensemble de chaque damier constituant le peuplement considéré.....**26**

Figure 3 : Valeurs de l'indice de Shannon-Weaver pour différents types de peuplement. Les individus sont représentés ici par des carrés et les espèces par des couleurs, l'ensemble de chaque damier constituant le peuplement considéré.....**26**

Figure 4 : Valeurs de l'indice de diversité de Simpson (i.e. égale à 1-D) pour différents types de peuplement. Les individus sont représentés ici par des carrés et les espèces par des couleurs, l'ensemble de chaque damier constituant le peuplement considéré..... **27**

Figure 5 : Valeurs de l'indice de diversité de Hill pour différents types de peuplement. Les individus sont représentés ici par des carrés et les espèces par des couleurs, l'ensemble de chaque damier constituant le peuplement considéré.....**27**

Figure 6 : Relation entre la diversité (en termes de nombre d'espèces) et la connectance selon deux modalités d'interactions : spécifiques (figures de gauche où chaque espèce entretient une relation particulière avec une autre espèce) ou généralistes (figures de droite où chaque espèce entretient des relations avec plusieurs autres espèces). Le nombre d'interactions par espèce est désigné par « L », la connectance au niveau de la communauté par « c »..... **28**

Figure 7 : Schéma représentant la classification phénoménologique des interactions biotiques pouvant s'établir entre deux ou plusieurs individus d'espèces identiques ou différentes (représentées par les cercles colorés nommés X_1 et X_2 suivant la nomenclature mathématique usuelle) dans un écosystème donné (d'après Odum, 1953).....**29**

Figure 8 : Schéma représentant la classification mécaniste des interactions biotiques pouvant s'établir entre deux ou plusieurs individus d'espèces identiques ou différentes (représentées par les cercles colorés nommés X_1 et X_2 suivant la nomenclature mathématique usuelle) dans un écosystème donné (d'après Fredrickson, 1977).....**30**

Figure 9 : Schéma représentant différents réseaux trophiques ainsi que les interactions directes (représentées par les flèches continues) et indirectes (représentées par les flèches discontinues) s'établissant entre les différents organismes qui composent les différents niveaux trophiques : producteurs primaires (P), consommateurs primaires (H) et consommateurs secondaires (C).....**31**

Figure 10 : Schéma représentant les pertes énergétiques le long d'un réseau trophique à partir de 1 000 000 joules d'énergie solaire reçus au cours d'une période donnée.....**31**

Figure 11 : Comparaison d'un modèle de variations périodiques temporelles avec les variations réellement obtenues à partir d'observations réalisées dans le temps avec une fréquence élevée....**40**

Figure 12 : Schéma représentant les différentes allures globales ou orbites des courbes intégrales. Les graphiques du haut représentent la dynamique d'un système en visualisation classique tandis que les graphiques du bas représentent les mêmes dynamiques visualisées dans l'espace des phases (a) L'orbite converge vers un point d'équilibre. (b) L'orbite s'accumule autour d'une

orbite périodique. (c) L'orbite présente plusieurs boucles périodiques. (d) L'orbite prend la forme en aile de papillon (d'après Gleick, 1999)..... **41**

Figure 13 : Dynamiques d'une population selon une suite logistique en fonction de la valeur du paramètre « r » (d'après Gleick, 1999)..... **46**

Figure 14 : Dynamiques d'une population selon une suite logistique en fonction de la valeur des paramètres « X_0 » et « r » (d'après Gleick, 1999)..... **46**

Figure 15 : Dynamiques d'une population selon le modèle logistique, ou de Verhulst, en fonction de la valeur des paramètres « X0 » et « r » (d'après Feigenbaum, 1980).....**47**

Figure 16 : Espaces des phases du modèle de Lotka-Volterra et évolution de l'abondance des proies et des prédateurs de part et d'autres des isoclines nulles du système..... **50**

Figure 17 : Oscillations entretenues indéfiniment des populations de prédateurs et de proies selon le modèle de Lotka-Volterra..... **50**

Figure 18 : Données générées des populations de prédateurs et de proies selon le modèle de Lotka-Volterra tenant compte d'une limitation densité-dépendante des deux espèces. A gauche figurent les oscillations amorties telles que données par le modèle. A droite les mêmes données représentées sous espace de phases. **51**

Figure 19 : Données générées des populations de prédateurs et de proies selon le modèle de Lotka-Volterra tenant compte d'une facilitation densité-dépendante des deux espèces. A gauche figurent les oscillations amorties telles que données par le modèle. A droite les mêmes données représentées sous espace de phases.....**51**

Figure 20 : Schéma du cycle de l'azote (source : wikipedia)..... **58**

Figure 21 : Corrélation entre la baisse de productivité en biomasse et la perte de diversité, en termes de richesse spécifique, telle que démontrée par les travaux d'Hector et al. (1999) dans différents pays d'Europe : Allemagne, Irlande, Royaume Unis, Suisse, Portugal, Suède et Grèce.....**59**

Figure 22 : Corrélation entre la diversité des espèces assemblées et la capacité totale de consommation d'une ressource, telle que démontrée par les travaux de Cardinale (2002).....**60**

Figure 23 : Schéma représentant les différents types de modèles mathématiques visant à la simulation de réseaux trophiques. Les ronds correspondent ici aux espèces et les flèches aux interactions trophiques. 1) Schéma d'un réseau trophique stochastique (i.e. où les interactions sont déterminées ne manière aléatoire). 2) Schéma d'un réseau trophique structuré (i.e. où les interactions sont établies de manière à rendre compte d'un certain réalisme biologique). 3) Schéma d'un réseau trophique structuré où figurent en vert les « rhéagogies » telles que définies par Arditi et al. (2005)..... **69**

Figure 24 : Arbre phylogénétique des trois domaines du vivant. Cet arbre a été réalisé par la méthode de maximum de vraisemblance et de parcimonie à partir du séquençage d'ADN ribosomiques des représentants de chaque domaine du vivant (d'après Woese et al., 1990).....**77**

Figure 25 : Schéma des grandes divergences du vivant menant à la complexité actuelle. La divergence ayant conduit à la formation des Eucaryotes, entre autres, demeure incertaine notamment quant à une origine archaebactérienne ou bactérienne..... **79**

Figure 26 : Photos de stromatolithes (source : wikipedia).....**79**

Figure 27 : Photos de différentes cultures en milieux synthétiques permettant l'étude de réactions enzymatiques par changement de coloration du milieu. (Source : Entreprise AES Chemunex).....**83**

Figure 28 : Les différentes phases de la croissance bactérienne en culture sur milieu fermé. I) Phase de latence. II) Phase de croissance exponentielle. III) Phase maximale stationnaire. IV) Phase de décroissance (d'après Buchanan, 1918).....**84**

Figure 29 : Principe de l'amplification en chaîne (ou PCR) d'une séquence cible à partir d'ADN total..... **87**

Figure 30 : Photo d'un gel d'électrophorèse permettant l'obtention d'une empreinte moléculaire d'une communauté microbienne par la technique DGGE. Chaque bande représente un phylotype différent et son intensité lumineuse permet d'obtenir une indication quant à son abondance relative.....**89**

Figure 31 : Principe de la technique SSCP par électrophorèse capillaire.....**90**

Figure 32 : Empreinte moléculaire d'une communauté microbienne par la technique T-RFLP avec séquenceur automatique. Chaque pic représente un phylotype différent et l'intensité de sa fluorescence permet d'obtenir une indication quant à son abondance relative..... **91**

Figure 33 : Schéma d'un réacteur biologique.....**94**

Figure 34 : Représentations des taux de croissance de deux populations en compétition pour un même substrat limitant suivant la modélisation de Monod. I. Evolution du taux de croissance en fonction du substrat quand $\mu_{max1}>\mu_{max2}$ et $K_1>K_2$ ou quand $\mu_{max1}<\mu_{max2}$ et $K_1<K_2$. II. Evolution du taux de croissance en fonction du substrat quand $\mu_{max1}<\mu_{max2}$ et $K_1>K_2$ ou quand $\mu_{max1}>\mu_{max2}$ et $K_1<K_2$ (d'après Harder et al., 1977).....**102**

Figure 35 : Description des deux étapes successives de la réaction de nitrification : la nitritation et la nitratation..... **107**

Figure 36 : Arbre phylogénétique des espèces nitrifiantes lithotrophes connues (d'après Jetten et al., 1997)..... **109**

Figure 37 : Zones d'inhibitions des bactéries nitrifiantes en fonction du pH (D'après Anthonisen et al., 1976)..... **112**

Figure 38 : Photo du dispositif expérimental comprenant cinq chémostats à nitrification.....**113**

Figure 39 : Schéma représentant les différentes phases du protocole expérimental comprenant des perturbations ciblées ainsi que des perturbations globales biotiques et abiotiques.....**119**

Figure 40 : Theoretical scheme of the methodology used for functional community assigning of bacteria in their environment using observers and molecular fingerprinting. (I) Bioreactions in a given microbial ecosystem (II) Mathematical modeling of the bioreactions (III) Estimate of functional biomasses using a mathematical observer (IV) Functional assigning of molecular species present in the microbial ecosystem..... **128**

Figure 41 : Nitrifying performances in the two regularly disturbed chemostats A and B. Black continuous line with diamond-shaped signs represents nitrite, dotted black line with round signs represents nitrates and dotted grey line with triangular signs represents residual ammonium concentrations expressed in g N.L-1 throughout the duration of experiments (in days). Disturbances introduced during the kinetics in both reactors are indicated as follows: circle with arrow represents increasing or decreasing flow rate, black arrow represents biotic disturbance, a

black triangular sign represents increasing or decreasing substrate concentration and black star represents a decreased in operating temperature from 30°C to 25°C.....…...…….....…… **129**

Figure 42 : Evolution of functional communities and total biomass concentrations in both chemostats A and B. Grey continuous line with round signs represents dynamics of total biomass obtained by measurements, dotted black line with diamond-shaped signs represents active biomass of AOB community generated by observers, and dotted black line with triangular signs represents active biomass of NOB communities generated by observers expressed in g.L-1. Disturbances made during the kinetics in both reactors are indicated as described in figure 41.....**130**

Figure 43 : Relative abundance dynamics of the phylotypes detected by fingerprints. Disturbances created during the kinetics in both reactors are indicated as described in figure 2. Molecular fingerprints in boxed insert corresponding to samples from which 16S rDNA sequencing was carried out. The numbers under some peaks refer to identifications obtained by the method presented in tables 13 and 14..... **131**

Figure 44 : Nitrifying performances in the regularly disturbed chemostat. Black continuous line with diamond-shaped signs represents nitrite, dotted black line with round signs represents nitrates and dotted grey line with triangular signs represents residual ammonium concentrations expressed in g N.L-1 throughout the duration of experiments (in days). Disturbances introduced during the kinetics in both reactors are indicated as follows: circle with arrow represents increasing or decreasing flow rate, black arrow represents biotic disturbance, a black triangular sign represents increasing or decreasing substrate concentration and black star represents a decreased in operating temperature from 30°C to 25°C..... **151**

Figure 45 : Microbial community in the chemostat. Dotted black line with diamond-shaped signs represents the total biomass, others continuous grey level lines represents the dynamics of the 41 phylotypes detected by fingerprints in the nitrifying chemostat expressed in g.L-1 throughout the duration of experiments (in days). Disturbances created during the kinetics in the chemostat are indicated as described in figure 44.....**152**

Figure 46 : Optimization of the microbial interactions model on the experimental data. Cross signs represent the experimental data, continuous black line represents results of the optimization of the microbial interactions model, and dotted black line represents results of the optimization of the model without interactions..... **153**

Figure 47 : Growth rate (in H^{-1}) of AOB and NOB functional communities composed of two phylotypes for each one. At the top, continuous black line represents the growth rate of AOB community when interactions were considered and dotted black line represents the growth rate when interactions were not taking account. At the bottom, continuous black line represents the growth rate of NOB community when interactions were considered and dotted black line represents the growth rate when interactions were not taking account..... **154**

Figure 48 : Virtual interactions web between nitrifying bacteria obtained by the model. Continuous black line represents positive interaction and dotted black line represents negative interaction between two phylotypes.....**155**

Figure 49 : Evolution de la distance euclidienne entre le profil SSCP obtenu juste avant la perturbation biotique globale consistant en le renouvellement de 10% de la biomasse présente

dans chaque chémostat par une biomasse nitrifiante plus diverse issue d'un réacteur de réserve.....**162**

Figure 50 : Suivi des concentration en nitrite (courbe noire continue), nitrates (courbe noire en pointillé) et de l'azote résiduel (courbe crise en pointillé) en g N.L-1 après application de la perturbation biotique globale consistant en le renouvellement de 10% de la biomasse présente dans chaque chémostat par une biomasse nitrifiante plus diverse issue d'un réacteur de réserve. **162**

Figure 51 : Evolution de la distance euclidienne entre le profil SSCP obtenu juste avant la perturbation biotique ciblée consistant en le renouvellement de 20% de la biomasse présente dans chaque chémostat par une biomasse de la bactérie nitratante Nitrobacter hamburgensis.....**163**

Figure 52 : Suivi des concentration en nitrite (courbe noire continue), nitrates (courbe noire en pointillé) et de l'azote résiduel (courbe crise en pointillé) en g N.L-1 après application de la perturbation biotique globale consistant en le renouvellement de 10% de la biomasse présente dans chaque chémostat par une biomasse nitrifiante plus diverse issue d'un réacteur de réserve.....**164**

Figure 53 : Dynamiques d'une population selon le modèle logistique, ou de Verhulst, en fonction de la valeur des paramètres X0 et r. En vert, représentation sous forme du diagramme de Feigenbaum. En bleu, valeurs de l'exposant de Lyapunov correspondant.....**171**

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Comparaison des caractéristiques entre les espèces « r » et « k » (d'après Fischesser et Dupuis-Tate, 1996)..... **45**

Tableau 2 : Tailles et organisation cellulaire des différents organismes constituant le monde microbien..... **76**

Tableau 3 : Les divisions majeures du domaine des Bactéries (d'après Woese, 1987 modifié)..... **78**

Tableau 4 : Pourcentage de la fraction cultivable de la diversité microbienne pour différents types d'écosystèmes. Ce pourcentage représente le nombre d'unités formant des colonies bactériennes par rapport au nombre de bactéries total dénombré par comptage direct au microscope (d'après Amann et al., 1996)..... **85**

Tableau 5 : Composition de l'alimentation des réacteurs à nitrification..... **114**

Tableau 6 : Composition de la solution minérale..... **114**

Tableau 7 : Composition des solutions de conservation des prélèvements issus des chémostats en vue de l'extraction de l'ADN total..... **115**

Tableau 8 : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification de l'ADN (F=Forward=sens ; R=Reverse=antisens)..... **115**

Tableau 9 : Constitution du mix PCR..... **118**

Tableau 10 : Conditions opératoires de la PCR-SSCP..... **118**

Tableau 11 : Récapitulatif des conditions environnementales, de la communauté installée ainsi que des fonctions exprimées pour les chémostats A, B et C juste avant perturbation globale effectuée à t = 121 j..... **120**

Tableau 12 : Milieux de culture pour Nitrobacter (d'après Bock et al, 1983 ; Schimdt et al, 1973)..... **120**

Table 13 : Statistical assigning of phylotypes to the AOB or the NOB community. Mean relative abundance was calculated for each phylotype during its period (in days) of presence. Phylotypes highlighted in black represent the AOB community, phylotypes highlighted in grey represent the NOB community and phylotypes highlighted in white represent no AOB and no NOB functional community. Bold peak numbers with an asterisk refer to assigned peaks (Figure 43 and Table 14)..... **133**

Table 14 : Results of 16S rDNA sequencing identification carried out for thirteen phylotypes present in both chemostats and their functional assigning obtained by the mathematical approach. *, indicates the number of clones identified under the same name in the database, compared to the total number of clones obtained for each peak. Phylotypes highlighted in black represent the AOB community, phylotypes highlighted in grey represent the NOB community and phylotypes highlighted in white represent no AOB and no NOB functional community..... **134**

Table 15 : Kinetic parameters of the microbial interactions model..... **151**

Table 16 : Interactions coefficients (αij) of the microbial interactions model..... **155**

Annexes

ANNEXE 1

New observers for Microbial Ecology – How including molecular data into bioprocess modeling ?

Maxime Dumont[1], Alain Rapaport[2], Jérôme Harmand[12], Boumedien Benyahia[3], Jean-Jacques Godon[1]

[1]Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, INRA UR050, Avenue des Etangs, Narbonne, France

[2]INRA-INRIA MERE Research Team, UMR-ASB, 2 place Viala, Montpellier, France

[3]Automatic control lab, University Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algeria

16th Mediterranean Conference on Control and Automocion

Congress Centre, Ajaccio, France

June 25-27, 2008

Corresponding author:

Jérôme Harmand

Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement

Avenue des Etangs

F-11100 Narbonne

France

Telephone number: +33 (0) 468 425 159

Facsimile number: +33 (0) 468 425 160

E-mail address: harmand@supagro.inra.fr

Abstract

In this paper, we show how specific tools of automatic control and in particular nonlinear observer theory can be exploited together with microbiological data to answer the important ecological problem of assigning a function to the species of ecosystems for a large class of biosystems. Preliminary experimental results are also presented.

Introduction

When considering a complex microbial ecosystem (here, "complex means that we consider ecosystems involving several interacting species, each of them possibly realizing different functions), one objective may be to identify which species is responsible for what function of the ecosystem. In other word, one important question is to assign to a given species "one of the functions realized by the ecosystem". This "assignation problem" is related to the question of "who does what?" in this ecosystem. To do so, recent molecular probes are available to monitor functional groups, cf. for instance the principle of micro-arrays (Sanguin, Herrera et al. 2006). However, these techniques are very specific ("you only see what you look for" or in other words "you only see what you already know") and they are costly and time-consuming. An alternative method proposed in this paper consists in using modeling tools together with molecular fingerprinting techniques.

Molecular techniques offer a new way of monitoring microbial ecosystems. These genomic techniques are based on the discrimination of small parts of the DNA (DesoxyriboNucleic Acid) of a microorganism which differ from one species to another, coding to some extent for a particular species. After the extraction of the total DNA of a sample and amplification by PCR (Polymerase Chain Reaction), the "16S rDNA" molecules are separated. Using the natural conformation polymorphism of these molecules, particular devices have been developed to generate, by electrophoresis, some "profiles" also called "molecular fingerprints". In a recent work, it has been shown, under appropriate conditions (and in particular for ecosystems with relatively low diversity), that the relative abundances of species could be monitored with this technique while it is not possible if the ecosystems under interest is too diverse (Loisel, Harmand et al. 2005).

These techniques allow us to monitor the concentrations of the species that are present in the ecosystem. Assuming a functional model, typically a mass-balance type model describing both biomass and substrates/products dynamics (Bastin and Dochain 1990), is available, several procedures can be used to identify the function of each species:

A "direct" approach may simply consist in using the individual species concentrations as inputs of a submodel where the equations of the functional biomasses have been removed: the

biomass concentration are no longer states of the system but are now some of its inputs. The best combination of species concentrations explaining the substrates/products dynamics immediately delivers the solution to the assignation problem. This solution is particularly attractive but presents two important drawbacks: first, an accurate mass-balance functional model of the system is needed. It is well known that such models are highly uncertain and difficult to obtain… Second, if the number of individual species concentrations (let us call it here *N*) is large, one may have to realize an incredibly high number of system integrations (in fact, we must integrate the system no less than 2^N times!).

Several two-step "indirect" approaches consist in the following. In a first step, functional biomass trajectories which best explain the substrate/products dynamics are generated in some way while, in a second step, the combination of individual species concentrations which best approximate these functional biomass trajectories are searched for. Such an indirect approach presents several advantages. First, we will show that, under some conditions depending on the available data, we can design a new class of observers that are independent on the process kinetics (thus, the functional model of the system is no longer necessary). Second, there is no longer a large number of integrations to realize: the only optimization problem to be solved is a static problem to find the combination of individual species concentrations which best explains the biomass trajectories generated during the first step of the procedure.

In this paper, we propose a new approach to solve the assignation problem for the large class of biosystems involving *P* bioreactions in cascade realized by *P* microbial functional consortia in which the product of the ith reaction is the substrate of the $i+1^{st}$ reaction. Such reactions can be schematically represented by the reaction scheme:

$$\begin{gathered} S_1 \rightarrow X_1 + S_2 \\ S_2 \rightarrow X_2 + S_3 \\ \vdots \\ S_P \rightarrow X_P + S_{P+1} \end{gathered}$$

An example of such reaction network is the anaerobic digestion process which consists in the transformation, under anaerobic conditions, of organic carbon by a number of successive reactions in cascade realized by several specific functional microbial consortia. However, this process is known to exhibit a high diversity (Godon, Zumstein et al. 1997; Narihiro and Sekiguchi 2007), which is, in the present case, a quite important limitation as it has been underlined hereabove since it is not possible, from fingerprint data, to monitor individual species concentrations… Another example of such a reaction system in cascade is the nitrification process in which, under aerobic conditions, the ammonium nitrogen is transformed into nitrites by a consortium of ammonium-oxydizing bacteria (AOB) while nitrites are transformed into

nitrates by nitrite-oxydizing bacteria (NOB). This process presents the advantages of being well known and its microbial dynamics are driven by a limited number of dominant species (thus "its diversity is relatively low" and relative abundances of dominant species can then be computed using fingerprint data).

Using the measurements of the total biomass, for instance using the measurement of the Total or Volatile Suspended Solids (TSS and VSS), assuming the totality of this matter is "active biomass", the substrate/product concentrations and the individual species concentrations obtained via a fingerprint technique called SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), we propose a two-step procedure (within the class of indirect approaches we have introduced hereabove) to assign one of the two functions of the nitrification process (nitritation or nitratation) to each of the 44 individual species detected in the ecosystem.

Identifying the function of a species within a complex ecosystem

Assigning a function to a microbial species is a key problem in microbial ecology. Consider a nitrification process. Two functions are considered: the nitritation (a biological process realized by a bacteria consortium X_A which transforms ammonium nitrogen (S_1) into nitrites (S_2)) and the nitratation (realized by a bacteria consortium X_A which transforms nitrites (S_2) into nitrates (S_3)). Molecular fingerprinting techniques allow us to monitor relative abundances of detected microorganisms via SSCP.

The general form of the functional mass-balance model of this system functioning in the chemostat is given by:

$$[1] \qquad \begin{aligned} \frac{dX_A}{dt} &= (\mu_A(S_1) - D)X_A \\ \frac{dX_B}{dt} &= (\mu_B(S_2) - D)X_B \\ \frac{dS_1}{dt} &= -\frac{\mu_A(S_1)}{Y_A}X_A + (S_{in} - S_1)D \\ \frac{dS_2}{dt} &= -\frac{\mu_A(S_1)}{Y_A}X_A - \frac{\mu_B(S_2)}{Y_B}X_B - S_2D \\ \frac{dS_2}{dt} &= \frac{\mu_B(S_2)}{Y_B}X_B - S_3D \end{aligned}$$

where S_{in} is the ammonium nitrogen input concentration, S_1, S_2 and S_3 are the ammonium nitrogen, nitrites and nitrates concentrations, respectively, D is the dilution rate (ratio of the input flow rate over the volume), X_A and X_B are the concentrations in AOB and NOB, Y_A and Y_B are their yields coefficients while μ_A and μ_B are their growth rate.

In addition to the measurements of the substrates, we assume we have the measures of the

individual species concentrations X_i (i=1…N). In addition, we measure the total biomass $X_T = X_A + X_B = \sum_{i=1}^{N} X_i$. The assignation problem is to determine which individual species are part of X_A and which ones (the complement X_T-X_A) are part of X_B.

To better understand our presentation, we recall here the different methods we suggested in the introduction as "direct" and "indirect" approaches on the specific example of the nitrification process.

The direct approach assumes the model [1] is available. Then we consider the restricted model:

$$[2] \qquad \begin{aligned} \frac{dS_1}{dt} &= -\frac{\mu_A(S_1)}{Y_A} X_A + (S_{in} - S_1)D \\ \frac{dS_2}{dt} &= -\frac{\mu_A(S_1)}{Y_A} X_A - \frac{\mu_B(S_2)}{Y_B} X_B - S_2 D \\ \frac{dS_2}{dt} &= \frac{\mu_B(S_2)}{Y_B} X_B - S_3 D \end{aligned}$$

that we simulate using successively the 2^N combinations of the individuals species concentrations X_i where $\lambda_i \in \{0,1\}$ as inputs:

$$[3] \qquad \begin{cases} X_A = \sum_{i=1}^{N} \lambda_i X_i \\ X_B = \sum_{i=1}^{N} (1-\lambda_i) X_i \end{cases}$$

The optimal solution is the combination of the N parameters λ_i for which the criterion:

$$[4] \qquad J = \min_{\lambda_i|_{\lambda_i \in \{0,1\}}} \sum_{i=1}^{P} \sum_{j=1}^{M} \left(S_i^{measures}(j) - S_i^{predictions}(j) \right)^2$$

with N_P=P=2 or N_P=P+1=3 (depending on the available measurements) and M is the number of samples over the period of time considered, is minimized. As underlined in the introduction, notice that such an approach necessitates the model [1], and in particular μ_A and μ_B, to be known…

In the indirect approach, one proceeds in two steps. First, one generates the trajectories X_A and X_B such that the criterion:

$$[5] \qquad J = \min_{X_A, X_B} \sum_{i=1}^{P+1} \sum_{j=1}^{M} \left(S_i^{measures}(j) - S_i^{predictions}(j) \right)^2$$

with N_P=2 or 3, is minimized. This can be done using for instance a predictive approach. Obviously, since this criterion is usually the one used for identification purposes, it is also possible to simply simulating the model [2] to generate estimated trajectories of X_A and X_B which best explain the substrate dynamics. Then, in a second step, we solve the static mixed integer

optimization problem:

$$[6] \quad \begin{cases} J = \min\limits_{\lambda_i|_{\lambda_i \in \{0,1\}}} \sum\limits_{k=1}^{M} \left[\left(X_A(t_k) - \hat{X}_A(t_k) \right)^2 + \left(X_B(t_k) - \hat{X}_B(t_k) \right)^2 \right] \\ X_A = \sum\limits_{i=1}^{44} \lambda_i X_i \\ X_B = \sum\limits_{i=1}^{44} (1-\lambda_i) X_i \end{cases}$$

where the notations $\hat{X}_A$ and $\hat{X}_B$ stand for the estimated trajectories of X_A and X_B whatever the method used to generate them.

However, again, notice that the first step of these solutions (the generation of X_A and X_B) necessitate the model [1] to be available…

To better understand the importance of developing alternative techniques independent on the kinetics, we present hereafter a practical example of experiments where an "unmeasured exogen input" – that was not monitored during some experiments (and thus the influence of which cannot be modeled) – had significant consequences on the monitored variables. As a consequences, it was not possible to develop a [1]-like model using the available data.

Practical difficulties in modeling a nitrification process

The experimental device

Several chemostats were used to study a nitrification ecosystem. They were fed with a controlled feeding system of an artificial wastewater. Details are available on ask to the authors. Because of lack of space, we only use the date obtained from the reactor B.

The macroscopic functions (Nitritation and Nitratation) were monitored together with the total biomass. SSCP profiles were also regularly realized from samples of the medium.

The experimental results

The previous chemostats was operated over 371 days at constant dilution rate (*D* constant) in order to get data for modeling purposes. The input substrate concentration was varied several times from 1 to 2 g/l and from 2 to 1 g/l. The results obtained are represented in the figures 1 and 2.

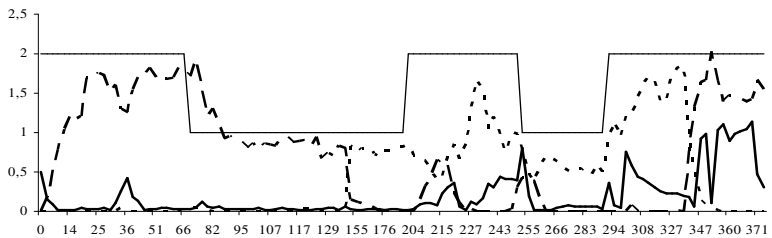


Figure 1: Input substrate concentration (thin continuous line), residual ammonium (S_1, bold continuous line), nitrites (S_2, dotted line) and nitrates (S_3, indented line) over 371 days of experiments. All units are in g/l.

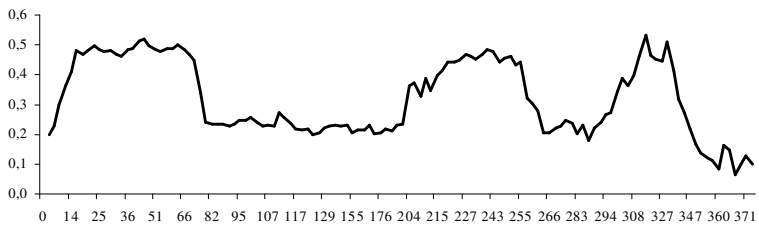


Figure 2: The measurement of the total biomass concentration in g/l.

As can be seen in the figure 1, the second reaction of the process did only start at t=150 days. It is not because the initial condition in X_B was null. Instead, we realized at t=150 days a change in the operating temperature of the chemostat. Immediately, the second consortium began to grow. If it is assumed that the kinetics are only functions of S_i, a [1]-like model is simply unable to reproduce these data with the appropriate hypotheses. One solution is to include the influence of the temperature into the model. However, it is simply not possible here since the temperature was not monitored during the experiment. Thus, a method allowing reconstructing X_A and X_B independently of μ_A and μ_B is needed.

In the next section, we propose a class of new observers allowing us to generate X_A and X_B from the available measurements (in particular taking into account we have measured the total active biomass) without any hypothesis about the process kinetics (only the yield coefficient that can be quite easily evaluated from the experiments or from the literature are necessary).

New coupled observers to estimate functional biomasses for a class of biosystems

The observer design

For simplicity, we present the proposed approach using the nitrification process. However, the observer design is suited for any system in cascade considered in this paper.

Consider the mass balance model [1]. Taking into account the fact that the total biomass X_T is supposed to be available, we enounce the following results:

Proposition 1: The dynamical system:

$$[7] \quad \begin{cases} \dfrac{d\hat{Z}_1}{dt} = -D\left(\hat{Z}_1 - S_{in}\right) + G_1\left(\hat{X}_A + \hat{X}_B - X_T\right) \\ \hat{X}_A = Y_A\left(\hat{Z}_1 - S_1\right) \\ \dfrac{d\hat{Z}_2}{dt} = -D\left(\hat{Z}_2 - S_{in}\right) + G_2\left(\hat{X}_A + \hat{X}_B - X_T\right) \\ \hat{X}_B = Y_B\left(\hat{Z}_2 - S_1 - S_2\right) \end{cases}$$

is a partially tunable observer for the system [1]. Notice that it is exactly the asymptotic observer if G_1=G_2=0.

Proof of the proposition 1: *Consider the error vector:*

$$\begin{cases} e_{X_A} = X_A - \hat{X}_A = Y_A\left(Z_1 - \hat{Z}_1\right) = Y_A e_{Z_1} \\ e_{X_B} = Y_B e_{Z_2} \end{cases}.$$

where $Z_1 = \frac{X_A}{Y_A} + S_1$ and $Z_2 = \frac{X_B}{Y_B} + S_1 + S_2$

Its dynamics is given by:

$$\dot{e}_X = \begin{pmatrix} -D + Y_A G_1 & Y_A G_1 \\ Y_B G_2 & -D + Y_B G_2 \end{pmatrix} e_X .$$

In the case where D is constant, it is then straightforward to verify that the eigenvalues of the observer are given by:

$$\begin{cases} \lambda_1 + \lambda_2 = -2D + Y_A G_1 + Y_B G_2 \\ \lambda_1 \lambda_2 = D\left(D - Y_A G_1 - Y_B G_2\right) \end{cases} \rightarrow \begin{cases} \lambda_1 = -D \\ \lambda_2 = -D + Y_A G_1 + Y_B G_2 \end{cases}$$

If the gains G_1 and G_2 are suitably chosen, one has $\lim_{t\to\infty} \hat{X}_A = X_A$ and $\lim_{t\to\infty} \hat{X}_B = X_B$ and thus the system [7] is an observer for the system [1].

The only important hypothesis which must be verified to design such an observer is that the system to be observed be the general mass-balance model of P bioreactions in cascade. The observer dynamics are completely independent of the bioreactions kinetics μ_A and μ_B which can be very complicated functions of any state and/or exogen variables. The "price to pay" to build such an observer with such few knowledge is that the observer is not completely tunable (only one eigenvalue can be placed arbitrarily). Now, it may happen that part of the process kinetics is known: for instance μ_A or μ_B. In this case, one may synthesize a new observer in taking advantage of the fact that the total biomass is measured and in coupling a bounded error observer (Lemesle and Gouzé 2004) and the partially tunable observer presented hereabove. For instance, assuming μ_A is known, we get the following result:

Proposition 2: *The dynamical system:*

$$[7] \quad \begin{cases} \dfrac{d\hat{Z}_1}{dt} = -D\left(\hat{Z}_1 - \theta_1 S_{in}\right) + \left(1 - \theta_1\right)\dfrac{\mu_A\left(S_1\right)}{Y_A}\hat{X}_A \\ \hat{X}_A = Y_A\left(\hat{Z}_1 - \theta_1 S_1\right) \\ \dfrac{d\hat{Z}_2}{dt} = -D\left(\hat{Z}_2 - S_{in}\right) + G_2\left(\hat{X}_A + \hat{X}_B - X\right) \\ \hat{X}_B = Y_B\left(\hat{Z}_2 - S_1 - S_2\right) \end{cases}$$

where the auxiliary variable Z_1 is now given by $Z_1 = \frac{X_A}{Y_A} + \theta_1 S_1$ and thus $\hat{Z}_1 = \frac{\hat{X}_A}{Y_A} + \theta_1 S_1$ while Z_2 and $\hat{Z}_2$ are unchanged, is a completely tunable observer for the system [1].

Again, notice that it is exactly the asymptotic observer if θ_1=1 and G_2=0.

Sketch of theproof of the proposition 2: *The dynamics of the error matrix is given by:*

$$F = \begin{pmatrix} -D + (1-\theta_1)\mu_A(S(t)) & 0 \\ Y_B G_2 & -D + Y_B G_2 \end{pmatrix}$$

Notice F has only one time-varying term. A systematic approach to show that the error matrix is stable is the following. First, assume $\mu_A(S(t))>\mu_A>0$ t. We have:

$$v(t) = (\theta_1 - 1)(\mu_A(t) - \underline{\mu_A}) \geq 0 \quad \text{if} \quad \theta_1 \geq 1$$

And with:

$$v(t) \in \left[0, (\theta_1 - 1)(\overline{\mu_A} - \underline{\mu_A})\right]$$

Let the constant matrix:

$$\underline{F} = \begin{pmatrix} -D + (1-\theta_1)\underline{\mu_A} & 0 \\ Y_B G_2 & -D + Y_B G_2 \end{pmatrix}$$

Then, we can place the eigenvalues of $\underline{F}$ using the change of variable which diagonalizes it. For any positive pair $\lambda_1 \neq \lambda_2$, one can find θ_1 and G_2 such that $-D + (1-\theta_1)\underline{\mu}_A = -\lambda_1$ and $-D + G_2 Y_B = -\lambda_2$ with $\lambda_i>0$, i=1,2 and $\theta_1>1$. Posing $\xi_1=e_{XA}$ and $\xi_2=-G_2 e_{XA}+(\lambda_2-\lambda_1)e_{XB}$, one gets:

$$\begin{cases} \dot{\xi}_1 = -(\lambda_1 + v(t))\xi_1 \\ \dot{\xi}_2 = G_2 v(t)\xi_1 - \lambda_2 \xi_2 \end{cases}$$

Introducing the candidate Lyapunov:

$$V = \frac{1}{2}\xi_1^2 + \frac{1}{2}\xi_2^2$$

It is easy to show that V is decreasing if:

$$\lambda_1 + v(t) - \frac{(G_2 v(t))^2}{4\lambda_2} > 0, \ \forall t$$

In particular, this holds if G2 is chosen such that:

$$\lambda_2 > \frac{G_2{}^2 \overline{v}}{4}$$

where $\overline{V} \geq maxV(t)$

The experimental results

The previous observers were used to reconstruct X_A and X_B from the knowledge of S_{in}, D, Y_A and Y_B and the measurements of X_T, S_1, S_2 and S_3. The first observer (denoted #1) is the partially

tunable observer with $G_1 \neq 0$ and $G_2 \neq 0$ while the second observer (numbered #2) is the one proposed in the proposition 2. The model parameters Y_A and Y_B were obtained from an identification that has been realized using the available data and which were in accordance with those from the literature: Y_A=0.2511 and Y_B=0.0629. For the observer #1, G_1=-100 and G_2=-100 while G_1=1.1 and G_2=-2 for the observer #2 were chosen to ensure the dynamics of the observers to be asymptotically stable. Because of lack of place, comparisons of the results with the non-tunable asymptotic observers are not shown (G_1=0 and G_2=0).

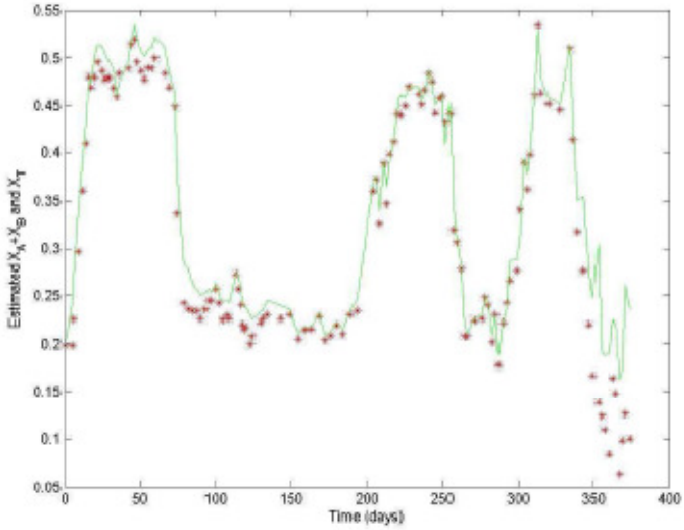


Figure 3: Sum of the signals $\hat{X}_A$ and $\hat{X}_B$ generated by the observer #1 (continuous line) and measurement of the total biomass (stars) in g/l.

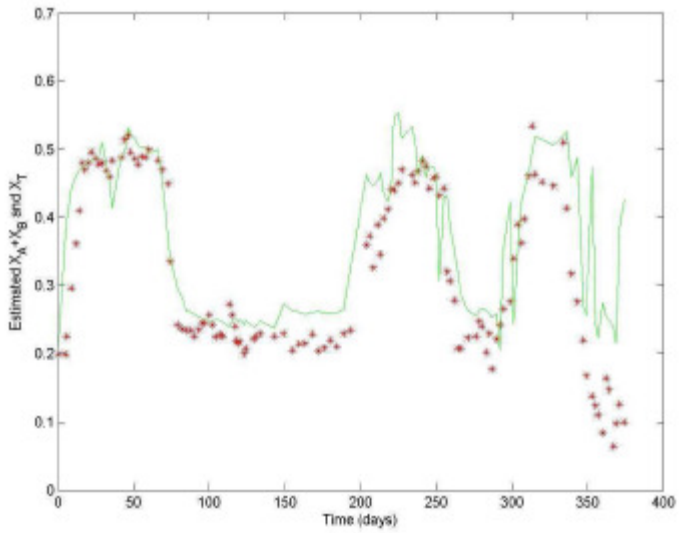


Figure 4: Sum of the signals $\hat{X}_A$ and $\hat{X}_B$ generated by the observer #2 (continuous line) and measurement of the total biomass (stars) in g/l.

At thos step, we have generated 3 sets of two signals ($\hat{X}_A$ and $\hat{X}_B$) with the observers #1 and #2. The problem, now, is to choose which observer gives the best result before applying the second step of the procedure. Obviously, the comparison of the measurement $X_T=\hat{X}_A+\hat{X}_B$ is a first criterion that can be used. For instance, The figure 3 and 4 present such comparison for the

estimated signals generated by the observers #1 and #2. However, it does not give direct information about how the generated signals allow an appropriate fitting of substrate dynamics.

How evaluating the quality of the signals generated by the observers ?

Although it has been argued that the model is not necessary to generate estimations of X_A and X_B, it can be used if available, to validate a posteriori our approach. In such a case, using (i) the comparison between the estimations of X_A and X_B generated by the observers and the trajectories generated by this model or (ii) the comparison of the substrate measurements and the trajectories of the substrates generated by the model when the estimations of X_A and X_B generated by the previous observers are used as inputs of a reduced [2]-like model including only the substrate dynamics, are two different possible ways of evaluating our approach.

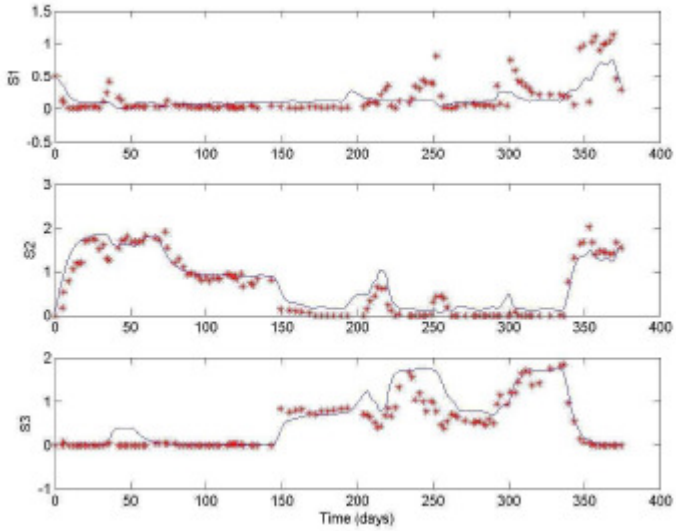


Figure 5: Predictions of Si using $\hat{X}_A$ and $\hat{X}_B$ (generated by the observer #1) as inputs of the reduced model [2].

Apart from this work, a simple macroscopic model of the chemostat experiments has been obtained assuming there were no exogen inputs acting on the process (as the problem of the temperature presented hereabove). Because of lack of space, one cannot show the evaluation with both methods: only the results of the evaluation method (ii) are reported in the figures 5 and 6 for the observers #1 and #2 respectively.

Discussion of the results

Obviously, with the data set we have used, the partially tunable observer #1 give significantly better results than the observer #2 with respect to the criteria we have chosen to evaluate them. Obviously, it is due to the fact that the convergence rate of the asymptotic observer is only driven by the dilution rate while the observer #2 uses kinetics function which can present uncertainty. Such an observer thus gives appropriate tool to solve the first procedure step to solve this important ecological assignation problem.

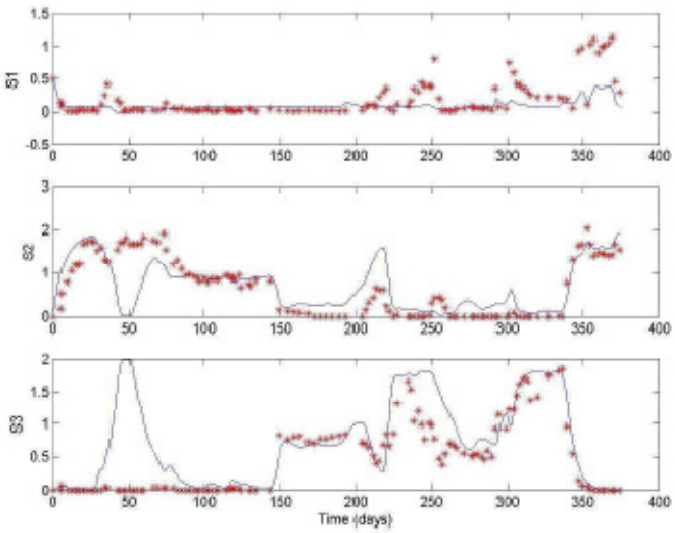


Figure 6: Predictions of Si using $\hat{X}_A$ and $\hat{X}_B$ (generated by the observer #2) as inputs of the reduced model [2].

Assigning a function to a species in the nitrification process

The additional available data

In addition to the measurements of the total biomass and the substrates, the relative abundances of 44 detected species by SSCP are available over the entire period of the experiments. These data are represented in the figure 7

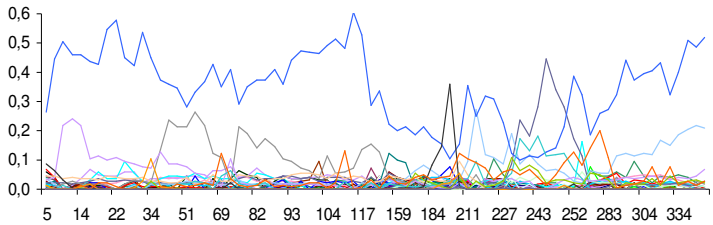


Figure 7: Relative abundances X_i of the 44 species detected by SSCP with $\sum_{i=1}^{44} X_i = X_A + X_B = X_T$. All units are in g/L.

Generation of the best combination of individual relative species abundances to approximate the signals XA and XB generated with the observers.

Once the signals of the functional biomasses have been generated the problem defined in [6] must be solved. Although there exists many powerful softwares to do so, it is a static optimization problem and as long as both the number of functional biomasses, the number of species *N* and the number of sampling points *M* are not too large, the simplest way to proceed is to test all possible combinations of X_i. In the present case, the number of functions is only 2, *N*=44 and *M*=76: the best solution (data not shown) was obtained in three days on a standard PC.

Conclusions and perspectives

In the present paper, a procedure to solve the important assignation problem in microbial

ecology was presented and evaluated using real data from a nitrification process. The two-step procedure proposes first the use of new observers to generate – independently of the kinetics of the process – the trajectories of the functional biomasses of the bioprocess and, in a second step to find the best combination of individual species concentrations detected via the use of molecular fingerprint techniques.

The first proposed observer should be preferred if nothing is known about the kinetics. If only one kinetic is known, we can completely tune an observer in coupling a robust observer (in the sense it does not depend on the unknown kinetics) with a hybrid one. Finally, if the two kinetics are known, it should be noticed that there is no reason of coupling the two observers: each observer is tunable independently of the other.

It seems here particularly important to notice that it is possible to build different observers from the set of measurements S_i, i=1… or P+1. Indeed, the design of the proposed observers is based on the introduction of auxiliary variable Z which allows the observer dynamics to be independent of the kinetics. Depending on the quality of the different available measurements, it may happen that one change of variable gives better result than another one. It means that it is possible to reconstruct the same variables – here X_A and X_B – from different data: how using this redundancy obviously poses new interesting research questions. Another interesting perspective is to extend the results to cases where there are uncertainties on the input substrate concentration or in the yield coefficients.

ANNEXE 2

MICROBIAL DIVERSITY AND THE NEUTRAL CHEMOSTAT

Jérôme Hamelin[1], Maxime Dumont[1], Jérôme Harmand[1,2], Jean-Jacques Godon[1], Bart Haegeman[1,2]

[1] INRA, UR050, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, F-11100, Narbonne, France
[2] INRA-INRIA MERE research team, UMR Analyse des Systèmes et Biométrie, SupAgro, Montpellier, France

Introduction

Microbial ecosystems are the functional heart of any biological process (e.g. waste-water treatment plants). They also provide a laboratory for fundamental ecological questions, quite in contrast with plant or animal communities. Indeed, microbial microcosms allow performing experiments during few days with enough external control of environmental conditions, where other experimental systems would require several years. They occupy a limited space, but still contain billions of individuals and thousands of species, making them statistically representative (Jessup *et al* 2004).

However, the study of the dynamics of microbial communities has only recently become feasible with the advent of molecular biology techniques. In particular, molecular fingerprinting is a cheap and fast DNA-based technique (DGGE, RISA, SSCP, TRFLP), providing a blurred image of the community composition (Fromin *et al* 2002), being ideal for following microbial community dynamics experimentally. The measurement of diversity from fingerprints has also recently been proposed (Loisel *et al* 2006; Haegeman *et al* submitted).

The chemostat device is a well-stirred growth chamber with a constant flow rate of nutrient in a constant volume. In such conditions, microbial biomass remains constant over time and microorganisms are washed-out by dilution except those having the highest growth rate. Experimentally, the coexistence of many species and the absence of competitive exclusion is often observed. These observations are difficult to reconcile with the chemostat model based on resource-dependant biomass growth, but rather suggest stochastic models to describe these dynamics.

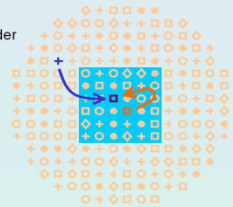
Taking the opposite course, a neutral community model (NCM) for chemostat was built. The dynamics of Simpson diversity index (Vanpeteghem *et al* 2008) was used for reconciling experimental results with modelling outputs.

The neutral model and the Simpson diversity index

Neutral community model (NCM)

The Hubbell's NCM describes the dynamics of species abundance of a local community in contact with a much larger meta-community, following a stochastic approach (Hubbell 2001).

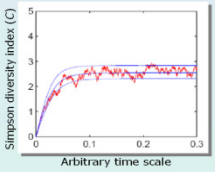
Neutrality states that **individuals behave identically** under identical circumstances. The dynamics is triggered by death events. When an individual in the local community dies, it is replaced by either immigration, an immigrant of the meta-community, or reproduction, the offspring of another local individual. The **number of individuals** in the local community **remains therefore constant**. These few simple rules yield a model with a limited number of parameters.



Dynamics of the Simpson diversity index

The average **Simpson diversity index** (***C***) in the meta-community is directly related to the fundamental biodiversity parameter (θ), following $C = ln\ (1+\theta)$ (He & Hu 2005). Whereas the steady-state structure is well understood, results about the dynamical aspects of NCM are scarce.

A dynamical equation for the **Simpson diversity index** (***C***) in the local community has recently been proposed (Vanpeteghem *et al* 2008).
The graph illustrates the stochastic dynamics for one simulated trajectory (red line) compared with the analytical predictions of mean and standard deviation (blue lines) of ***C***.



The (neutral) chemostat and fingerprinting data analysis

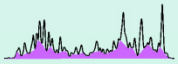
The (neutral) chemostat

The chemostat is a well-stirred growth chamber, with a constant flow rate of nutrient in a constant volume. Some neutral features can be highlighted.

- Because of mixing, all individuals have the same resource available to grow and the same probability to be washed out. **Individuals behave identically** under identical circumstances, following the NCM.
- Because of constant dilution rate, microbial **biomass remains constant over time**, like the local community in the NCM.
- **Contamination events** at the inlet during feeding or aeration may be associated with immigration events in the NCM

Simpson diversity index from fingerprint

The **Simpson diversity index** is defined as the probability that two individuals drawn randomly from the community belong to the same species. It can directly be obtained from fingerprints in a statistically consistent way.



$$\sum_{p=1}^{P} a_p + b = 1$$

A fingerprint is composed of a background (***b***) and peaks (***P***) above ***b***, with a_p as peak relative abundances. The contribution of ***b*** area increases with diversity (Loisel et al 2006).

When information about ***b*** is kept, the **Simpson diversity index (*C*)** can be accurately estimated (Haegeman *et al* submitted).

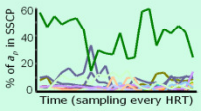
$$\hat{C} = -ln \sum_{p=1}^{P} a_p^2$$

Simpson diversity index, population dynamics and the (neutral) chemostat

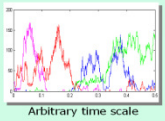
Population dynamics in chemostat

In the current chemostat model, based on resource-dependant microbial growth, all individuals regardless of species are assumed to grow at the same rate, which is the neutral assumption. It predicts **competitive exclusion** of the most adapted species at equilibrium… **but in reality**...

Dynamics of SSCP peak areas (a_p) in a stable nitrifying chemostat evaluated every HRT (~8 days)

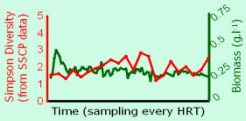


Simulated populations dynamics using a NCM adapted for chemostat



Simpson diversity dynamics in chemostat

A series of Simpson diversity index was obtained from SSCP fingerprints in a **stable nitrifying chemostat**. Stable Simpson diversity index was observed in accordance with the NCM adapted for chemostat, whereas highly dynamical populations dynamics were observed.



Qualitative outputs of the NCM for chemostat:

substrate	dilution	contamination	diversity
↗	=	=	=
=	↗	↗	=
=	↗	=	↘
=	=	↗	↗

Conclusions

- The dynamics of the Simpson diversity index in the local community can be recovered from the Hubbell's NCM (Vanpeteghem *et al* 2008).
- The Simpson diversity index can be accurately determined from microbial fingerprinting patterns (Haegemen *et al* submitted).
- The chemostat principle has many common features with the Hubbell's NCM: bacterial cells behave identically because of mixing and imposed growth rate, bacterial biomass remains stable because of constant dilution rate, contamination events may occur at the inlet.
- No need to evoke heterogeneity in experimental chemostat (biofilm or flocculation) to model the persistence of microbial diversity in chemostat.

References

Fromin N, Hamelin J, Tarnawski S *et al* (2002). Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology* 4: 634-643.
Loisel P, Harmand J, Zemb O *et al* (2006) DGE and SSCP molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environmental Microbiology* 8: 720-731.
Haegeman B, Sen B, Godon JJ, Hamelin J. Accurate measurement of Simpson diversity using microbial community fingerprints. *Submitted.*
Vanpeteghem D, Zemb O, Haegeman B (2008) Dynamics of neutral biodiversity. *Mathematical Biosciences* 212: 88-98.
Hubbell SP (2001) The Unified Neutral Theory of Biodiversity and Biogeography. Princeton, Princeton University Press, New Jersey.
He F, Hu XS (2005) Hubbell 's fundamental biodiversity parameter and the Simpson diversity index. *Ecology Letters* 8: 386-390.

ISME-12, August 17-23, 2008 - Cairns, Australia

Institut National de la Recherche Agronomique

APPORTS DE LA MODELISATION DES INTERACTIONS POUR UNE COMPREHENSION FONCTIONNELLE D'UN ECOSYSTEME,

APPLICATION A DES BACTERIES NITRIFIANTES EN CHEMOSTAT

Résumé

Les caractéristiques des écosystèmes microbiens en font des modèles d'étude pertinents pour aborder des questions importantes de l'écologie générale par une approche expérimentale et théorique. Leur utilisation reste néanmoins marginale du fait de la difficulté à extraire certaines informations clés. Dans cette thèse, nous avons travaillé à dépasser ces difficultés pour étudier le lien biodiversité-fonctionnement des écosystèmes par le couplage d'outils de la biologie moléculaire et de l'automatique lors du suivi de chémostats nitrifiants. D'abord, nous avons élaboré une procédure générique permettant d'assigner une des fonctions étudiée de l'écosystème considéré à chacun des phylotypes (i.e. espèces moléculaires) détectés via des empreintes moléculaires. Cette méthode constitue une étape essentielle pour effectuer une modélisation structurée de type "bilan de matière" des interactions inter- et intra-spécifiques pouvant s'établir entre les différentes espèces assemblées. Ensuite, nous avons procédé à une modélisation de ce type en considérant la dynamique de quatre bactéries nitrifiantes : deux nitritantes (i.e. oxydant l'azote ammoniacal en nitrite) et deux nitratantes (i.e. oxydant les nitrites en nitrates). La confrontation des données expérimentales de ces quatre phylotypes avec les sorties du modèle montre que la prise en compte des différents types d'interactions permet d'expliquer la coexistence de plusieurs espèces en compétition pour une même ressource ainsi que la dynamique des fonctions exprimées au niveau de l'écosystème considéré. Enfin, nous avons étudié l'influence de différentes perturbations biotiques sur la résilience des systèmes nitrifiants et confirmons plusieurs études tendant à montrer que le fonctionnement macroscopique stable d'un écosystème peut s'accompagner de variations importantes au niveau populationnel.

Abstract

The characteristics of microbial ecosystems make them appropriate models for studying certain important issues in general ecology using both theoretical and experimental approaches. However, their use remains marginal due to the difficulty in extracting key information. In this thesis, we have worked to such difficulties in the study of the link between biodiversity and ecosystem functioning by the use of molecular and automatic tools during the monitoring of nitrifying chemostats. First, we propose a generic method for allocating one of the studied functions performed by an ecosystem to each of the phylotypes (i.e. molecular species) detected by molecular fingerprinting. This method constitutes an essential step in devising a structured mass-balance model taking account of inter- and intra-specific interactions which may occur between the different assembled species. Then, we accomplished such modeling by considering the dynamics of four phylotypes: two AOB (i.e. oxidizing ammonium into nitrite) and two NOB (i.e. oxidizing nitrites into nitrates). The comparison of the experimental data for these four phylotypes with the simulation given by the model shows that microbial interactions can lead to coexistence and play an important role in the functions expressed by the ecosystem. Finally, we have also studied the influence of different biotic disturbances on the resilience of the nitrifying systems and as a result, confirm studies which have been shown that the macroscopic functioning of an ecosystem can be stable despite significant variations at the populational scale.

Mots clefs

Ecologie, Ecologie microbienne, chémostat, nitrification, empreintes moléculaires, ADNr 16S, systèmes dynamiques, modélisation, approche systémique, bilan de matières, observateurs, automatique, interactions inter- et intra-spécifiques, perturbations biotiques