

# Les biofilms aquatiques : dans quelle mesure permettent-ils de comprendre l'effet des pesticides sur le fonctionnement des cours d'eau ?

## Exemple en zone de vignoble

Stéphane Pesce, Ahmed Tlili et Bernard Montuelle

*En France, malgré le développement de nouvelles pratiques agricoles plus respectueuses de l'environnement, les pesticides restent les principaux responsables de la pollution chimique des rivières. La compréhension et l'évaluation de l'impact de ces substances sur le fonctionnement des cours d'eau représentent donc un enjeu majeur pour la reconquête de la qualité de l'eau et des milieux aquatiques. À partir des résultats d'études obtenus sur une rivière du Beaujolais, les auteurs de cet article analysent le rôle écologique clef joué par les communautés microbiennes structurées sous forme d'assemblage appelés « biofilms » et proposent leur utilisation comme indicateurs biologiques pour détecter et évaluer les pollutions chimiques par les pesticides ainsi que leurs effets sur le fonctionnement des cours d'eau.*

Les diverses pressions anthropiques (rejets domestiques/industriels/agricoles), qu'elles soient ponctuelles ou diffuses, permanentes ou temporaires, entraînent des dégradations parfois fortes et durables des écosystèmes aquatiques. Depuis quelques années, au-delà du constat de pollution d'un milieu, se sont développées les notions de « santé des écosystèmes » et de « bon état écologique » (Costanza et Mageau, 1999) qui considèrent une approche plus globale du milieu aquatique, allant si nécessaire jusqu'à prendre en compte le fonctionnement du bassin versant.

Malgré le développement d'une législation plus protectrice de l'environnement et l'introduction progressive de nouvelles pratiques agricoles pour limiter l'usage et le transfert des pesticides les plus mobiles, de telles substances sont très fréquemment détectées dans les eaux de surface, à des concentrations souvent élevées (IFEN<sup>1</sup>, 2007). La directive cadre européenne sur l'eau (DCE, 2000/60/CE), qui établit une politique communautaire en terme de préservation et de gestion des écosystèmes aquatiques, se traduit par une intensification des actions de surveillance des écosystèmes aquatiques et l'élaboration d'actions correctives afin de réduire leur niveau de contamination et atteindre ainsi le « bon état » chimique et écologique des masses d'eau avant 2015.

Les zones viticoles sont des zones bien identifiées de dégradation de qualité des milieux aquatiques (Agence de l'eau Rhône-Méditerranée & Corse, 2008). Elles drainent de petits hydrosystèmes particulièrement exposés aux pesticides qui peuvent être temporairement en fortes concentrations (orages, ruissellement) et souvent en mélange de substances (Rabiet *et al.*, 2008). Les modalités fines de transfert et d'action des pollutions diffuses ne sont pas entièrement connues. Il est cependant indispensable de pouvoir relier, dans ces cours d'eau, les niveaux d'exposition réels aux effets sur les communautés biologiques, en intégrant les aspects de variabilité spatiale et temporelle (Montuelle *et al.*, 2007). De même, la capacité de récupération des communautés (résilience) est un élément de connaissance important pour appréhender le potentiel de retour à un bon état écologique en cas de remédiation du milieu.

Parmi les biocénoses aquatiques, les communautés microbiennes sont des acteurs clés dans le fonctionnement général des écosystèmes aquatiques. En effet, par leur position à la base du réseau trophique et leurs capacités enzymatiques, les micro-organismes eucaryotes (possédant un noyau : microalgues, champignons, levures...) et procaryotes (sans noyau : bactéries, cyanobactéries...) interviennent de manière prépondérante dans différents processus écologiques fondamentaux : la production primaire, assurée par les orga-

1. Institut français de l'environnement.

### Les contacts

Cemagref, UR QELY,  
Qualité des eaux  
et prévention des  
pollutions, 3 bis quai  
Chauveau, CP 220,  
69336 Lyon Cedex 09

nismes autotrophes, capables de synthétiser du carbone organique par photosynthèse (microalgues et cyanobactéries), ou la dégradation de la matière organique et le recyclage des nutriments, assurés par les organismes hétérotrophes, qui ne sont pas capables d'effectuer la photosynthèse (bactéries, champignons...).

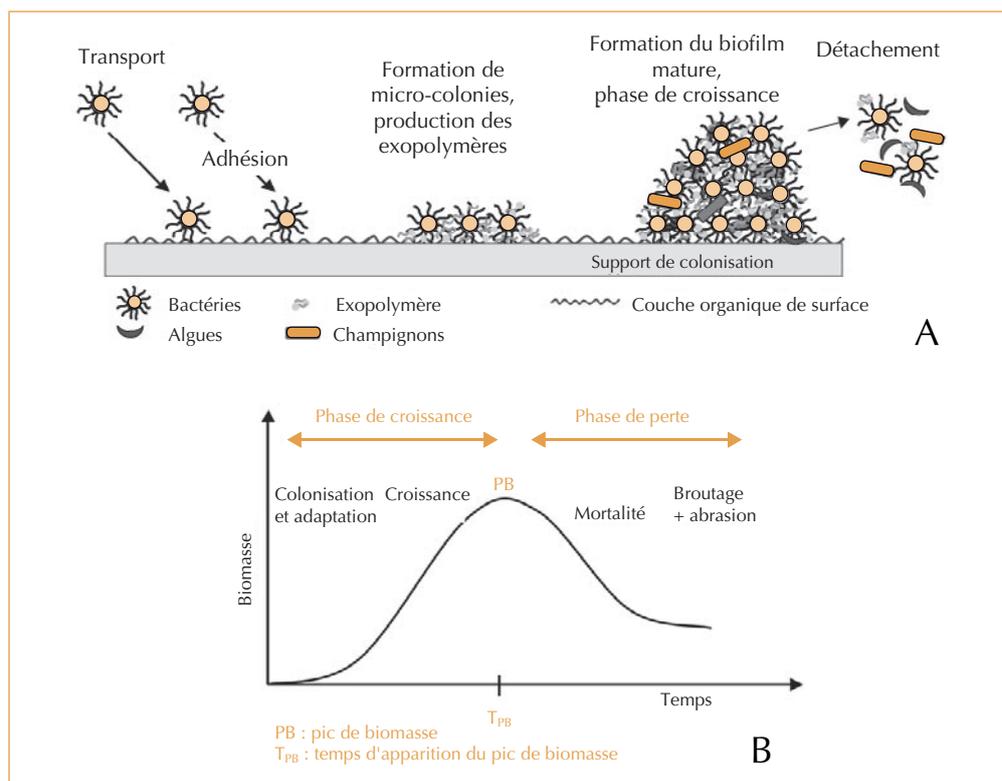
Sur des supports immergés, ces communautés microbiennes se structurent sous forme d'agrégats dénommés biofilms ou périphyton (encadré 1). Dans les petits cours d'eau, tels que ceux drai-

nant les surfaces agricoles, l'importance relative de ces biofilms est grande et ils assurent un rôle fonctionnel majeur pour l'écosystème (Dorigo *et al.*, 2008 ; Villeneuve *et al.*, 2009). De plus, ces assemblages microbiens interagissent précocement avec les substances dissoutes (Sabater *et al.*, 2007) et notamment avec les pesticides. La contamination des milieux aquatiques par ce type de polluants est donc susceptible de modifier leur structure et leur fonctionnement par des effets directs et/ou indirects (Pesce *et al.*, 2006 ;

### Encadré 1

#### Formation et cycle de développement d'un biofilm (Othoniel, 2006)

Les biofilms se développent selon un schéma maintenant bien connu. Les espèces microbiennes sont entraînées par le courant et colonisent les surfaces immergées, selon une succession qui dépend des temps de génération spécifiques des espèces (bactéries ; champignons filamenteux ; algues de type diatomées, algues vertes et bleues). L'atteinte d'un climax (biofilm mature, A) dépend des conditions environnementales (teneurs en nutriments contrôlant la croissance des micro-organismes, régime hydraulique entraînant ou non de l'abrasion, température...). Les dynamiques de croissance et le calcul d'un taux de croissance en phase exponentielle (B) permettent de caractériser des situations chimiques différentes.



▲ Figure 1 – Formation et cycle de développement d'un biofilm (Othoniel, 2006 ; d'après (A) Mozes, 1995 ; (A) et (B) Biggs, 1996).

Tlili *et al.*, 2008). En outre, les micro-organismes présentent une forte capacité à répondre rapidement à des changements environnementaux et à s'y adapter de manière transitoire ou irréversible (Sabater *et al.*, 2007). C'est pourquoi les biofilms microbiens constituent des indicateurs de perturbation (ou bio-indicateurs) particulièrement pertinents qui peuvent offrir un signal précoce de stress environnemental suite à une pollution chimique (Sabater *et al.*, 2007) et notamment par des pesticides.

Deux approches complémentaires co-existent pour évaluer la réponse microbienne à un stress environnemental :

- une approche basée sur l'étude structurale des communautés (biomasse, taxonomie, diversité...). C'est la méthode la plus connue qui a donné des indicateurs normalisés comme l'indice biologique diatomique (IBD) ou l'indice de polluosensibilité spécifique (IPS), basés sur la taxonomie des algues appartenant au groupe des diatomées (Coste, 1982 ; Morin *et al.*, 2007). Pour l'instant ces méthodes sont cependant limitées à une bio-indication essentiellement trophique ;

- une approche fonctionnelle portée généralement sur le suivi d'activités métaboliques (photosynthèse, respiration, activités enzymatiques, potentiel de biodégradation...).

L'utilisation du biofilm microbien comme bio-indicateur permet donc un large choix de descripteurs, plus ou moins adaptés aux différents types de contaminants. Le choix de ces descripteurs est également très important afin de pouvoir discriminer les effets liés aux pesticides de ceux associés aux facteurs environnementaux (vitesse de courant, luminosité, autres composés organiques et inorganiques) et de prendre en considération les spécificités et les interactions des différentes composantes biologiques du biofilm (Sabater *et al.*, 2007 ; Villeneuve, 2008).

Dans cet article, nous proposons ainsi de discuter le potentiel offert par les biofilms aquatiques pour évaluer l'impact des pesticides sur le fonctionnement d'un cours d'eau, en se basant sur des résultats obtenus au cours de différentes études menées sur un site atelier du Beaujolais. Après une présentation du site d'étude et une brève description des différents descripteurs microbiens utilisés, nous exposerons et commenterons les résultats obtenus pour chacun d'entre eux afin d'en discuter la pertinence comme bio-indicateurs d'une pollution par des pesticides.

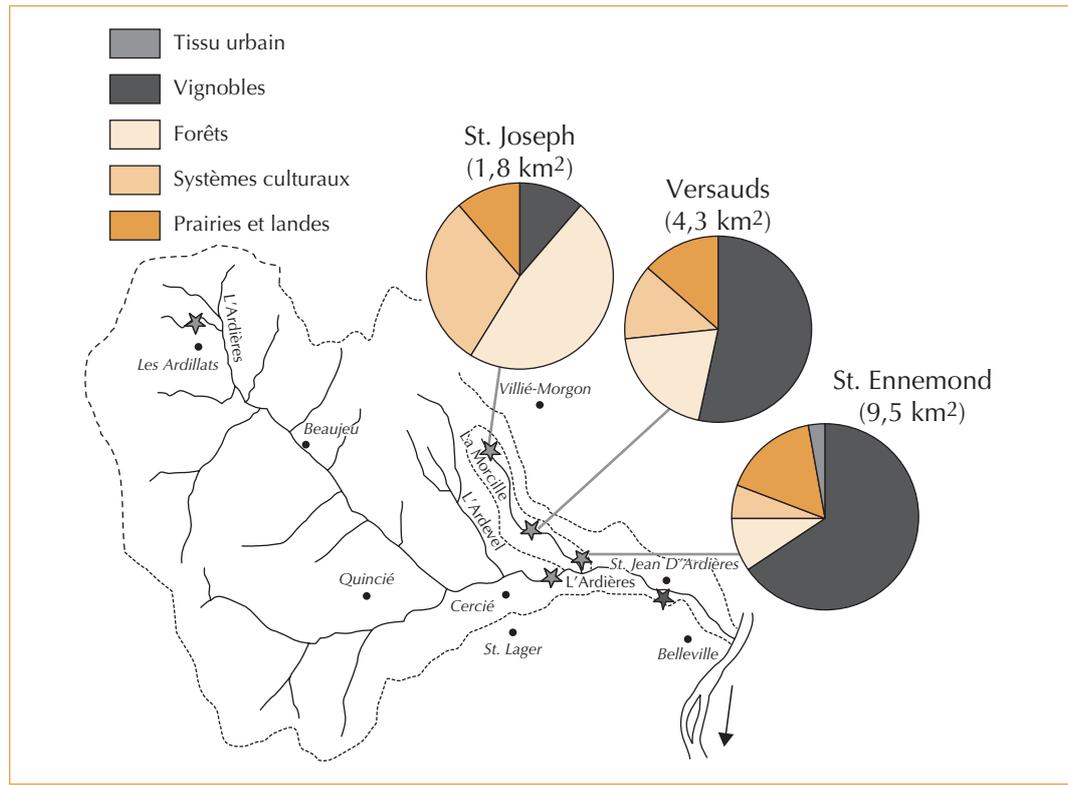
## Matériels et méthodes

### Le site d'étude (la rivière Morcille) : description et mise en place du recueil des données

Le bassin versant de la Morcille (9,5 km<sup>2</sup>) est situé au nord du département du Rhône, dans le Haut-Beaujolais, entre la bordure orientale du Massif Central et l'extrémité ouest de la vallée de la Saône (figure 2). Il constitue un sous-bassin de l'Ardières (220 km<sup>2</sup>) avec lequel il compose le site atelier Ardières-Morcille (SAAM), intégré dans la zone atelier du bassin du Rhône (ZABR). Le bassin versant de la Morcille est essentiellement forestier en amont et planté de vignes en aval. Trois sites d'échantillonnage sont généralement privilégiés par le Cemagref pour la caractérisation chimique du cours d'eau : un site amont, dénommé « Saint-Joseph » ; un site intermédiaire, dénommé « Versauds » ; et un site aval, dénommé « Saint-Ennemond ». Ces trois stations sont représentatives de l'augmentation de la proportion relative de vigne sur la surface de bassin versant drainée par le cours d'eau de la station amont (7 %) à la station aval (69 %) (figure 2). Cette augmentation est associée à un gradient croissant des teneurs en pesticides (majoritairement à action herbicide) tout au long du cours d'eau avec une prédominance du diuron (Dorigo *et al.*, 2007 ; Gouy et Nivon, 2007 ; Rabiet *et al.*, 2008 ; Pesce *et al.*, 2009). Cette matière active, largement utilisée comme herbicide sur les vignes ces dernières années, est interdite d'utilisation par les viticulteurs depuis le 13 décembre 2008.

Les caractéristiques de ce bassin versant en font un site de choix pour évaluer l'impact de ce type de polluants sur les communautés microbiennes. La principale période de pollution du cours d'eau par les pesticides s'étend d'avril à août, durant les différents traitements des vignes par les produits phytosanitaires, mais le gradient de contamination est également mesuré en période hivernale. Comme souvent dans le cas de bassins versants agricoles (Pesce *et al.*, 2008), un gradient similaire amont-aval est également observé avec les métaux lourds, notamment l'arsenic et le cuivre (Rabiet *et al.*, 2008), le carbone organique dissous et les composés inorganiques azotés et phosphorés (Dorigo *et al.*, 2007). Les micro-organismes étant également très sensibles à ces composés, ces derniers peuvent donc représenter des facteurs de confusion importants dans l'évaluation de la réponse des communautés microbiennes

► Figure 2 – Localisation des trois stations de prélèvements sur le bassin versant de la Morcille. Pour chaque station est indiquée la surface drainée par le cours d'eau et son occupation des sols.



aux pesticides (Dorigo *et al.*, 2007 ; Pesce *et al.*, 2008 ; Villeneuve, 2008).

2. En anglais : *High-Performance Liquid Chromatography*.

3. En anglais : *Polymerase Chain Reaction – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*.

#### LES RÉSULTATS ISSUS DES CAMPAGNES D'ÉCHANTILLONNAGE

Les résultats présentés dans cet article sont issus de différentes campagnes d'échantillonnage effectuées sur la Morcille au cours de la période 2004-2008. Les biofilms ont été collectés au niveau des trois stations précédemment sur des substrats artificiels immergés pendant deux mois (supports de verre) ou des substrats naturels prélevés dans le lit de la rivière (cailloux). Les périodes de prélèvement et les substrats utilisés seront précisés pour chacun des résultats présentés ci-après.

#### LES DESCRIPTEURS MICROBIENS UTILISÉS

Plusieurs types de descripteurs ont été utilisés pour caractériser les propriétés fonctionnelles et structurales des biofilms de la Morcille lors des travaux présentés dans cet article. La biomasse totale, qui permet d'appréhender la structure générale du biofilm, a été estimée par mesure de la matière sèche. La distribution des différentes classes de micro-organismes photosynthétiques

(microalgues et cyanobactéries) au sein du biofilm a été appréciée par analyse des pigments photosynthétiques par chromatographie liquide haute performance (HPLC<sup>2</sup>). La diversité microbienne a également été appréhendée de manière plus fine à l'aide d'une méthode moléculaire dite « d'empreinte génétique » : la PCR-DGGE<sup>3</sup> (encadré 2).

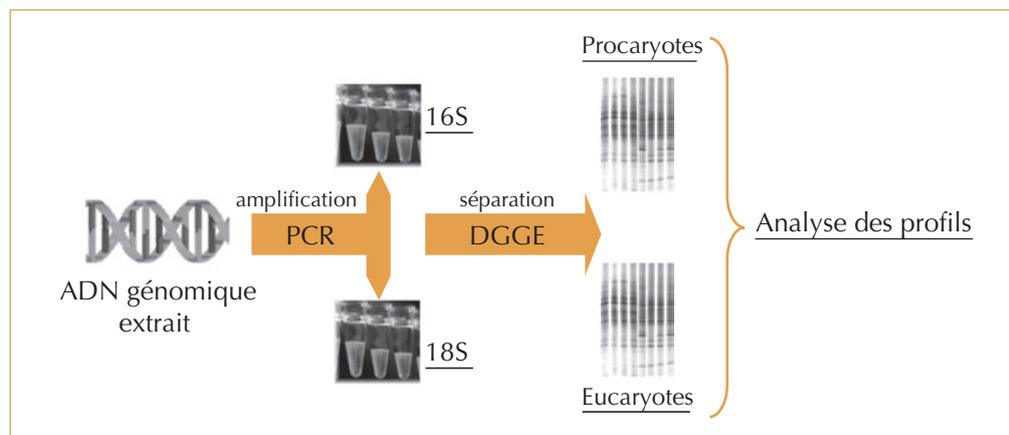
Le niveau de tolérance global des communautés photosynthétiques (algues et cyanobactéries) du biofilm au diuron, principal herbicide détecté dans la Morcille, a été apprécié à partir de tests de toxicité aiguë effectués en laboratoire. Brièvement, les biofilms ont été soumis au laboratoire à des concentrations croissantes en diuron et la réponse microbienne, en fonction du niveau d'exposition, a été appréciée en terme d'activité photosynthétique par mesure du taux d'incorporation de <sup>14</sup>C. Les courbes dose-réponse (ou dose-effet) établies ont ainsi permis de déterminer la concentration efficace en diuron inhibant 50 % (CE50) de l'activité photosynthétique de chacune des communautés étudiées (encadré 3).

Le potentiel de dégradation du diuron par les communautés microbiennes bactériennes et

## Encadré 2

## Principe de la méthode PCR-DGGE

Initialement, la DGGE (électrophorèse en gradient de gel dénaturant) a été développée dans le domaine médical pour détecter des mutations impliquées dans des maladies génétiques. Aujourd'hui elle est largement utilisée pour distinguer les différentes populations de micro-organismes dans des échantillons naturels après amplification par PCR (réactions de polymérase en chaîne) de région de gènes codant pour l'ARN<sup>r</sup> 16S pour les procaryotes ou 18S pour les eucaryotes. Cette technique est basée sur le fait qu'un ADN<sup>s</sup> double brin se dissocie, lorsqu'il est soumis à des dénaturants chimiques, en fonction de sa séquence nucléique. Après amplification, les molécules d'ADN de même taille, différant d'un ou plusieurs nucléotides, vont donc migrer différemment tout au long du gradient dénaturant. Lors de l'analyse d'une communauté complexe, des profils multi-bandes sont obtenus et chaque bande est théoriquement représentative d'une séquence et donc d'un phylotype, permettant ainsi de visualiser la richesse spécifique des communautés.



▲ Figure 3 – Principe de la méthode PCR-DGGE.

4. Acide ribonucléique ribosomique.

5. Acide désoxyribonucléique.

fongiques du biofilm a été évalué par la méthode de radiorespirométrie (qui permet de mesurer la quantité de CO<sub>2</sub><sup>6</sup> issue de l'activité microbienne), couplée à l'utilisation de diuron marqué radioactivement (<sup>14</sup>C-diuron). Brièvement, les biofilms ont été incubés en enceinte radiorespirométrique étanche pendant seize semaines en présence de <sup>14</sup>C-diuron et le suivi de la cinétique de biodégradation complète de la molécule (minéralisation) a été réalisé par un dosage régulier du CO<sub>2</sub> radioactif (<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>) produit par les micro-organismes suite à cette minéralisation.

## Résultats

### Structure et composition du biofilm

La variabilité spatiale et temporelle de la biomasse totale, estimée par mesure du poids sec, a été appréciée à partir de biofilms collectés

mensuellement sur des cailloux prélevés aux trois stations d'échantillonnage entre juin 2007 et mai 2008 (figure 5). Les résultats obtenus au cours de ce suivi d'un an semblent faire apparaître une légère tendance saisonnière avec des biomasses plus importantes en hiver qu'en été. Les variations spatiales inter-sites sont quant à elles très limitées, y compris durant le printemps et l'été, principales périodes de contamination de la Morcille par les pesticides.

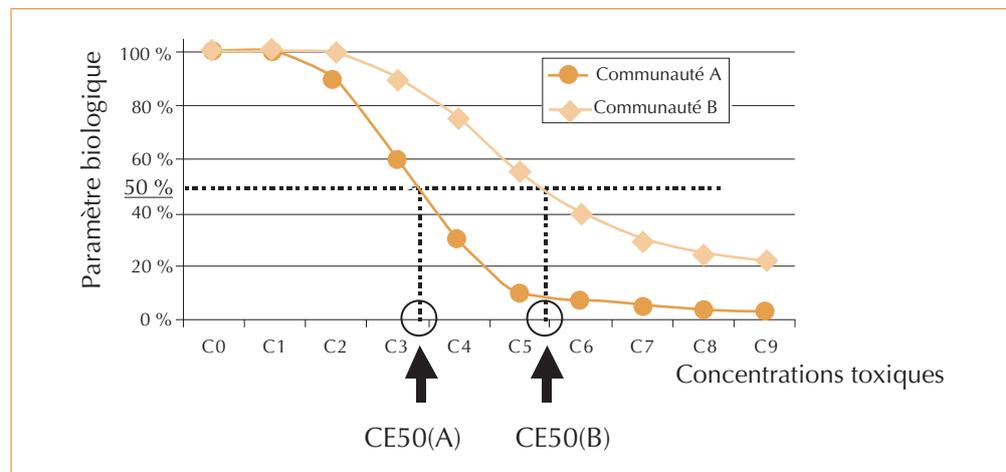
Deux campagnes réalisées sur les trois stations d'échantillonnage au printemps 2004 et en hiver 2005 ont également permis d'appréhender les variations spatiales et saisonnières de la composition du biofilm (Dorigo *et al.*, 2007, 2009). Ces variations sont illustrées sur la figure 6 sous forme d'une analyse en composantes principales (ACP) représentant les individus (échantillons) dans un espace en deux dimensions en fonc-

6. Dioxyde de carbone.

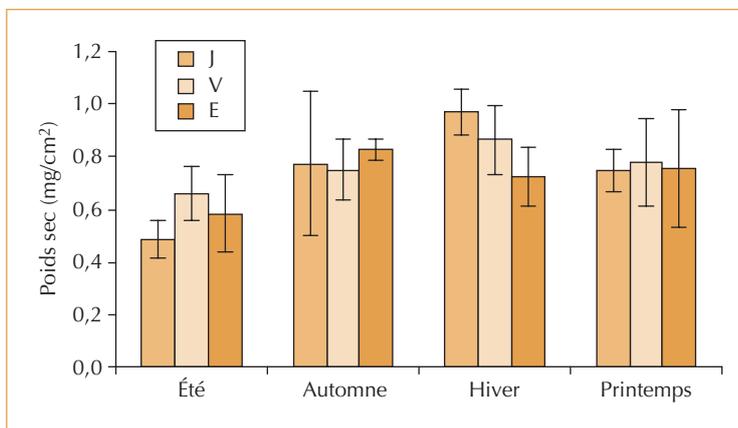
## Encadré 3

## Mesure et comparaison du niveau de tolérance de communautés biologiques

Le niveau de tolérance d'une communauté biologique à un toxique peut être mesuré par estimation de la concentration efficace de ce toxique réduisant de x % l'intensité d'un processus biologique choisi (CE<sub>x</sub>). Cette estimation s'effectue par l'analyse de courbes dose-réponse qui permet de représenter le niveau d'activité biologique en fonction du niveau d'exposition au toxique choisi et de déterminer la valeur de la CE<sub>x</sub> recherchée (généralement la CE<sub>50</sub>, comme sur l'exemple présenté sur la figure 4). La confrontation des CE<sub>x</sub> obtenues pour différentes communautés permet ainsi de comparer leur niveau de tolérance pour un toxique : plus la valeur de la CE<sub>x</sub> augmente, et plus la communauté présente des capacités de résistance importante vis-à-vis du polluant. Ainsi sur la figure 4, la communauté B est caractérisée par une CE<sub>50</sub> supérieure à la communauté A, ce qui signifie qu'elle est plus tolérante que celle-ci au toxique auquel elles ont été exposées.

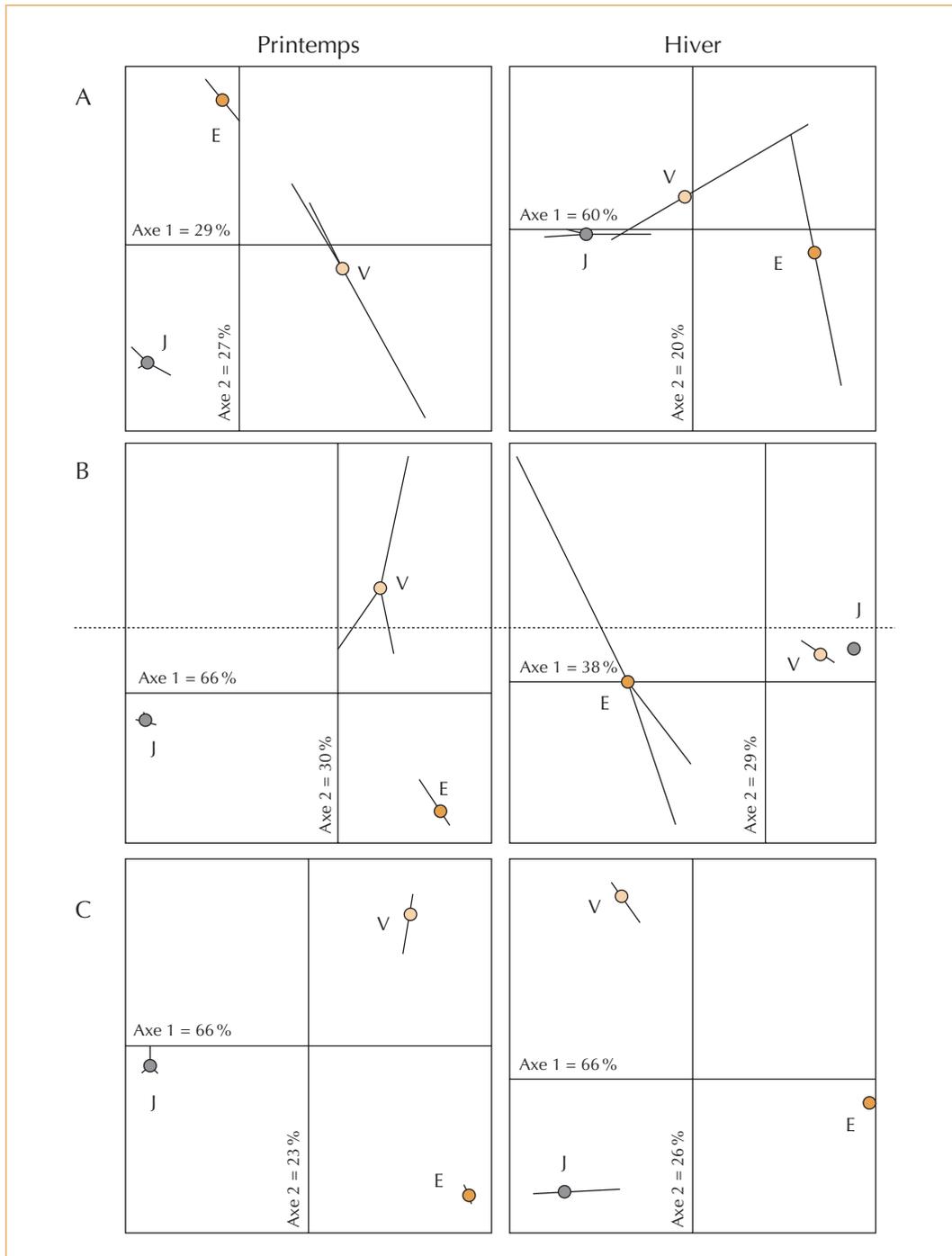


▲ Figure 4 – Mesure et comparaison du niveau de tolérance de communautés biologiques.



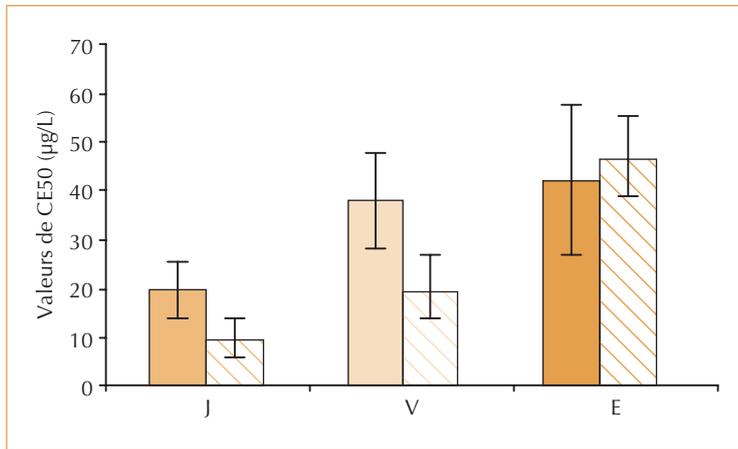
▲ Figure 5 – Évolution saisonnière moyenne (et écarts-types) du poids sec de biofilms collectés mensuellement sur substrats naturels aux trois stations (J : Saint-Joseph ; V : Versauds ; E : Saint-Ennemond) entre juin 2007 et mai 2008.

tion des coordonnées définies par une matrice obtenue par comparaison des profils de diversité génétique observés par DGGE (figure 6B et 6C) ou par analyse de la composition en pigments photosynthétiques (figure 6A). Cette représentation graphique permet ainsi de visualiser les variations suivant les deux axes majeurs qui expliquent la majorité des différences inter-échantillons observées (56 % à 99 % dans les ACP représentées). Les analyses effectuées sur les biofilms printaniers montrent une distinction très nette entre les trois sites en période de pollution par les pesticides, tant au niveau de la répartition pigmentaire des organismes photosynthétiques (microalgues et cyanobactéries) au sein de la communauté (figure 6A), que des diversités eucaryotes (figure 6B) et procaryotes (figure 6C), évaluées par PCR-DGGE. En hiver, cette distinction entre les trois sites reste bien marquée



▲ Figure 6 – Analyse en correspondance principale (ACP) de la répartition des différents pigments photosynthétiques (A), des profils de diversité eucaryote obtenus par PCR-DGGE sur ADNr 18S (B) et des profils de diversité procaryote obtenus par PCR-DGGE sur ADNr 16S (C) dans des biofilms collectés sur substrats artificiels (triplicats) immergés durant deux mois au printemps (mi-avril à mi-juin 2004) et en hiver (février-mars 2005) aux trois stations (J : Saint-Joseph ; V : Versauds ; E : Saint-Ennemond) d'après Dorigo *et al.* (2007, 2009). Pour chaque échantillon, les symboles représentent la position médiane des profils de diversité et les traits la variation observée entre les triplicats.

pour la diversité procaryote (figure 6C), mais de fortes similitudes sont observées entre la station amont et la station intermédiaire au niveau de la diversité eucaryote (figure 6B). Ceci est confirmé par l'analyse pigmentaire de la communauté photosynthétique (essentiellement composée d'organismes eucaryotes) qui fait apparaître un fort rapprochement de la composition des biofilms de chaque station en hiver par rapport au printemps (figure 6A).



▲ Figure 7 – Tolérance moyenne (et écarts-types) au diuron (exprimée sous forme de concentration efficace inhibant 50 % de l'activité photosynthétique : CE50) de biofilms collectés sur substrats artificiels (triplicats) immergés durant deux mois au printemps (mi-avril à mi-juin 2004) et en hiver (février-mars 2005) aux trois stations (J : Saint-Joseph ; V : Versauds ; E : Saint-Ennemond) d'après Dorigo *et al.* (2007). Couleurs pleines : printemps ; couleurs hachurées : hiver.

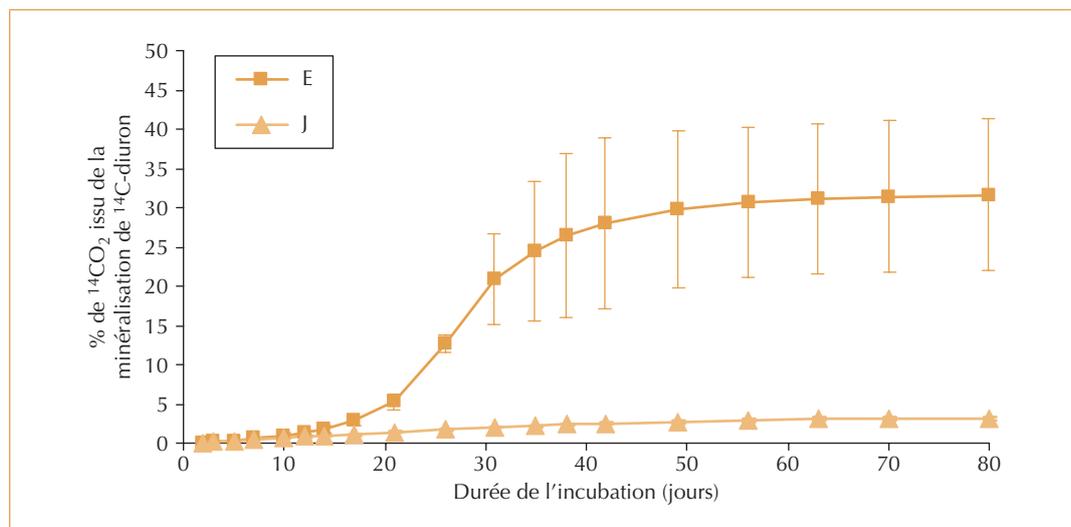
### Tolérance du biofilm au diuron

Les deux campagnes d'échantillonnage décrites précédemment ont également permis d'apprécier le niveau de tolérance des communautés photosynthétiques printanières et hivernales à une exposition aiguë à l'herbicide diuron (Dorigo *et al.*, 2007). Les résultats présentés sur la figure 7 mettent en évidence une augmentation des CE50 entre les trois stations. Ceci traduit donc une plus grande résistance des communautés à ce produit d'amont en aval, au printemps comme en hiver. Des variations saisonnières sont également observées pour les biofilms situés en amont et surtout pour ceux de la station intermédiaire (Versauds), qui sont caractérisés par une CE50 proche de la station aval durant la principale période de pollution par le diuron (printemps) alors qu'elle diminue et se rapproche de celle mesurée en amont durant l'hiver.

### Potentiel de biodégradation du diuron par le biofilm

Le potentiel de biodégradation des communautés microbiennes hétérotrophes de la Morcille a été apprécié à partir de biofilms collectés aux stations Saint-Joseph et Saint-Ennemond, en juin 2007 (Pesce *et al.*, 2009). Les courbes obtenues lors du suivi radiorespirométrique (figure 8) mettent clairement en évidence une augmentation du potentiel de biodégradation totale (minéralisation) du diuron entre la station amont et la station aval durant une période de forte contamination du cours d'eau par cette molécule.

► Figure 8 – Cinétique moyenne (et écarts-types) de minéralisation de <sup>14</sup>C-diuron par des biofilms collectés sur substrats naturels (triplicats) aux stations amont (J : Saint-Joseph) et aval (E : Saint-Ennemond) en juin 2007 d'après Pesce *et al.* (2009).



## Conséquences et conclusions opérationnelles pour la bio-indication

### Nécessité et pertinence de complémentarité des descripteurs microbiens

Les résultats décrits précédemment mettent en évidence une modification nette du biofilm d'amont en aval de la Morcille, tant d'un point de vue structural que fonctionnel. Cependant, certains descripteurs ne permettent pas d'appréhender la spécificité microbienne de chacun des sites étudiés. Ainsi, l'absence de différence inter-sites pour le poids sec des biofilms (figure 5), et ce, quelle que soit la saison, confirme clairement que ce type de descripteur global de la structure générale du biofilm s'avère peu adapté pour étudier la réponse des communautés microbiennes à des modifications environnementales (Othoniel, 2006 ; Villeneuve, 2008). Les changements structuraux des biofilms d'amont en aval sont néanmoins perceptibles à l'aide de descripteurs plus spécifiques, tels que la caractérisation de la composition pigmentaire ou des diversités eucaryotes et procaryotes (figure 6). Les variations inter-sites sont beaucoup plus marquées en période printanière et estivale de forte pollution de la Morcille par les pesticides, en particulier pour les communautés autotrophes, majoritairement eucaryotes (microalgues). Ces communautés sont particulièrement sensibles aux herbicides et notamment au diuron (Pesce *et al.*, 2006 ; Tlili *et al.*, 2008), prédominant dans le cours d'eau à cette période de l'année (Dorigo *et al.*, 2007 ; Rabiet *et al.*, 2008). Les variations spatiales, entre les trois sites présentant un gradient croissant en herbicides, et temporelles, entre le printemps et l'hiver, suggèrent donc un lien fort entre le contexte de contamination par les pesticides et la composition du biofilm. Cependant, ces paramètres structuraux sont aussi conditionnés par de nombreux facteurs physiques (température, vitesse de courant, lumière...) et chimiques (teneurs en nutriments, présence de polluants organiques et inorganiques...) qui évoluent fortement d'amont en aval de la Morcille (Dorigo *et al.*, 2007 ; Rabiet *et al.*, 2008). C'est pourquoi les approches structurales ne peuvent, à elles seules, constituer un outil suffisant pour utiliser les biofilms comme bio-indicateurs d'une pollution par des pesticides.

Le niveau de résistance des biofilms au diuron a été apprécié au moyen d'un descripteur fonc-

tionnel spécifique de la communauté autotrophe : l'activité photosynthétique (figure 7). Cette double démarche d'évaluation des effets de polluants sur la diversité microbienne et sur l'acquisition d'une tolérance/résistance se place dans le cadre conceptuel de la méthode PICT<sup>7</sup> (Blanck, 1998) qui postule qu'une communauté exposée à un contaminant s'adapte et devient tolérante à cette substance (encadré 4). Elle est fondée sur l'hypothèse qu'une communauté biologique naturelle est constituée de différents composants ayant des sensibilités variables vis-à-vis d'un toxique donné. Ainsi, suite à une exposition à un toxique, les organismes les plus sensibles ne sont plus concurrentiels et sont remplacés par des organismes plus tolérants. La communauté résultante présente alors une tolérance vis-à-vis du toxique, supérieure à celle observée pour une communauté semblable mais n'ayant pas connu de pression de sélection par ce toxique (Bérard *et al.*, 2002). L'utilisation de la démarche PICT a ainsi permis de mettre en évidence une forte adaptation de la communauté autotrophe au diuron dans la Morcille, engendrant alors une augmentation notable de leurs capacités de résistance à ce polluant d'amont en aval (figure 7 et Dorigo *et al.*, 2007). Ce type d'approche s'avère donc particulièrement utile dans une démarche de bio-indication puisqu'elle témoigne, pour un pesticide donné, du niveau d'exposition préalable des communautés à celui-ci dans le milieu.

La complémentarité entre la caractérisation de la composante autotrophe, par analyse pigmentaire et par analyse de la diversité de la communauté eucaryote (essentiellement composée de microalgues photosynthétiques), d'une part, et la mesure de son niveau de tolérance au diuron, d'autre part, est clairement mise en évidence par les résultats décrits. En effet, si les biofilms prélevés respectivement aux stations amont et intermédiaire sont bien différenciés au printemps, tant au niveau de leur structure que de leur capacité de résistance au diuron, on constate en période hivernal un fort rapprochement des communautés pour ces deux critères. Cela confirme donc le contexte de contamination par les pesticides conditionne fortement la composition du biofilm, en particulier pour sa composante autotrophe, favorisant ainsi les espèces les plus tolérantes au sein du biofilm.

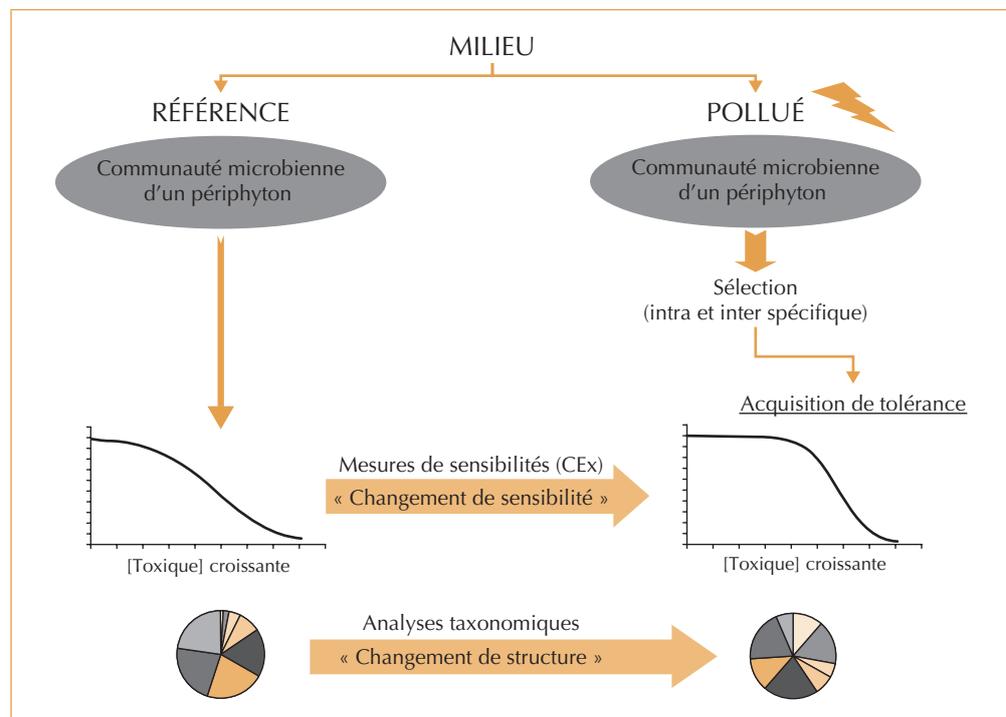
En cas d'exposition prolongée à des polluants organiques, les processus d'adaptation microbienne peuvent également conduire à la stimu-

7. En anglais : *Pollution Induced Community Tolerance*.

## Encadré 4

## Le concept PICT

Le concept PICT ou l'acquisition de tolérance induite proposé par Blanck *et al.*, en 1988, est basé sur le fait qu'une communauté biologique naturelle est constituée de différents « composants » (espèces, souches, clones) ayant des sensibilités variables vis-à-vis d'un toxique donné. L'exposition d'une communauté à ce toxique se traduira par la sélection des organismes les plus tolérants ou la mise en place de mécanismes de détoxification. La communauté résultante présentera alors, dans son ensemble, une tolérance vis-à-vis du toxique supérieure à celle d'une communauté n'ayant pas subi de pression de sélection par ce toxique. Cette différence de tolérance, que l'on peut évaluer *in vitro* par des bio-essais à courte durée en laboratoire et avec des concentrations croissantes en toxique, peut donner une indication sur l'exposition préalable (*in situ*) au toxique des différentes communautés échantillonnées.



▲ Figure 9 – Le concept PICT.

lation des capacités de biodégradation de ces composés. Cette fonctionnalité concerne les micro-organismes hétérotrophes (essentiellement les bactéries et les champignons) capables de dégrader les polluants (totalement ou partiellement) en les utilisant comme source énergétique. Elle a principalement été étudiée jusqu'à présent pour des communautés provenant de sols agricoles. Les résultats obtenus lors du suivi mené sur la Morcille (figure 8) confirment que les communautés hétérotrophes de biofilms aquatiques possèdent également cette capacité d'adaptation

(Pesce *et al.*, 2009). Dans une période majeure de contamination de la Morcille (fin du printemps), le potentiel de biodégradation du diuron (allant jusqu'à la minéralisation totale du composé) par les communautés microbiennes est très élevé en zone aval et quasi nul en amont, et semble donc refléter une adaptation au niveau d'exposition à ce polluant dans le cours d'eau. Ce type d'approche fonctionnelle, ciblée sur les activités hétérotrophes de biodégradation, semble donc particulièrement bien adapté à une démarche de bio-indication.

### Avantages et limites inhérents à l'utilisation des biofilms

De par son rôle écologique et sa sensibilité aux modifications environnementales, l'utilisation du biofilm comme indicateur précoce d'un stress chimique est largement admise par la communauté scientifique (Dorigo *et al.*, 2007 ; Sabater *et al.*, 2007 ; Villeneuve, 2008). Nous avons vu précédemment qu'une des étapes les plus importantes dans une démarche de bio-indication réside dans le choix des descripteurs microbiens considérés. Pour caractériser la réponse microbienne à une pollution aux pesticides, il semble nécessaire de coupler les approches structurales et fonctionnelles (Sabater *et al.*, 2007 ; Villeneuve, 2008), en ciblant des fonctions spécifiques aux molécules étudiées (ex. : activité photosynthétique pour les herbicides inhibiteurs du photosystème II, tels que le diuron). La méthode PICT se révèle donc particulièrement bien adaptée à ce type de démarche et a déjà été utilisée avec succès dans des rivières contaminées par divers pesticides (Dorigo *et al.*, 2004 ; Dorigo *et al.*, 2007 ; Sabater *et al.*, 2007). Elle présente toutefois encore quelques limites puisque les capacités de tolérance microbienne à un pesticide donné peuvent être conditionnées par des facteurs externes (autres que son seul niveau d'exposition à cette molécule), tels que le contexte nutritif ou la présence d'autres pesticides (Sabater *et al.*, 2007) qui peut engendrer des phénomènes de co-tolérance (Blanck *et al.*, 2002). Cette co-tolérance s'observe généralement en présence de molécules ayant des modes d'action comparables envers les communautés microbiennes.

Si elle n'est pas encore très développée en milieu aquatique, l'approche fonctionnelle ciblée sur les activités hétérotrophes de biodégradation des pesticides offre des perspectives prometteuses pour une démarche de bio-indication puisque ces activités sont généralement ciblées sur des molécules ou des groupes de molécules spécifiques. Elle pourrait notamment être enrichie par des mesures *in situ* d'expression de gènes codant des enzymes impliquées dans les mécanismes de dégradation (quand ils sont connus) et des études de diversité pour identifier les organismes impliqués dans ces processus.

Cependant, et quel que soit le type de descripteur utilisé, il est nécessaire d'intégrer dans une approche de type bio-indication, la variabilité naturelle du biofilm et sa sensibilité à l'ensemble des facteurs environnementaux (physiques, chimiques et biologiques) qui agissent en tant que facteurs de confusion dans l'appréciation de la réponse des communautés microbiennes aux pesticides (Dorigo *et al.*, 2009). Cette variabilité naturelle rend également difficile la comparaison inter-sites et la définition d'un état microbien de référence qui pourrait permettre de généraliser et standardiser l'utilisation des biofilms comme bio-indicateurs au sens strict du terme, sans nécessairement nécessiter la comparaison entre des communautés exposées et non exposées dans un même milieu. Il apparaît ainsi nécessaire de multiplier les études visant à hiérarchiser les effets des différents facteurs environnementaux afin d'apprécier leur réel poids dans la réponse microbienne (Villeneuve *et al.*, 2009). D'autre part, plusieurs auteurs ont récemment souligné la nécessité de développer une méthode standardisée pour l'utilisation de biofilms comme bio-indicateurs (Sabater *et al.*, 2007 ; Villeneuve, 2008). Le premier niveau de standardisation devra concerner le mode d'échantillonnage *in situ* (Sabater *et al.*, 2007 ; Dorigo *et al.*, 2009). Le questionnement devra notamment porter sur le choix de la zone de prélèvement, afin d'uniformiser au maximum les caractéristiques physiques (vitesse du courant, éclairage, profondeur...) de la section dont sont issus les différents échantillons à comparer (Dorigo *et al.*, 2009), mais également sur la nécessité ou non d'utiliser des substrats artificiels et la durée optimale de colonisation des biofilms avant analyses (Sabater *et al.*, 2007). Cette problématique a également été soulevée récemment par Morin *et al.* (2007) dans le cadre de l'utilisation des diatomées comme indicateur de qualité des eaux. Les efforts devront également être poursuivis pour améliorer la pertinence des descripteurs biologiques existants et développer de nouvelles méthodologies adaptées afin de tendre également vers une standardisation des méthodes d'analyses du biofilm (Sabater *et al.*, 2007). □

#### Remerciements

Cette synthèse a été réalisée dans le cadre de la coopération ONEMA<sup>8</sup> -Cemagref, Action 26 « Évaluation et remédiation des effets des pesticides ».

8. Office national de l'eau et des milieux aquatiques.

### Résumé

Fixés sur des substrats immergés, les biofilms microbiens assurent un rôle écologique majeur dans les petits cours d'eau. Ils interagissent avec les substances dissoutes et les contaminants (et notamment avec les pesticides) qui peuvent modifier leur structure et leur fonctionnement par des effets directs ou indirects. Les biofilms peuvent être utilisés comme indicateurs biologiques d'une pollution (bio-indicateurs) grâce à une grande variété de descripteurs microbiens, taxonomiques ou fonctionnels. Ils apportent des informations complémentaires aux indices biologiques normalisés mis en œuvre pour évaluer le bon état écologique des masses d'eau, au sens de la directive cadre sur l'eau. À partir de résultats obtenus dans une rivière située en zone viticole, nous proposons ici de discuter dans quelle mesure les biofilms permettent de comprendre l'effet des pesticides sur le fonctionnement des cours d'eau.

### Abstract

Biofilms are attached microbial assemblages on immersed substrates and play a major ecological role in stream ecosystems. Biofilms interact with dissolved substances and contaminants (such as pesticides), which can directly or indirectly affect their structure and functions. A variety of taxonomic and functional microbial indicators exist for considering biofilm as biological indicators of pollution (bio-indicators). They can provide complementary information to normalized biological indices, which are used to assess the ecological status of waters, as defined by the European Water Framework Directive. Synthesizing results obtained in a river draining a vineyard area, we propose here to assess to what extent biofilms can be used to characterize pesticide effects on lotic ecosystems.

### Bibliographie

- AGENCE DE L'EAU RHÔNE-MÉDITERRANÉE & CORSE, 2008, *Pesticides dans les eaux superficielles et souterraines des bassins Rhône-Méditerranée et Corse : Données 2006 et 2007, Document de synthèse*, 20 p.
- BÉRARD, A., DORIGO, U., HUMBERT, J.-F., LÉBOULANGER, C., SEGUIN, F., 2002, La méthode PICT (Pollution-Induced Community Tolerance) appliquée aux communautés algales : intérêt comme outil de diagnose et d'évaluation du risque écotoxicologique en milieu, *Annales de Limnologie*, vol. 38, p. 247-261.
- BIGGS, B.-J.-F., 1996, Patterns in benthic algae of streams, in : *Algal Ecology - Freshwater Benthic Ecosystems*, STEVENSON, R.-J., BOTHWELL, M.-L., LOWE, R.-L., p. 31-56.
- BLANCK, H., WANGBERG, S.-A., MOLANDER, S., 1998, Pollution-induced community tolerance. A new ecotoxicological tool, in : *Functional testing of aquatic biota for estimating hazards of chemicals ASTM STP 988*, CAIRNS, J., PRATT, J.-R., p. 219-230.
- BLANCK, H., 2002, A Critical Review of Procedures and Approaches Used for Assessing Pollution-Induced Community Tolerance (PICT) in Biotic Communities, *Human and Ecological Risk Assessment*, vol. 8, p. 1003-1034.
- COSTE, M., 1982, *Étude des méthodes biologiques d'appréciation quantitative de la qualité des eaux*, Rapport Q.E. Lyon A.F., Bassin Rhône-Méditerranée-Corse, Cemagref, 218 p.
- COSTANZA, R., MAGEAU, M., 1999, What is a healthy ecosystem ?, *Aquatic Ecology*, vol. 33, p. 105-115.
- DORIGO, U., BOURRAIN, X., BÉRARD, A., LÉBOULANGER, C., 2004, Seasonal changes in the sensitivity of river microalgae to atrazine and isoproturon along a contamination gradient, *The Science of the Total Environment*, vol. 318, p. 101-114.

DORIGO, U., LÉBOULANGER, C., BÉRARD, A., BOUCHEZ, A., HUMBERT, J.-F., MONTUELLE, B., 2007, Lotic biofilm community structure and pesticide tolerance along a contamination gradient in a vineyard area, *Aquatic Microbial Ecology*, vol. 50, p. 91-102.

DORIGO, U., LEFRANC, M., LÉBOULANGER, C., MONTUELLE, B., HUMBERT, J.-F., 2009, Influence of sampling strategy on the assessment of the impact of pesticides on periphytic microbial communities in a small river, *FEMS Microbial Ecology*, sous presse.

GOUY, V., NIVON, C., 2007, *Caractérisation et suivi de la qualité des eaux sur le bassin versant de la Morcille sur la période 2001-2006*, Rapport d'étude Cemagref, Chambre d'agriculture du Rhône, 59 p.

INSTITUT FRANÇAIS DE L'ENVIRONNEMENT, 2007, *Les pesticides dans les eaux : données 2005*, www.ifen.fr

MONTUELLE, B., BÉRARD, A., LAGADIC, L., CAQUET, T., 2007, Évaluation de l'impact écologique lié à la présence de pesticides dans les eaux, *Mer et Littoral, Lacs et Cours d'eau*, vol. 73, p. 40-46.

MORIN, S., COSTE, M., DELMAS, F., 2007, Substrats artificiels : dans quelle limite permettent-ils de décrire les peuplements diatomiques des cours d'eau ?, *Ingénieries-EAT*, n° 52, p. 3-12.

MOZES, N., 1995, The ways we study interfacial phenomena of living cells, in : *Adhésion des micro-organismes aux surfaces. Biofilms – Nettoyage – Désinfection*, BELLON-FONTAINE, M.-N., FOURNIAT, J., Paris, Lavoisier Tec & Doc, p. 3-13.

OTHONIEL, C., 2006, *La croissance du biofilm photosynthétique : un indicateur du statut trophique des rivières ?*, thèse de doctorat spécialité Biogéochimie de l'environnement, Université Bordeaux 1, 277 p.

PESCE, S., FAJON, C., BARDOT, C., BONNEMOY, F., PORTELLI, C., BOHATIER, J., 2006, Effects of the phenylurea herbicide diuron on natural riverine microbial communities in an experimental study, *Aquatic Toxicology*, vol. 78, p. 303-314.

PESCE, S., FAJON, C., BARDOT, C., BONNEMOY, F., PORTELLI, C., BOHATIER, J., 2008, Longitudinal changes in microbial planktonic communities of a French river in relation to pesticide and nutrient inputs, *Aquatic Toxicology*, vol. 86, p. 352-360.

PESCE, S., MARTIN-LAURENT, F., ROUARD, N., MONTUELLE, B., 2009, Potential for microbial diuron mineralisation in a small wine-growing watershed : from treated plots to lotic receiver hydrosystem, *Pest Management Science*, sous presse, doi 10.100 ps-1729.

RABIET, M., MARGOUM, C., GOUY, V., CARLUER, N., COQUERY, M., 2008, Transfert des pesticides et métaux dans un petit bassin versant viticole. Étude préliminaire de l'influence des conditions hydrologiques sur le transport de ces contaminants, *Ingénieries-EAT*, numéro spécial Azote, phosphore et pesticides. Stratégies et perspectives de réduction des flux, p. 65-75.

SABATER, S., GUASCH, H., RICART, M., ROMANÍ, A., VIDAL, G., KLÜNDER, C., SCHMITT-JANSEN, M., 2007, Monitoring the effect of chemicals on biological communities. The biofilm as an interface, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 387, p. 1425-1434.

TLLI, A., DORIGO, U., MONTUELLE, B., MARGOUM, C., CARLUER, N., GOUY, V., BOUCHEZ, A., BÉRARD, A., 2008, Responses of chronically contaminated biofilms to short pulses of diuron. An experimental study simulating flooding events in a small river, *Aquatic Toxicology*, vol. 87, p. 252-263.

VILLENEUVE, A., 2008, *Effets conjoints de facteurs physiques (lumière et vitesse du courant) sur la structure et la composition du périphyton : une approche multi-échelles*, thèse de doctorat spécialité Biologie des populations et des écosystèmes, Université de Savoie, 223 p.

VILLENEUVE, A., BOUCHEZ, A., MONTUELLE, B., 2009, Influence of slight differences in environmental conditions (light, hydrodynamics) on the structure and function of the periphyton, *Aquatic Sciences*, sous presse.