



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Thèse présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

Spécialité : Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes

par

**Clément CRENIER**

**Vers une réévaluation des facteurs limitant la  
production biologique dans les cours d'eau de  
tête de bassin versant : nutriments, acides gras  
ou qualité du carbone détritique ?**

le **11 Décembre 2017**, devant le jury composé de :

<b>Mme Virginie BALDY</b>	Professeur, Aix-Marseille Université	Rapporteur
<b>M. Christian DESVILLETES</b>	Professeur, Université Clermont Auvergne	Rapporteur
<b>Mme Elisabeth GROSS</b>	Professeur, Université de Lorraine	Examinateur
<b>M. Éric CHAUVET</b>	Directeur de Recherche CNRS, Ecolab Toulouse	Examinateur
<b>M. François GUEROLD</b>	Professeur, Université de Lorraine	Directeur de thèse
<b>M. Michael DANGER</b>	Maître de Conférences, Université de Lorraine	Co-directeur de thèse







**« Etudiant, voilà bien un titre que  
l'on ne dépose qu'au tombeau. »**  
- Jean Guilton, 1941.

*“Nature is not fragile ... what is fragile are the ecosystems services on which humans depend.”*

*Levin, 1999*



# Remerciements

Nous tenions à adresser notre reconnaissance et nos sincères remerciements à **Virginie Baldy, Elisabeth Gross, Christian Desvillettes** et **Éric Chauvet** pour avoir acceptés de participer à l'évaluation de mes travaux de recherche en prenant part à mon jury de thèse.

Il est d'usage de remercier les personnes ayant rendu possibles ces années de travaux, plus souvent par simple convention ; mais c'est mu par une profonde envie et chargé d'un ressenti peu descriptible que je tiens à remercier mille fois **François Guérold** et **Michael Danger** pour leur confiance, leur patience et leur soutien durant cette thèse. Vous m'avez permis d'exaucer un souhait et de prendre ma revanche sur un conseiller d'orientation de collègue me conseillant plus un travail en usine aux vues de « mon origine sociale » : sans vous rien n'aurait été possible. La *pomme* ne tombe jamais loin de l'arbre et malgré les croyances de certains, cette *pomme* est arrivée assez loin et pour cela, je ne vous remercierais jamais assez. Ce travail n'aurait pas non plus été possible sans le soutien de la Zone Atelier Moselle (ZAM), l'Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques (ONEMA), le Conseil départemental des Vosges et l'Agence de l'eau Rhin-Meuse qui m'ont permis, grâce à diverses aides financières, de me consacrer à l'élaboration d'expérimentations pour enrichir mes travaux de thèse. Un grand merci également envers **Pascale Bauda** et **Fabien Thomas** pour avoir accepté de m'accueillir au sein du LIEC et pouvoir y travailler durant ces 4 années.

Je tiens également à remercier de tout mon cœur **Julio Arce-Funck, Julien Cornut** et **Vincent Felten** pour leur encadrement et soutien tout au long de ces années, toujours dans une ambiance joviale et propice à l'émulation. Vous m'avez énormément apporté, j'ai beaucoup appris et évolué à vos côtés. Grâce à vous tous je sors en « scientifique » grandi et en humain meilleur, merci infiniment pour tout cela, je vous envoie des *besos* et des bisous.

En parlant de soutien, **Etienne Morhain, Philippe Rousselle, Philippe Wagner** (« Je sais où te tu caches ^^ »), **Jonathan Bouquerel, Marie-Andrée Dollard** et **Danièle Pauly** ne sont pas en reste et ont toujours eu une oreille attentive ainsi que du temps précieux à m'accorder pour différentes discussions ou aide technique. Sans vous, beaucoup de choses auraient été impossibles et pour cela je vous en suis extrêmement reconnaissant. Merci également aux autres personnels du laboratoire et de l'université, **Catherine Drui, Maryline Goergen** ainsi que **Rosie** et **Nathalie**. Vous avez toujours été là comme des petites mamans pour me donner un coup de main ou pour nous aider dans toutes nos démarches administratives : sans vous de nombreux « petits détails » seraient encore flous (de nombreux points le sont encore alors gardons contact ^\_^). Une pensée toute particulière à **Nathalie Kleinen** qui dès mon entrée en Master 2 a toujours été là pour ses étudiants, partageant son amour et sa gaieté. Je garderai toujours une de tes petites étincelles pour me rappeler que même si ça ne va pas, le monde est quand même beau ! Un grand merci à tous les étudiants qui m'ont supporté durant l'année 2016-17. C'était ma première fois, j'étais stressé mais ça s'est super bien passé !!!!!!!

Une attention particulière à **Alexandre Bec** et **Fanny Perrière** pour cette semaine et demie sur Clermont-Ferrand qui fut intense mais très enrichissante (en termes scientifiques... parce que j'y ai perdu un ordinateur et j'ai vaincu cette perte avec une pléthore de saucissons et produits locaux... Vil marché de village bucolique du dimanche ^^).

Baltasar Gracian a dit « On juge d'un homme par les amis qu'il a. », et je pense que je n'ai pas à craindre le regard d'autrui aux vues des personnes merveilleuses que j'ai pu rencontrer, côtoyer et avec qui (ou grâce à qui) j'ai pu travailler. Un grand merci à **Alice Gossiaux**, pour avoir été une excellente stagiaire et sans qui certaines parties de ce manuscrit n'auraient pas pu voir le jour (que ton parcours et ta thèse soient à ton image, vrais, et couronnés de succès), **Edwige**

**Gautreau** (une excellente formatrice SIG), **Marie Spitoni** et **Maxime Fouillet** (qui ont fourni d'excellents rapports après d'encore meilleurs stages), **Nicolas Abar** (mon petit poussin), **Morgane Papin** (« Aououououh !!! », t'as vu je le fais bien hein ^^). Merci à mes colocataires de bureau, **Pierre Lucisine** (« mon bon gârs sûr »), **Carole Bertrand** et **Jennifer Andreï** (je pense toujours à vous dès que je lève les yeux de mon bureau), **Veronica Gonzalez** (Bring us back the sun !!!), **Kevin Sanchez-Thirion** (à notre amour de la lecture et de l'imaginaire), **Marine Potet** (Maricroc the « Duckdadess » qui a fait de moi un Crocier assumé), **Vincent Baillard** (« The Gunner MAN »), **Jérémy Jabiol**, **Fanny Louis** (merci pour tes passages à Schengen et ta bonhomie, bon courage à Reims et pense à nous inviter pour un godet), **Dan Coacolo** (fier d'avoir été un indice de topage très cher) et il serait sectaire d'oublier nos autres compagnons du P7 avec qui nous avons partagé des pauses cafés, des déboires de manips ainsi que d'autres événements que nous garderons pour nous, **Joey Allen**, **Maël Garaud & Faustine Charmasson** (en espérant que l'Ardèche vous sied), **Hilary Collet**, **Quentin Bachelet** (prochain trip c'est la Hongrie Mamène !), **Clément Bojic** (mon homonyme), **Bénédicte Sohm** (ma petite mamie préférée !), **Vanessa Koehle-Divo** (que tes avocats puissent être prolifiques), **Enora Leborgne** (bisous aux chats !), **Justine Flayac** (bisous à Lasagne.... Bon Kelami d'accord !), **Muriel Barbier**, **Romain Péden**, ainsi que les pauvres malheureux du P8, **Andréina Nuttens** (ma petite bretonne préférée, je regrette déjà nos co-voiturages bras croisés et te remercie encore pour le temps accordé à la relecture de ma piteuse grammaire ^^), **Emilie Perrat** (merci pour ta cuisine, le covoit', le soutien pré-rendu et tes bons mots), **Imad Aharchaou** (... « Non, rien... » T'es toujours un peu « ... » mais je t'aime toujours !), **Anne Vicente** (*CŒUR* !!!!! merci encore pour le ... « sentiment » numérique ^^), **Stéphane Jomini** (grâce à qui je peux dormir sur un vrai matelas tous les soirs), **Eva**, **Mégane** et **Marc Rollin** (il faut encore que je m'entraîne avec ton bâton... du diable hein !). Et également les derniers arrivant pendant cette dernière phase de correction, **Ziming Wang**, **Perrine Florent**, **Cyrielle Bonne**, **Chloé Oligier** (d'enfer vos gâteaux les filles !!!), **Yoann Ménard**, **Mehdi** et **Rodrigue** !

Un grand merci (avec des yeux de chat botté) à toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance de collaborer ou que j'ai simplement croisées durant mes années de thèse, qui ont pris le temps de m'accueillir, de me former à différentes technique, de parler science ou de simplement me parler comme **Florence Maunoury-Danger** (je te rends ton époux, je ne l'embêterai plus... normalement ^^), **Sandrine** « La Paiiiiiiiiiince » **Pain-Devin**, **Simon Devin** (une boîte de gélatine sucrée te sera fournie incessamment sous peu pour te montrer ma gratitude pour toute ton aide), **Elise Billoir** (des bisous à **Pilipe** et au petit **Ulysse**), **Romain Coulaud** (j'espère que tout se passe bien pour toi et toute la petite famille dans *mon pays*), **Floriane Larras** (ma partenaire « Move like Britney »), **Albin Meyer** (la « meyeur » patate du monde, avec du gruyère alsacien, 30min à thermostat 7), **Vincent Robin**, **Carole Cossu-Leguille**, **Marie Le Jean**, **Marie-Christine Peltre**, **Christophe Pagnout**, **Pascal Poupin**, **Nelly Brûlé** ainsi que tous ceux que j'aurais pu oublier de citer (pardonnez-moi mais 4 ans, en fin de thèse... il peut y avoir des effets irréversibles... qui se rajoutent aux précédents... c'est significativement prouvé,  $p < 0.0000000001$ ). Merci à ceux qui furent présents et qui m'ont soutenu de J-7 à J0... les événements qui se sont produits n'étaient pas tous prévus mais même si je gère tout seul, votre soutien sans devenir larmoyant a été d'un grand secours.

Plusieurs diront que cela est superflu, mais ceux qui connaissent mon goût pour les belles histoires bien racontées lèveront les yeux au ciel mais comprendront. Je tenais à remercier dans ce manuscrit tous les enseignants qui par leur travail de longue haleine au sein des « pires classes que je n'ai jamais eu » m'ont instruit et permis de m'élever et de me forger en tant que futur scientifique. Un grand merci aux enseignants de l'école primaire Marie Curie (une pensée particulière à **Mr Marmol**), du Collège Boris Vian de *Mézidon-Canon*, du Lycée Agricole Le Robillard

de Lieury, du Lycée Malherbe (Section BCPST) de Caen ainsi que ceux de la Faculté des Sciences de Basse-Normandie, de l'Université de Rennes 1 et bien sûr de l'Université de Lorraine. J'ai toujours fait ce que j'avais envie de faire pour mon cursus et vous m'avez doucement accompagné jusqu'à ce jour précis. Un merci et une pensée également à tous mes **compagnons d'infortunes** durant toutes ces années, merci pour les TP de groupes et les soirées bars... et le reste... chhhuuuuuuuuutttt.....

Et comme les derniers seront les premiers (Matthieu 20:16 & Céline Dion, donc c'est forcément vrai ...), j'ai une pensée pleine d'amour pour tous mes amis Normands : les Biologistes survivants de la Licence caennaise (**Janoute, McLeod, Bastoof, Yoyo, Lufie, RomanV\*\*\*\*, Lydie, Lorraine, Manu...**), **Reddy Lemeur, mon Lapin, Maxoubidou, Chinois, Céxcile, Nikoul22, Yseult-Marie, Lulu, Aurélie, Pavich**, les Rennais : **Jérèm, Joss, Mr Cuny...**, pour mes grands-parents, **Pépère** et **Papi**, des durs à cuire au cœur tendre qui ont été des exemples à suivre pour devenir l'homme respectable que j'espère devenir un jour, celle qui reste encore debout parce que c'est la plus solide (Big up **Mémère** !) et pour **Mamie** : tu m'as hébergé, nourri pendant mes études et tu m'as aussi appris en étant parfois un peu une vieille carne qu'on peut toujours avoir un cœur tendre et que si l'on travaille dur, on aura toujours ce dont on a besoin et ce que l'on mérite, tu n'es peut-être plus, mais sans toi, rien de tout cela n'aurait été.... A tout cela se rajoute un chargement de 35T d'amour pour mes parents : **Patrick** et **Viviane** pour avoir toujours cru en moi et m'avoir guidé à devenir l'humain que je suis aujourd'hui (une bonne *pomme* ne peut être que le *fruit* d'un *arbre* encore meilleur). Même si vous avez de moins en moins compris mes cours puis travaux de recherche, vous m'avez laissé vaquer à mes envies (capillaires et barbares également) et avez toujours été présents pour le moindre *pépin* (ça tourne beaucoup trop autour de la *pomme* c't'histoire ^^). Merci encore et des bisous plus généralement à toute ma famille dont il serait un blasphème de ne pas citer les deux plus merveilleuses, **Nadège** : ma petite grande sœur, avec ses marmots **Lucas, Léo, Lola** et **Titi** (des bisous^^). C'est grâce à toi que j'ai eu le goût de la lecture si tôt et que j'ai découvert tant de choses par la suite, merci pour tous ces soirs où tu t'entraînais à me lire des livres « que ça faisait trop peur et que j'avais pas le droit parce que toi t'es au collège alors que je suis que à la primaire j'ai tout lu les leurs... » ^^) et **Bérengère** « La P\*\*\*\*\*lus merveilleuse des petites sœurs », j'espère que j'ai été et que je continuerai à être un bon frère, « *Pas forcément celui que la ville mérite, mais celui dont elle a besoin* », tu vas finir par réussir ce que tu entreprends j'en suis convaincu et suis fier de toi. N'oublie jamais, peu importe l'heure, la saison, l'endroit, le continent, je suis toujours là pour toi !

**Je vous aime tous....**

Et rappelez-vous bien d'une chose, un Crenier ça a peut-être une tête de cochon coiffé comme un hérisson et une couche de gras de phoque MAIS ça a un cœur gros et fidèle comme un éléphant qui n'oublie pas ses amis. Ceci est donc loin d'être un au revoir...

Sur ce et comme dirait tout bon scientifique :

« *Un dernier petit calcul et on s'en va !* »





# valorisation scientifique

## Article à comité de lecture :

### Acceptés :

**Crenier C.**, Arce-Funck J., Bec A., Billoir E., Perrière F., Leflaive J., Guérold F., Felten V. & Danger M. (2017). Minor food sources can be major drivers of secondary production in detritus-based ecosystems. *Freshwater Biology* **62**, 1155–1167.

Arce-Funck J., **Crenier C.**, Danger M., Cossu-Leguille C., Guérold F., & Felten V. (2016) Stoichiometric constraints modulate impacts of silver contamination on stream detritivores: an experimental test with *Gammarus fossarum*. *Freshwater Biology* **61**, 2075–2089.

### Soumis :

Arce-Funck J., **Crenier C.**, Danger M., Billoir E., Usseglio-Polatera P. & Felten High stoichiometric food quality increases moulting organism vulnerability to contaminant impacts: an experimental test with *Gammarus fossarum* (Crustacea: Amphipoda). *Aquatic Toxicology*

### Manuscrit en redaction :

Sanchez-Thirion K\*, **Crenier C.\***, Bec A., Felten V., Ferriol J., Gonzalez A., Leflaive J., Perrière F., Ten Hage L., Danger M. Interactive impacts of silver and phosphorus on autotrophic biofilm elemental and biochemical quality for a macroinvertebrate consumer. Soumission prévue Novembre 2017 à *Aquatic Toxicology*. \* les deux auteurs ont contribué à part équivalente dans la rédaction de ce manuscrit.

### Communications orale :

**Danger M.**, Arce Funck J., Bec A., Coulaud R., **Crenier C.**, Rollin M., Sanchez-Thirion K. & Felten V. (2016) Towards a better understanding of the importance of benthic algae in the functioning of forested headwater streams. JILO 2016, 27-29 Septembre, St Malo (France).

**Crenier C.**, Cornut J., Wagner P., Rousselle P., Maunoury-Danger F., Felten V., Colas F., Devin S., Danger M. & Guérold F. Les activités éco-enzymatiques comme indicateur d'état de santé des cours d'eau de tête de bassin versant Lorrain ? Journées Scientifique Zone Atelier Moselle, 10 et 11 Mai 2016, Nancy (France).

**Crenier C.**, Arce Funck J., Bec A., Felten V., Guérold F., Leflaive J., Perrière F. & Danger M. Benthic algae ensure the survival and growth of a detritivorous invertebrate in detritus-based headwater streams. 9th Symposium of European Freshwater Sciences (SEFS), 5-10 Juillet 2015, Genève (Suisse).

**Crenier C.**, Danger M. & Guérol F. Vers une réévaluation des facteurs limitant la production biologique dans les écosystèmes aquatiques basés sur les détritiques : nutriments, acides gras ou qualité du carbone détritique ? Journées Scientifique ZAM, 23 et 24 Juin 2014.

### **Communication affichée :**

Arce Funck J., **Crenier C.**, Danger M., Cossu-Leguille C., Xuereb B., Devin S., Guérol F., Felten V. & Sohm B. Effects of nutritional stress on the freshwater detritivore, *Gammarus fossarum*: looking at the molecular level. SETAC Europe 25<sup>th</sup> Annual Meeting, 3-7 Mai 2015, Barcelone (Espagne).

**Crenier C.**, Arce Funck J., Felten V., Bec A., Perrière F. & Danger M. Pivotal role of benthic algae in the survival and growth of a detritivorous invertebrate in detritus-based streams. Congrès BES-SFE, 9-12 Décembre 2014, Lille (France).

**Crenier C.**, Arce Funck J., Felten V., Devin S., Héberlé J. & Danger M. Effects of phosphorus content in detritus on life-history traits, behavior and physiology of a headwater stream detritivore. 8th Symposium of European Freshwater Sciences (SEFS) Congrès d'Ecophysiologie Animale (CEPA), 7-9 Novembre 2013, Lyon (France).

**Crenier C.**, Arce Funck J., Felten V., Devin S., Héberlé J. & Danger M. Effects of phosphorus content in detritus on life-history traits, behavior and physiology of a headwater stream detritivore. 8th Symposium of European Freshwater Sciences (SEFS), 1-5 Juillet 2013, Münster (Allemagne).

## Table des Matières

<b>Abréviations .....</b>	<b>7</b>
<b>Liste des Tableaux.....</b>	<b>9</b>
<b>Liste des Figures .....</b>	<b>11</b>
<b>Liste des Annexes .....</b>	<b>15</b>
<b>Chapitre I : Introduction et synthèse bibliographique.....</b>	<b>17</b>
I. Introduction.....	19
II. Cours d'eau de tête de bassin versant : de quoi parle-t-on ?.....	21
III. La ressource au sein des cours d'eau de tête de bassin versant.....	23
III.1. Quantité et qualité de la ressource.....	24
III.2. Qualité stœchiométrique des ressources alimentaires.....	24
III.3. Qualité biochimique.....	27
III.3.a. Les lipides .....	27
III.3.b. Acides gras .....	27
IV. Les acteurs de la chaîne trophique et du fonctionnement des têtes de bassin versant.	31
IV.1. Décomposeurs.....	32
IV.1.a. Hyphomycètes aquatiques.....	32
IV.1.b. Bactéries.....	37
IV.2. Producteurs primaires.....	39
IV.2.a. Qualité de la ressource autochtone .....	41
IV.3. Consommateurs .....	43
IV.3.a. Détritivores.....	43
IV.3.b. <i>Gammaridae</i> .....	44

V. Problématique .....	46
<b>Chapitre II : Influence et rôles des nutriments sur le processus de décomposition dans les cours d'eau de tête de bassin versant. ....</b>	<b>49</b>
<b>Partie I. Vers une restauration spontanée des cours d'eau acidifiés ? : Étude diachronique (1998-2015) dans des cours d'eau de tête de bassin versant des Vosges (Nord-Est, France).....</b>	<b>51</b>
I. Introduction .....	51
II. Méthodes .....	54
II.1. Sites d'études.....	54
II.2. Chimie de l'eau .....	58
II.3. Décomposition de la litière .....	58
II.4. Données 1998-99 utilisées dans la présente étude .....	59
II.5. Détermination des taux de décomposition .....	59
II.6. Analyse des données.....	59
III. Résultats .....	60
III.1. Paramètres physico-chimiques .....	60
III.1.a. Comparaison des moyennes.....	60
III.1.b. Analyses en composante principale.....	63
III.2. Décomposition des litières .....	66
IV. Discussion .....	68
<b>Partie 2. Effets de la disponibilité en azote et phosphore sur le processus de décomposition de la litière dans les cours d'eau de tête de bassin versant (Nord-est, France).....</b>	<b>73</b>
I. Introduction. ....	73
II. Matériel et méthodes.....	77
II.1. Sélection des Sites/Bassins versant. ....	77
II.1.a. Sélection géographique. ....	77

II.1.b. Sélection chimique. ....	78
II.2. Chimie de l'eau et analyse de températures. ....	78
II.3. Expérimentation de la décomposition des litières de feuilles. ....	82
II.3.a. Collecte des litières et protocole expérimental. ....	82
II.3.b. Décomposition de la litière. ....	82
II.4. Contenu en Carbone, Azote et Phosphore. ....	82
II.5. Analyses enzymatiques. ....	83
II.6. Analyses statistiques.....	83
III. Résultats. ....	84
III.1. Gradients agricole, $\text{NO}_3^-$ et $\text{PO}_4^{3-}$ . ....	84
III.2. Taux de décomposition de la litière en fonction du gradient de nutriments $\text{NO}_3^-$ et $\text{PO}_4^{3-}$ . ....	84
III.3. Activités enzymatiques potentielles en fonction des gradients de nutriments $\text{NO}_3^-$ et $\text{PO}_4^{3-}$ . ....	86
III.4. Contenus en carbone, azote et phosphore de la litière en fonction des concentrations en $\text{NO}_3^-$ et $\text{PO}_4^{3-}$ . ....	89
III.5. Taux de décomposition des litières en fonction des activités enzymatiques potentielles.....	90
III.6. Contenus en Carbone, Azote et Phosphore de la litière en fonction des activités enzymatiques potentielles.....	90
IV. Discussion .....	92
 <b>Chapitre III : Les Acides Gras Essentiels comme élément limitant dans les cours d'eau de tête de bassin versant Vosgiens. ....</b>	<b>97</b>
<b>Partie 1. Présence et réponse des producteurs primaires le long d'un gradient d'acidification (Nord-est, Vosges) .....</b>	<b>99</b>
I. Introduction .....	99
II. Méthode .....	102
II.1. Sites d'études et dispositifs .....	102
II.2. Chimie de l'eau .....	103

II.3. Mesure des concentrations en chlorophylle <i>a</i> par sonde fluorométrique .....	103
II.4. Mesure des biomasses .....	105
II.5. Dosage CNP .....	105
II.6. Dosage et identification des acides gras .....	105
II.7. Analyse des données .....	105
III. Résultats .....	106
III.1. Caractéristiques physico-chimiques des cours d'eau .....	106
III.2. Chlorophylle <i>a</i> et biomasse .....	108
III.3. CNP .....	110
III.4. Dosage Acides gras .....	112
IV. Discussion .....	115
<b>Partie 2) Impact des ressources mineures dans la production secondaire d'écosystèmes basés sur les détrit.</b> .....	<b>119</b>
<b>Chapitre IV : Synthèse des résultats et Perspectives</b> .....	<b>135</b>
I. Nutriments et qualité stœchiométrique .....	138
I.1. Réponses à l'acidification .....	138
I.2. Réponses à l'occupation du sol .....	139
I.3. Vers une meilleure compréhension des limitations minérales dans les cours d'eau. .....	140
I.3.a. Les cours d'eau de tête de bassin versant sont-ils limités par le N ou le P ? ...	140
I.3.b. Cas des excès de N et/ou de P .....	142
II. Acides gras essentiels et qualité biochimique .....	143
II.1. Présence dans les cours d'eau de tête de bassin versant .....	143
II.2. Réponse de la production secondaire .....	144
II.3. Vers une extrapolation aux transferts vers les niveaux trophiques supérieurs .....	145
III. Interactions .....	146
III.1. Phosphore, Acides gras et contaminations métalliques .....	147

III.2. Nutriments-Xénobiotiques .....	148
III.3. Biofilms .....	149
IV. Perspectives .....	150
<b>Références Bibliographiques</b> .....	<b>153</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>179</b>



## Abréviations

<b>Ag</b> .....	Argent
<b>AG (FA)</b> .....	Acide gras
<b>AGE (EFA)</b> .....	Acides gras essentiel
<b>AGMI (MUFA)</b> ...	Acide gras monoinsaturés
<b>AGPI (PUFA)</b> ...	Acides gras polyinsaturés
<b>AGS (SAFA)</b> ....	Acide gras saturés
<b>AGSR (BCFA)</b> ..	Acides gras saturés à chaîne ramifiée
<b>Al</b> .....	Aluminium
<b>ANC</b> .....	Alcalinité (Acid neutralizing capacity)
<b>AP</b> .....	Phosphatase acide
<b>ARA</b> .....	Acide arachidonique
<b>BG</b> .....	Beta-glucosidase
<b>C</b> .....	Carbone
<b>CBH</b> .....	Cellobio-hydrolase
<b>CPOM</b> .....	Matière organique particulaire grossière
<b>DHA</b> .....	Acide docosahexaénoïque
<b>DIN</b> .....	Azote Inorganique Dissous
<b>EPA</b> .....	Acide eicosapentaénoïque
<b>FM</b> .....	Fine maille (sacs à litière)
<b>FPOM</b> .....	Matière organique particulaire fine
<b>GM</b> .....	Grosse maille (sacs à litière)
<b>LN</b> .....	Lipides neutres
<b>LP</b> .....	Lipides polaires
<b>MSSC (AFDM)</b> ...	Masse sèche sans cendres
<b>N</b> .....	Azote
<b>NAG</b> .....	N-acetyl glucosaminidase
<b>P</b> .....	Phosphore
<b>P/R</b> .....	Ratio production primaire brute / respiration
<b>pNP</b> .....	p-nitrophénol
<b>SRP</b> .....	Phosphore Réactif Soluble
<b>UDOM</b> .....	Matière Organique Dissoutes Utilisables



## Liste des Tableaux

- **Chapitre I :** Introduction et synthèse bibliographique

**Tableau 1 :** Composition en Acide Gras des différents taxa de producteurs primaires retrouvés classiquement dans les écosystèmes aquatiques d'eau douce. Adapté de Koussoroplis (2010).  
.....42

- **Chapitre II :** Influence et rôles des nutriments sur le processus de décomposition dans les cours d'eau de tête de bassin versant.
- **Ch II-Partie I.** Vers une restauration spontanée des cours d'eau acidifiés ? : étude diachronique (1998-2015) dans des cours d'eau de tête de bassin versant des Vosges (Nord-Est, France).

**Tableau 2 :** Caractéristiques des sites d'après Dangles et al. (2004).....57

**Tableau 3 :** Principales caractéristiques (moyenne  $\pm$  écart-type) physico-chimiques des sites d'études en 1998-99 et 2014-15. ....61

**Tableau 4 :** Résultats et p-values des tests t non-appariés comparant les données physico-chimiques moyennes entre les 2 périodes d'étude. p-value significatives en gras.. ....63

**Tableau 5 :** Tests t comparant les coordonnées sur les axes F1 et F2 de l'ACP en analyse intra-classe effectuée sur les données physico-chimiques des deux périodes. p-value significatives en gras.....65

**Tableau 6 :** Tableau des corrélations de Spearman (les valeurs de rho et la significativité y sont reportés) entre les taux de décomposition de la litière et les paramètres chimiques des années correspondantes. p-value significatives en gras.. ....68

- **Ch II-Partie 2.** Effets de la disponibilité en azote et phosphore sur le processus de décomposition de la litière dans les cours d'eau de tête de bassin versant (Nord-est, France)

**Tableau 7 :** Coordonnées et caractéristiques chimiques principales des 27 sites étudiés rangés numériquement par rapport au gradient de  $\text{NO}_3^-$ . Les moyennes (n=7) sont reportées avec leur écart-types. ....81

**Tableau 8 :** Corrélations de rang de Spearman les concentrations en  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{PO}_4^{3-}$ (en  $\text{mg.L}^{-1}$ ) et (a) le taux de décomposition des litières (Degré Jour<sup>-1</sup>); (b) les activités enzymatiques potentielles de la  $\beta$ -1,4-glucosidase (BG), 4- $\beta$ -D-glucancellobiohydrolase (CBH),  $\beta$ -4-N-acetylglucosaminidase (NAG), phosphatase acide (AP) ( $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{gDOM}^{-1}$ ); (c) le pourcentage

d'azote (N) et de phosphore (P) dans les litières. Les caractères en gras indiquent une corrélation significative  $p < 0,05$  ( $n=27$ ). ..... 86

**Tableau 9** : Corrélations de rang de Spearman entre les activités enzymatique potentielles de la  $\beta$ -1,4-glucosidase (BG), 4- $\beta$ -D-glucancellobiohydrolase (CBH),  $\beta$ -4-N-acetylglucosaminidase (NAG), phosphatase acide (AP) ( $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{gMS}^{-1}$ ) et **(a)** le taux de décomposition de la litière en sac fine maille (Degré Jour<sup>-1</sup>); **(b)** le pourcentage d'azote (N) et de phosphore (P) dans les litières. Les caractères en gras indiquent une corrélation significative à  $p < 0,05$  ( $n=27$ ). ..... 90

- **Chapitre III** : Les Acides Gras Essentiels comme élément limitant dans les cours d'eau de tête de bassin versant Vosgiens
- **Ch III-Partie 1**. Présence et réponse des producteurs primaires le long d'un gradient d'acidification (Nord-est, Vosges)

**Tableau 10** : Caractéristiques géomorphologique des sites d'études. .... 104

**Tableau 11** : Paramètres chimiques des sites d'études. .... 107

**Tableau 12** : Moyenne  $\pm$  écart-type des données mesurées ainsi que des pesées de la biomasse ( $\text{mg MS cm}^{-2}$ ) obtenue sur les plaquettes après 2 mois *in situ* ( $n=104$ ) ..... 109

**Tableau 13** : Composition élémentaire (pourcentage de CNP) des biofilms phototrophes et ratios massiques. .... 110

**Tableau 14** : Coefficients des régressions linéaires significatives préliminaires entre la composition élémentaire et lipidique des biofilms phototrophes et les valeurs de pH et concentrations en Aluminium. .... 111

**Tableau 15** : Composition lipidique des différents biofilms phototrophes (% de masse sèche). (SAFA, MUFA et PUFA correspondent aux sommes respectives des pourcentages d'acides gras saturés, mono-saturés et polyinsaturés. .... 113

- **Ch III-Partie 2**. Impact des ressources mineures dans la production secondaire d'écosystèmes basés sur les détritrus

**Tableau 1bis** : Fatty acid composition (wt. %) of the three resource types, field-collected juveniles of gammarids (T0 Juveniles), and the same gammarids fed up to five weeks with the different food. .... 129

## Liste des Figures

- **Chapitre I :** Introduction et synthèse bibliographique

- Figure 1 :** Relation proposée entre la taille des cours d'eau et la modification progressive dans la structure et les attributs fonctionnels des communautés lotiques. Synthèse du River Continuum Concept ([Vannote et al., 1980](#)).....22
- Figure 2 :** Ratios P/R et CPOM/FPOM (matière organique particulaire grossière/fine) des cours d'eau selon leur ordre de Strahler . La ligne en pointillé rouge représente la zone de passage entre un système autotrophe et hétérotrophe. Adapté de [Vannote et al., \(1980\)](#).....23
- Figure 3 :** Structure de classes importantes de lipides présents dans les écosystèmes aquatiques. ST: stérols, représentés par le cholestérol, TAG: triglycérides, représentés par le tripalmitine, GL: glycolipides, représentés par le digalactosyldiacylglycérol, PL: phospholipides, représentés par le phosphatidylcholine ([Parrish, 1998](#)).....28
- Figure 4 :** Structures de certains acides gras polyinsaturés (AGPI) à longue chaîne. L'acide eicosapentaénoïque (20 : 5n-3), acide docosapentaénoïque (22 : 5n-3) et l'acide docosahexaénoïque (22 : 6n-3) sont tous liés au niveau biochimique en raison de l'emplacement de la première double liaison à l'extrémité méthyle de la chaîne (n-3). Les numéros sur la chaîne carbonée de l'acide eicosapentaénoïque représentent la numérotation classique des carbones lors de la description des AG. Adapté de [Parrish \(1998\)](#).....29
- Figure 5 :** Représentation schématique de la connectivité d'un bassin versant. Les groupes de flèches indiquent la force attendue des interactions entre les échanges verticaux (lit du cours d'eau-eau de surface), latéraux (lit-plaines alluviales) et longitudinaux (amont-aval). Les assemblages des taxa du biota peuvent se répartir dans les trois dimensions spatiales, y compris la zone riparienne (terrestre adjacente), benthique (fond du cours d'eau), hyporhéique (eaux interstitielles du sédiment) et phréatique (eaux souterraines profondes) en plus des poissons (pélagique) et autres organismes de la colonne d'eau. Adapté de [Stanford \(2006\)](#)..31
- Figure 6 :** Réseau trophique détritique : la décomposition débute par la chute de feuilles dans le cours d'eau. Sous l'action des décomposeurs (microorganismes) et déchiqueteurs (invertébrés) la décomposition libère du CO<sub>2</sub>, ainsi que des matières organiques particulaires (MOP) et dissoutes (MOD) qui seront utilisées directement ou indirectement par les différents types d'organisme du réseau trophique détritique. D'après [Chauvet & Guérol \(2015\)](#). .....32
- Figure 7 :** Un exemple non-exhaustif des différentes formes de conidies d'hyphomycètes aquatiques. 1. *Tricellula aquatic*, 2. *Ypsilina graminea*, 3. *Lateriramulosauniinflata*, 4a. *Taeniospora gracilis* var. *enecta*, 4b. *Taeniospora gracilis* var. *gracilis*, 5. *Dendrospora erecta*,

6. *Dendrosporatenella*, 7. *Varicosporium elodeae*, 8. *Varicosporium delicatum*, 9. *Pleuropedium tricladioides*, 10. *Pleuropedium multiseptatum*. Echelle : A (Figs. 1-4) = 25 pm, B (Figs.5-6) = 50 pm, C (Figs. 7-10) = 50 pm (Gulis, Marvanová & Descals, 2004).....34

**Figure 8** : Résumé de la prise en charge de la litière dans les cours d'eau de tête de bassin versant lors du processus de décomposition (Petersen & Cummins, 1974). Les durées de conditionnement peuvent varier suivant l'essence des litières, la composition de la litière ainsi que de sa potentielle pré-colonisation par des souches microbiennes terrestre.....37

**Figure 9** : Dynamique des biomasses fongiques et bactériennes associées à la litière en décomposition (Garonne), d'après Baldy et al. (1995).....39

- **Chapitre II** : Influence et rôles des nutriments sur le processus de décomposition dans les cours d'eau de tête de bassin versant.
- **Ch II-Partie I**. Vers une restauration spontanée des cours d'eau acidifiés ? : étude diachronique (1998-2015) dans des cours d'eau de tête de bassin versant des Vosges (Nord-Est, France).

**Figure 10** : Evolution des émissions de NO<sub>x</sub>, -SO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> et de particules en France métropolitaine (Ministère de la transition écologique et solidaire, 2017).....52

**Figure 11** : Localisation des 25 sites d'études Vosgiens (Nord-Est de la France). D'après Dangles et al. (2004).....56

**Figure 12** : Exemple de mise en place du dispositif de sacs GM. ....59

**Figure 13** : Comparaison des données moyennes des principaux paramètres physico-chimiques entre les deux périodes.....62

**Figure 14** : Analyse en composante principale effectuée sur les données de 1998-99 (A) et de 2014-15 (B). Les sites sur substratum granitique sont représentés en bleu et les sites sur substratum gréseux en vert. La teinte foncée de chaque couleur correspond aux sites acidifiés en 1998-99 et la teinte claire aux sites non acidifiés en 1998-99.....64

**Figure 15** : Analyse en composante principale intra-classe effectuée sur les données regroupées de 1998-99 (représentées en vert) et 2014-15 (en bleu). ....65

**Figure 16** : Comparaison des taux de décomposition entre les données de 1998-99 et 2014-15. Les sites sur granite sont représentés en bleu et les sites sur grès en vert. Les ronds pleins de chaque couleur correspondent aux sites acides en 1998-99 (pH entre 0 et 6,5 unités pH) et les ronds vides aux sites proches de la neutralité en 1998-99 (supérieurs à 6,5 unités pH). ....67

**Figure 17** : Box-plot (médiane, 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> quartiles) des taux de décomposition dans les cours d'eau acides (AC) et non acides (NAC) en 1998-99 et 2014-15. Les moyennes sont figurées par

des losanges noirs. Des lettrines différentes indiquent des différences significatives (ANOVA de Kruskal-Wallis et test post-hoc de Dunn). .....67

- **Ch II-Partie 2.** Effets de la disponibilité en azote et phosphore sur le processus de décomposition de la litière dans les cours d'eau de tête de bassin versant (Nord-est, France)

**Figure 18 :** Location des sites étudiés en Lorraine, Nord-Est de la France. Le gradient coloré va des plus faibles aux plus fortes concentrations des concentrations moyennes en Nitrates mesurées sur les sites durant l'expérimentation. ....79

**Figure 19 :** Occupation des sols des sites par les 6 items identifiés (Forêts, Milieux arbustifs-herbacés, Prairies, Zones agricoles hétérogènes, Terres arables-cultures permanentes et Zones urbanisés). ....80

**Figure 20 :** Corrélations entre le pourcentage de surface agricole (somme des pourcentages "Terre arable et cultures permanentes" et "Zones agricoles hétérogènes") et les concentrations des eaux en  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  (respectivement en  $\text{mg.L}^{-1}$  et  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) et corrélation entre les concentrations en  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  (respectivement en  $\text{mg.L}^{-1}$  et  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). ....85

**Figure 21 :** Relations entre les taux de décomposition (Degré Jour<sup>-1</sup>) des litières d'aulne et les concentrations en  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $\text{mg.L}^{-1}$ ). Les corrélations de rang de Spearman indiquent des relations significatives au seuil de 5% (n=27). ....87

**Figure 22 :** Relations entre activités enzymatiques potentielles :  $\beta$ -1,4-glucosidase (BG), 4- $\beta$ -D-glucan cellobiohydrolase (CBH),  $\beta$ -4-N-acetylglucosaminidase (NAG), phosphatase acide (AP) ( $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{gMS}^{-1}$ ) et concentrations en nutriments ( $\text{NO}_3^-$  en  $\text{mg.L}^{-1}$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  en  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). ....88

**Figure 23 :** Corrélations entre le pourcentage d'azote (N) et de phosphore (P) dans les litières à la fin de l'expérimentation en fonction de la concentration des eaux en  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). ....89

**Figure 24 :** Relation entre le taux de décomposition des sacs fine maille (degré jour<sup>-1</sup>) en fonction de l'activité enzymatique potentielle de la  $\beta$ -1,4-glucosidase (BG) ( $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{gMS}^{-1}$ ). ..91

**Figure 25 :** Relations entre le pourcentage d'azote (N) et de phosphore (P) dans les litières à la fin de l'expérimentation (42j) et les activités enzymatiques potentielles de la  $\beta$ -1,4-glucosidase (BG) et de la 4- $\beta$ -D-glucancellobiohydrolase (CBH) ( $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{g MS}^{-1}$ ). ....91

- **Chapitre III :** Les Acides Gras Essentiels comme élément limitant dans les cours d'eau de tête de bassin versant Vosgiens
- **Ch III-Partie 1.** Présence et réponse des producteurs primaires le long d'un gradient d'acidification (Nord-est, Vosges)

<b>Figure 26</b> : Corrélation de Spearman entre le pH et les concentrations en aluminium..	108
<b>Figure 27</b> : Somme des résultats mesurés à la sonde fluorométrique le long du gradient décroissant d'acidité.	109
<b>Figure 28</b> : Régressions linéaires significatives entre la composition élémentaire et lipidique des biofilms phototrophes et le pH.	112
<b>Figure 29</b> : Régressions linéaires significatives entre la composition élémentaire, lipidique des biofilms phototrophes et l'aluminium ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ).	114
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Ch III-Partie 2.</b> Impact des ressources mineures dans la production secondaire d'écosystèmes basés sur les détritux</li> </ul>	
<b>Figure 1bis</b> : Experimental design used to assess the effects of different food resources on <i>Gammarus fossarum</i> juveniles and a picture of the agarose pellets (AL treatment is shown).	125
<b>Figure 2bis</b> : Consumption rates of the different food resources by gammarids.	127
<b>Figure 3bis</b> : Survival proportion (A) and mass growth rates (B) of gammarids fed with the different food items throughout the experiment.	128
<b>Figure 4bis</b> : Results of the correspondence analysis (A) conducted on the fatty acid profiles (in percentages) of resources (L: Leaf litter, H: Mycelium of aquatic hyphomycetes, and D: Diatoms) and gammarids. (B) focus on gammarids profiles. G-A: fed with agarose pellets alone (control); G-AL: fed with agarose and leaf litter; G-AH: fed with agarose and aquatic hyphomycetes; G-AD: fed with agarose and diatoms; G-ALH: fed with agarose, leaf litter and aquatic hyphomycetes; G-ALHD: fed with agarose, leaf litter, aquatic hyphomycetes and diatoms.	130
<b>Figure 5bis</b> : Importance of algal items in field-collected gammarids foregut content as a function of their size (n=30). (A) Percentage occurrence of diatoms and filamentous algae in the foregut content. (B) Relative abundance of diatoms and filamentous algae in the foregut content.	130

## Liste des Annexes

<b>Annexe 1</b> : Complément du <b>Tableau 3</b> , Paramètres chimiques des sites d'études en 1998-99 et 2014-15.....	181
<b>Annexe 2</b> : Gradient d'azote (N) et phosphore (P) le long des sites d'étude. En (A), les sites en abscisse sont organisés selon le gradient de $\text{NO}_3^-$ . En (B), ils sont organisés selon le gradient de $\text{PO}_4^{3-}$ .....	183
<b>Annexe 3</b> : Pourcentage des comptages des espèces de diatomées retrouvées dans les biofilms.....	185
<b>Annexe 4</b> : Interactive impacts of silver and phosphorus on autotrophic biofilm elemental and biochemical quality for a macroinvertebrate consumer .....	187
<b>Annexe 5</b> : Stoichiometric constraints modulates impacts of silver contamination on stream detritivores: an experimental test with <i>Gammarus fossarum</i> . <a href="#">Arce-Funck et al. (2016)</a> .....	205



## **CHAPITRE I :**

Introduction et synthèse bibliographique.



## I. Introduction.

Toute espèce exploite son environnement afin d'y trouver les ressources nécessaires à sa survie et à son développement. Elle occupe ainsi une place au sein d'un réseau d'interactions (trophiques et non trophiques) et participe au fonctionnement de l'écosystème. L'Homme ne déroge pas à la règle et partage avec les autres espèces son environnement. Depuis la révolution industrielle, les activités humaines ont amplifié de façon spectaculaire les pressions exercées sur les écosystèmes dont l'homme dépend pourtant. En particulier, l'accès à une ressource en eau de qualité et en quantité suffisante est devenu l'une des préoccupations majeures, notamment dans les pays en voie de développement. Par ailleurs, les activités anthropiques requièrent des quantités croissantes d'eau et dégradent la qualité des masses d'eaux et des milieux, l'accès à l'eau potable devenant même, dans certaines régions du monde, la source de conflits ([Dinar, 2002](#)).

Bien que l'eau recouvre plus de 70% de la surface du globe terrestre ([U.S. Department of the Interior & U.S. Geological Survey, 2016](#)), 97% de ces ressources sont salées et seulement 3% se retrouvent sous forme d'eau douce dont la majorité (68,7%) est immobilisée sous forme de glace. Face au constat de la dégradation croissante des ressources en eau douce, des scientifiques du monde entier se sont mobilisés, tout d'abord pour évaluer l'état des ressources mais également pour tenter de proposer des solutions.

En l'an 2000, le Millennium Ecosystem Assessment (MEA) a rassemblé 1360 scientifiques autour de la question des conséquences des changements écosystémiques sur le bien-être humain. L'objectif était également d'établir la base scientifique pour mettre en œuvre les actions nécessaires à l'amélioration de la conservation et de l'utilisation durable de ces systèmes perturbés ([Millennium Ecosystem Assessment, 2005 a b](#)).

Simultanément, la Directive-cadre sur l'eau (DCE, directive 2000/60) ([Parlement et Conseil Européen, 2000](#)), établit au niveau européen un cadre politique communautaire visant à prendre des mesures pour préserver et restaurer les masses d'eau<sup>1</sup> dégradées par des pollutions diverses, des altérations physiques, mais également pour réduire efficacement ces altérations et les risques liés aux écosystèmes perturbés. L'objectif de cette directive est la préservation et la

---

<sup>1</sup>Portion de cours d'eau, canal, aquifère, plan d'eau ou zone côtière homogène. Il s'agit d'un découpage élémentaire des milieux aquatiques destiné à être l'unité d'évaluation de la DCE. Une masse de surface est une partie distincte et significative des eaux de surface, telles qu'un lac, un réservoir, une rivière, un fleuve ou un canal, une partie de rivière, de fleuve ou de canal, une eau de transition ou une portion d'eaux côtières. Pour les cours d'eau la délimitation des masses d'eau est basée principalement sur la taille du cours d'eau et la notion d'hydroécocorégion. Les masses d'eau sont regroupées en types homogènes qui servent de base à la définition de la notion de bon état. Une masse d'eau souterraine est un volume distinct d'eau souterraine à l'intérieur d'un ou de plusieurs aquifères.

restauration de l'état des masses d'eaux superficielles continentales et côtières, ainsi que les masses d'eaux souterraines.

Dans leur article « Global threats to human water security and river biodiversity », [Vörösmarty \*et al.\* \(2010\)](#) renforcent le fait que l'eau est considérée comme l'une des ressources naturelles les plus essentielles mises en péril par les activités humaines et abordent le risque de la diminution de la biodiversité des écosystèmes aquatiques. La diversité biologique des eaux douces est effectivement particulièrement menacée ([Dudgeon \*et al.\*, 2006](#)), cette diversité étant pourtant une des clefs du maintien de l'intégrité fonctionnelle des milieux aquatiques, et, *in fine*, des biens et services rendus par ces écosystèmes aux populations humaines (voir par exemple [Gessner \*et al.\*, 2010](#)).

Les initiatives et règlements nationaux et internationaux s'intéressent théoriquement, au niveau du domaine continental, à toutes les masses d'eaux tempérées. Néanmoins, il apparaît clairement un centrage majoritaire sur les cours d'eaux de grande taille, à l'aval des bassins versants. Dans leur étude, [Meyer & Wallace \(2001\)](#) estiment que les petits cours d'eau ne sont pas assez clairement identifiés dans les cartes topographiques contrairement aux inventaires de terrain. L'argument de [Meyer & Wallace \(2001\)](#) fut repris par [Gomi, Sidle & Richardson \(2002\)](#), estimant que la typologie des têtes de bassin versant présentait une très grande variabilité, ne permettant pas une définition franche de ce que sont les têtes de bassin versant dans ce contexte. Leur étude a ainsi porté sur les « headwater streams », en prenant en compte sous ce terme, les cours d'eau pérennes identifiés de taille dite « raisonnable », critère qui reste très subjectif. Face à cette problématique, le gouvernement français a exigé, en 2015, la réalisation de cartes complètes intégrant tous les cours d'eau, ceux-ci prenant la définition suivante: « constitue un cours d'eau, un écoulement d'eaux courantes dans un lit naturel à l'origine, alimenté par une source et présentant un débit suffisant une majeure partie de l'année » ([Ministre de l'écologie, du développement durable et de l'énergie, 2015](#)).

La plupart des études sur les cours d'eaux ont donc préférentiellement été dirigées, à ce jour, sur le rôle des cours d'eau d'ordre supérieur. Pourtant, les cours d'eau de tête de bassin versant (considérons ici les ruisseaux d'ordre 1 et 2 voir ordre 3) représentent, selon les études, de 60 à 80% du linéaire des cours d'eau ([Schumm, 1956](#)), voir même jusqu'à 95% de la totalité du réseau hydrographique ([Meyer & Wallace, 2001](#)). Aux États-Unis, ils représentent 73% de la totalité du réseau hydrographique. Malgré ces chiffres conséquents, ces cours d'eau ne sont généralement pas intégrés dans les efforts d'évaluation et de surveillance de qualité des masses d'eau. En France, il suffit pour s'en rendre compte, de constater leur faible représentativité dans les réseaux de surveillance. Même si leur fonctionnement est de mieux en mieux connu (tout comme leur participation au maintien d'une bonne qualité des masses d'eau situées à l'aval), jusqu'à très récemment, l'étude fondamentale de l'importance des producteurs primaires dans

leur fonctionnement écologique a été négligée. Pour illustration, [Shelton \(1994\)](#) n'y fait aucune référence dans les guides techniques de suivi de la qualité des masses d'eau du « Water-quality assessment program » californien. De plus, afin que les mesures mises en place pour conserver les écosystèmes ou réduire les perturbations sur ces écosystèmes soient efficaces, une connaissance approfondie du fonctionnement de ces milieux est indispensable. Comme le soulignent [Vörösmarty et al. \(2010\)](#) ainsi que [Gessner et al. \(2010\)](#), en plus d'une bonne connaissance des communautés biologiques peuplant ces milieux, une bonne compréhension des processus fonctionnels qui s'y déroulent semble essentielle.

Les objectifs initiaux de ces travaux de thèse étaient de contribuer à une meilleure compréhension du fonctionnement des ruisseaux de tête de bassin versant, en axant les travaux sur la compréhension des facteurs qui régulent les processus fonctionnels en jeu dans ces écosystèmes, en intégrant notamment le rôle de la production primaire, souvent négligée dans ces milieux. Il sera ainsi particulièrement question de :

- i) Evaluer expérimentalement et *in situ* comment certains stressseurs environnementaux (en prenant ici l'exemple du phénomène d'acidification des eaux de surface dans les Vosges) peuvent influencer les facteurs de limitation des processus fonctionnels en jeu dans ces milieux.
- ii) Evaluer l'impact des facteurs de limitation (richesse en nutriments, apports en composés carbonés complexes par les producteurs primaires) sur le fonctionnement des écosystèmes de cours d'eau de tête de bassin versant acidifiés (décomposition de litières).
- iii) Evaluer la potentielle co-limitation des différents facteurs et leur impact sur les processus fonctionnels des écosystèmes de cours d'eau de tête de bassin versant.

## II. Cours d'eau de tête de bassin versant : de quoi parle-t-on ?

Les cours d'eau de tête de bassin versant sont définis comme des hydrosystèmes qui présentent des dimensions réduites (Ordre de Strahler 1 et 2, voir 3) ([Vannote et al., 1980](#)) composant l'extrême amont du réseau hydrographique ([Mac Donald & Coe, 2007](#)) avec des zones de drainage n'excédant pas l'échelle de quelques km<sup>2</sup> ([Gomi et al., 2002](#)). Ils représentent généralement de 60 à 80% du linéaire des cours d'eau ([Schumm, 1956](#)) et drainent de 70 à 80% de la totalité du bassin versant ([Meyer & Wallace, 2001](#)). Leur fonctionnement général a été abordé notamment au travers du River Continuum Concept (RCC) de [Vannote et al. \(1980\)](#) (**Figure 1**).

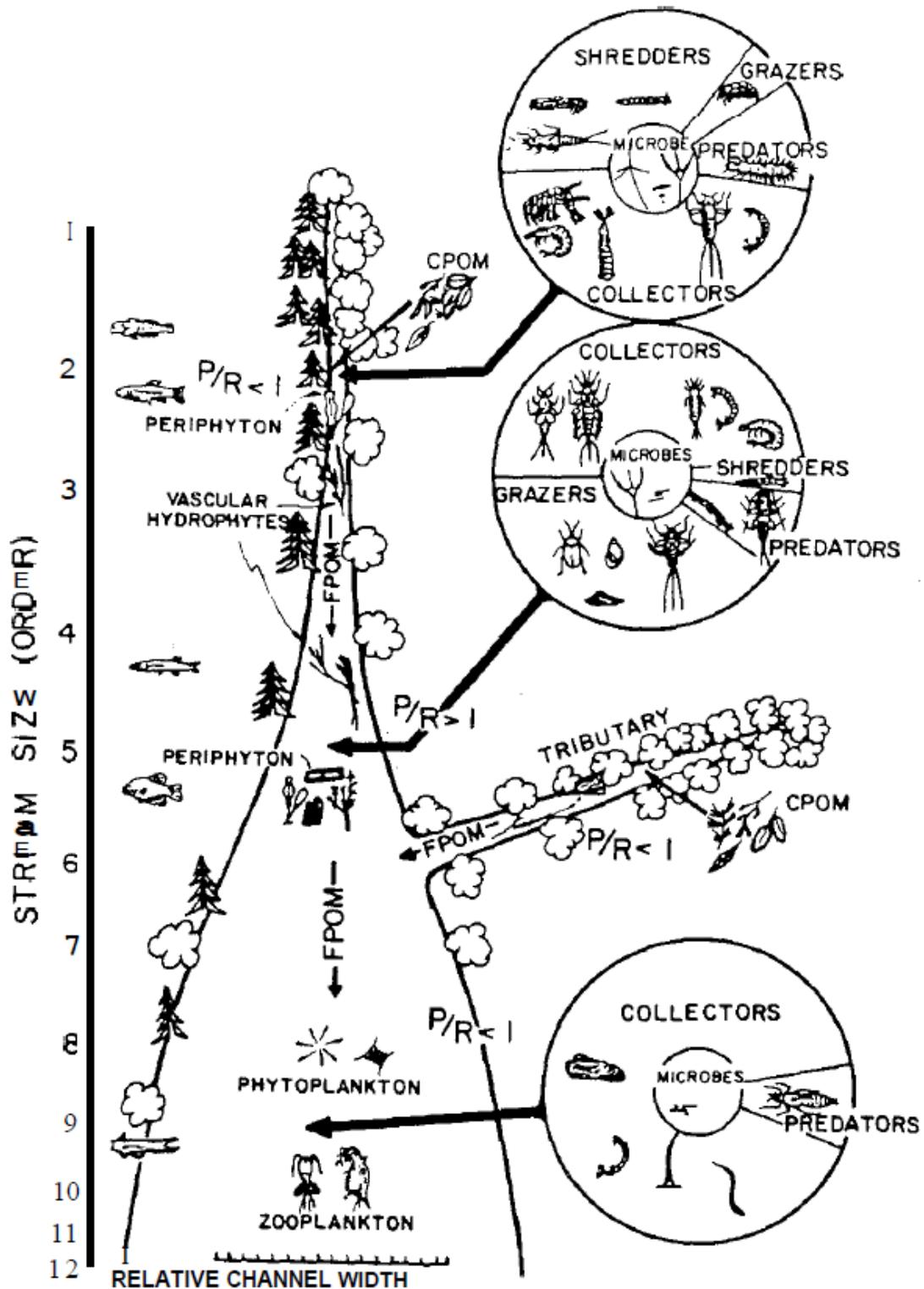
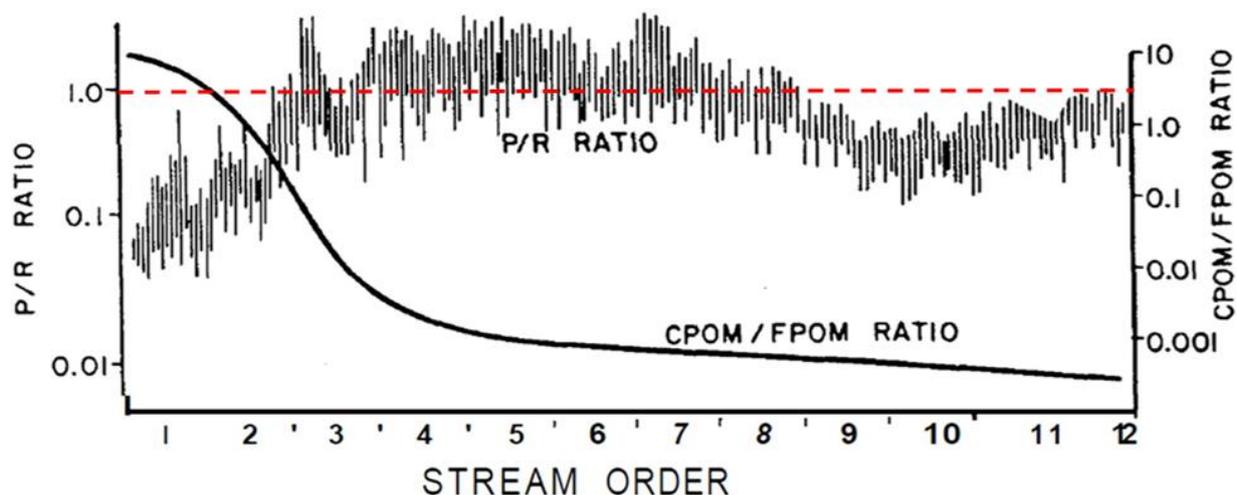


Figure 1 : Relation proposée entre la taille des cours d'eau et la modification progressive dans la structure et les attributs fonctionnels des communautés lotiques. Synthèse du River Continuum Concept (Vannote *et al.*, 1980).

Ce sont des écosystèmes lotiques, avec des connections longitudinales (amont-aval), verticales (surface-eaux souterraines) et latérales (cours d'eau-zone riparienne) fortes (Stanford, 2006 ; Allan & Castillo, 2007). L'apport de matière végétale allochtone morte, qualifiée de « détrit » (Moore *et al.*, 2004), représente une des principales entrées d'énergie dans le système (Anderson & Sedell, 1979 ; Wallace & Webster, 1996). En plus de ces apports de détrit

particulaires, des apports de matière organique dissoute (Dissolved Organic Matter, DOM), extrêmement variables tant en termes de quantité que de nature, peuvent représenter de 3 à 98% des apports de carbone organique dans ces milieux (Meyer, Wallace & Eggert, 1998). Les apports ou transferts d'énergie sous d'autres formes (production primaire autochtone) sont considérés comme négligeables vis-à-vis du fonctionnement détritique du système (Fisher & Likens, 1973; Wallace *et al.*, 1999). Les cours d'eau de tête de bassin versant sont souvent forestiers ou bordés par une ripisylve importante. En raison de l'ombre portée par la végétation rivulaire, la température est généralement plus fraîche et la production primaire autochtone limitée (Vannote *et al.*, 1980). Ces caractéristiques majeures leur ont valu d'être qualifiés d'écosystèmes hétérotrophes (Cummins *et al.*, 1973 ; Vannote *et al.*, 1980). L'hétérotrophie peut être définie à partir de la valeur du ratio production primaire brute (P) / Respiration des communautés en présence (R) (Odum, 1956) (Figure 2).

Odum dès 1956, propose une classification des écosystèmes aquatiques en fonction du ratio P/R repris par Vannote *et al.* (1980). Si le ratio P/R est supérieur à 1, le milieu est dit autotrophe (dominé par des organismes subvenant à la totalité de leurs besoins métaboliques par photosynthèse ou chimiosynthèse) et s'il est inférieur à 1, le milieu est qualifié d'hétérotrophe (dominé par un ensemble d'organismes dont la nutrition nécessite des molécules organiques afin de produire leur énergie cellulaire).



**Figure 2 :** Ratios P/R et CPOM/FPOM (matière organique particulaire grossière/fine) des cours d'eau selon leur ordre de Strahler . La ligne en pointillé rouge représente la zone de passage entre un système autotrophe et hétérotrophe. Adapté de Vannote *et al.*, (1980).

### III. La ressource au sein des cours d'eau de tête de bassin versant.

Dans le chapitre de son ouvrage « Ecology : The link between the natural and the social sciences » concernant les écosystèmes « principaux du monde », Odum en 1975, décrit les cours

d'eau (sans distinction d'ordres) comme incomplets d'un point de vue énergétique. L'auteur considère alors qu'une majeure partie du flux d'énergie entrant dans ces systèmes lotiques est dépendante des entrées de matière organique produite au sein de lacs situés en amont ou provenant d'écosystèmes terrestres adjacents. Ce constat a été à l'origine de nombreux travaux visant à comprendre la nature et les flux d'apports d'énergie et d'éléments chimiques dans ces milieux.

### III.1. Quantité et qualité de la ressource

De longue date, dans les premiers modèles de chaînes ou de réseaux trophiques, la quantité de ressources a été considérée comme le paramètre clef dictant la production biologique des écosystèmes (par exemple, [Lindeman, 1942](#)). Ceci semblait d'autant plus évident au travers de l'observation des « classiques » pyramides écologiques d'Elton ([Odum, 1971](#)), montrant bien une diminution de la quantité potentielle d'énergie disponible à mesure que l'on monte dans la chaîne alimentaire. Bien que la quantité d'énergie soit évidemment un des paramètres fondamentaux du fonctionnement des écosystèmes ([Fisher & Likens, 1973](#)), plusieurs facteurs ont depuis quelques décennies été décrits comme étant susceptibles de totalement transformer l'aspect de ces pyramides. Parmi ceux-ci, la qualité des ressources trophiques apparaît être un paramètre capital du transfert énergétique depuis les ressources de base vers les consommateurs supérieurs. De nombreux paramètres de qualité des ressources peuvent être évoqués, parmi lesquels l'ingestibilité (par exemple la présence de défenses physiques sur la ressource ; [Swaffar & O'Brien, 1996](#)), la digestibilité (par exemple la présence de parois indigestes ; [Berg & Ekbohm, 1991](#)), ou encore la qualité chimique ou biochimique de la ressource ([Bec et al., 2003](#)). Cette dernière recouvre une diversité de paramètres, dont la disponibilité en éléments chimiques essentiels (N, P, Ca...), en acides gras ou acides aminés essentiels, la présence de composés toxiques ou encore la nature des molécules carbonées en présence. Parmi l'ensemble de ces paramètres qualitatifs, nous nous sommes principalement intéressés à la disponibilité en acides gras, en azote et en phosphore. Ces approches sont détaillées ci-dessous.

### III.2. Qualité stœchiométrique des ressources alimentaires

La théorie de la « stœchiométrie écologique » développée par Sterner et Elser ([Elser et al., 1996](#) ; [Sterner & Elser, 2002](#)), correspond à une approche de l'écologie prenant en compte l'équilibre de plusieurs éléments chimiques dans les interactions et les processus écologiques. Tous les êtres vivants peuvent être décrits en termes de composition élémentaire, souvent

exprimée sous forme de ratios (exemple, le ratio de Redfield ; [Redfield, 1934](#)), par exemple C/N ou N/P. Ces ratios, en plus des flux d'énergie jusqu'alors considérés, permettent d'intégrer le rôle des individus dans les interactions écologiques, en prenant en considération les couplages entre les cycles biogéochimiques et les organismes via les éléments chimiques. Cette théorie repose principalement sur les différences de composition chimique entre les organismes en interaction, pouvant influencer sur les conséquences écosystémiques de leurs relations trophiques, mais également jouant un rôle dans les interactions de type compétition ou mutualisme.

La stœchiométrie écologique repose sur trois principes de base :

1) Les organismes vivants sont tous construits autour des mêmes éléments chimiques principaux (C, N, P, Ca, S, K, etc.), mais chaque espèce possède des besoins spécifiques en ces éléments. Ces besoins semblent d'ailleurs globalement bien reliés à la phylogénie, les différences de compositions élémentaires au sein d'une famille d'organismes étant par exemple bien moindres que les différences entre familles ([Woods et al., 2004](#) ; [Hendrixson, Sterner & Kay, 2007](#)). Bien que les relations entre les nutriments accumulés dans leur biomasse et les besoins réels des organismes ne soient pas toujours parfaites ([Frost et al., 2006](#)), il est totalement admis que ces besoins varient fortement entre les espèces.

2) L'homéostasie : Elle correspond ici à la faculté qu'ont les êtres vivants à maintenir leur composition élémentaire constante, de sorte que cette dernière soit moins variable que les ressources qu'ils consomment ([Kooijman, 2000](#) ; [Sterner & Elser, 2002](#)). A l'échelle de la cellule, l'homéostasie stricte n'existe pas, du fait de la capacité plus ou moins grande de constituer des réserves intra-cytoplasmiques. Néanmoins, elle peut être fortement approchée, notamment chez les hétérotrophes. Les producteurs primaires, quant à eux, vont être considérés comme non-homéostatiques, c'est-à-dire que leur composition élémentaire varie fortement en fonction de la disponibilité des ressources disponibles dans le milieu.

3) La loi de conservation de la masse, principe énoncé par [Lavoisier \(1789\)](#) : « ... *car rien ne se crée, ni dans les opérations de l'art, ni dans celles de la nature, et l'on peut poser en principe que, dans toute opération, il y a une égale quantité de matière avant et après l'opération ; que la qualité et la quantité des principes est la même, et qu'il n'y a que des changements, des modifications.* ». Autrement dit, les éléments disponibles au début de l'interaction écologique se retrouvent nécessairement après cette interaction, mais dans des formes ou des compartiments différents. Une partie seulement des nutriments disponibles dans les ressources sera intégrée dans la biomasse du consommateur (suivant ses besoins élémentaires), tandis que l'autre partie rejoindra le stock de détritus ou sera directement réémise dans l'environnement sous forme de molécules minérales.

La qualité stœchiométrique de la ressource est généralement considérée au travers de ratios du C vis-à-vis des nutriments N ou P. Par exemple, une ressource de bonne qualité aura généralement un faible ratio C/P. Un enrichissement de la ressource en P correspondra le plus souvent à une amélioration qualitative de la ressource pour un consommateur. En effet, le P est un élément essentiel à la vie (Elser, 2012), il est un constituant de nombreuses molécules clés (ADN, ARN, ATP, Phospholipides, etc.). Dans un environnement oligotrophe, basé sur des ressources détritiques pauvres en éléments minéraux (ratio C/P élevé), le P peut être un élément limitant pouvant exercer un fort contrôle sur les paramètres vitaux des individus ainsi que sur le développement de leurs populations (Tilman, Kilham & Kilham, 1982 ; Wallace *et al.*, 1999).

Le décalage entre les besoins du consommateur et la disponibilité des nutriments dans la ressource constituera ce que l'on appelle une contrainte stœchiométrique. Cette dernière pourra affecter le taux de croissance, de survie de l'organisme, mais aussi la quantité et les ratios des éléments rejetés (par exemple : Elser, Hayakawa & Urabe, 2001). De cette manière, il est également possible d'extrapoler les conséquences à plus large échelle de ces contraintes, par exemple sur la dynamique des populations (Moe *et al.*, 2005), sur la structuration des communautés (Elser *et al.*, 1998), ou encore sur les flux de matière et d'énergie au sein des écosystèmes (Cebrian *et al.*, 2009). Les organismes, face à une situation limitante, vont devoir récupérer l'élément limitant de manière active (coût énergétique) dans l'environnement. Ils peuvent pallier ce genre de limitation mais jusqu'à un certain point (mise en péril des fonctions physiologiques lors de carences prolongées). Si on suppose que le P est si important pour les organismes, ils devront faire un choix dans l'investissement de cet élément car le P n'est pas de l'énergie à proprement parler, mais au vu de ses implications dans de nombreux processus biochimiques et métaboliques, sa variation dans l'environnement pourrait fortement moduler les réserves énergétiques (quantité et/ou qualité, par exemple, de réserves énergétiques comme le stock d'ATP, etc..) stockées par ces organismes aquatiques de tête de bassin versant, mais également l'allocation énergétique de ces organismes vis à vis de différentes fonctions (croissance, reproduction, maintien).

Les macroinvertébrés présents dans les cours d'eau sont relativement homéostatiques vis-à-vis du phosphore en comparaison aux producteurs primaires (Evans-White, Stelzer & Lamberti, 2005). Une plus grande disponibilité des ressources minérales (ici, le P) pourrait surpasser les besoins énergétiques fixes des individus (Sterner & Elser, 2002) et ainsi permettre une croissance plus importante ou une augmentation des réserves énergétiques.

Il est intéressant de garder à l'esprit que les approches stœchiométriques n'ont initialement considéré que les cas de carences en nutriments. Ce domaine ayant été développé initialement par des limnologues, les premières études ont été principalement conduites en milieu aquatique, et même plus précisément dans des lacs nord-américains. Il est pourtant notable que les

écosystèmes aquatiques sont actuellement plus fréquemment soumis à des phénomènes d'eutrophisation accélérée plutôt qu'à des phénomènes d'oligotrophisation. Le transfert de ces concepts en dehors des systèmes lacustres étant relativement récent, leur applicabilité reste à conforter dans le contexte d'écosystèmes différents.

### III.3. Qualité biochimique

#### III.3.a. Les lipides

Le terme « lipide » rassemble une grande diversité de structures et de fonctions [Figure 3] ; pour de plus amples détails sur les lipides, voir les travaux et ouvrages de [Arts & Wainman \(1998\)](#) ; [Arts, Brett & Kainz \(2009\)](#) et [Koussoroplis \(2010 a\)](#)]. En bref, nous pouvons les définir comme des substances organiques, peu voir insolubles dans les solvants polaires (par exemple : solutions aqueuses) mais solubles dans des solvants apolaires. En se basant sur les différences de polarité de ces molécules on peut alors en considérer 2 types :

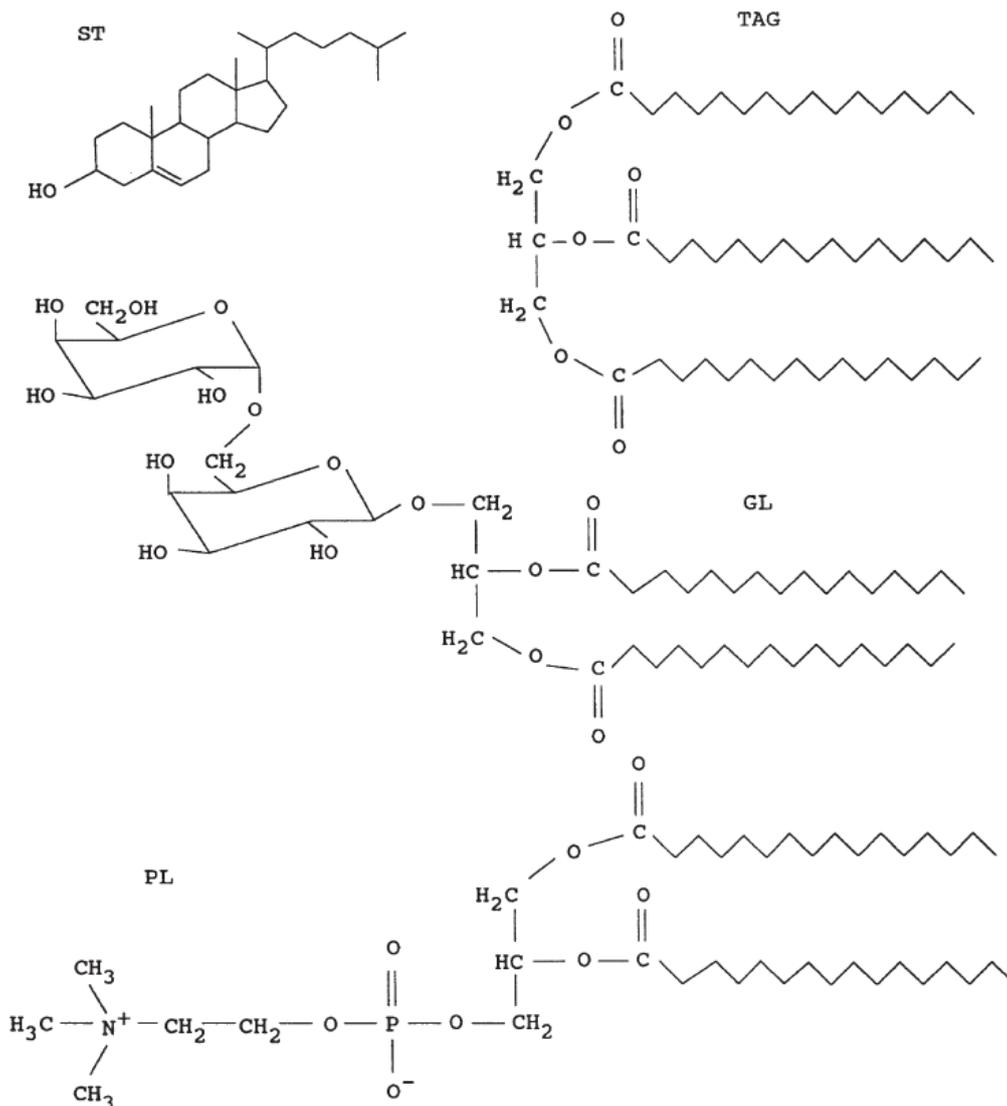
- Lipides neutres (LN) : Acides Gras (AG) estérifiés avec du glycérol (mono-, di- et triglycérides), des stérols (stérides) et des alcools gras (cérides). Ces grosses molécules constituent des réserves énergétiques stockant l'excédent d'énergie issu de la photosynthèse ou apporté par l'alimentation (sous forme de triglycérides le plus fréquemment). Dans les LN, on inclut également les AG libres et les stérols.

- Lipides polaires (LP) : Il s'agit des glycolipides, des lipoprotéines et surtout des phospholipides. A l'exception des lipoprotéines, les LP sont composés d'un ou de deux AG et au minimum de deux autres composés (glycérol, acide phosphorique). Les LP et plus particulièrement les phospholipides sont les principaux constituants des membranes cellulaires jouant un rôle structurel et fonctionnel important.

#### III.3.b. Acides gras

Les AG sont les constituants de base de la plupart des lipides, rarement présents à l'état libre. Ce sont des acides carboxyliques (la « tête » présentant un groupement -COOH) avec une chaîne carbonée (anciennement appelée « aliphatique ») linéaire ou ramifiée comprenant entre 4 et 40 atomes de carbone (la « queue » se terminant par un groupement méthyle -CH<sub>3</sub>). Nous distinguons :

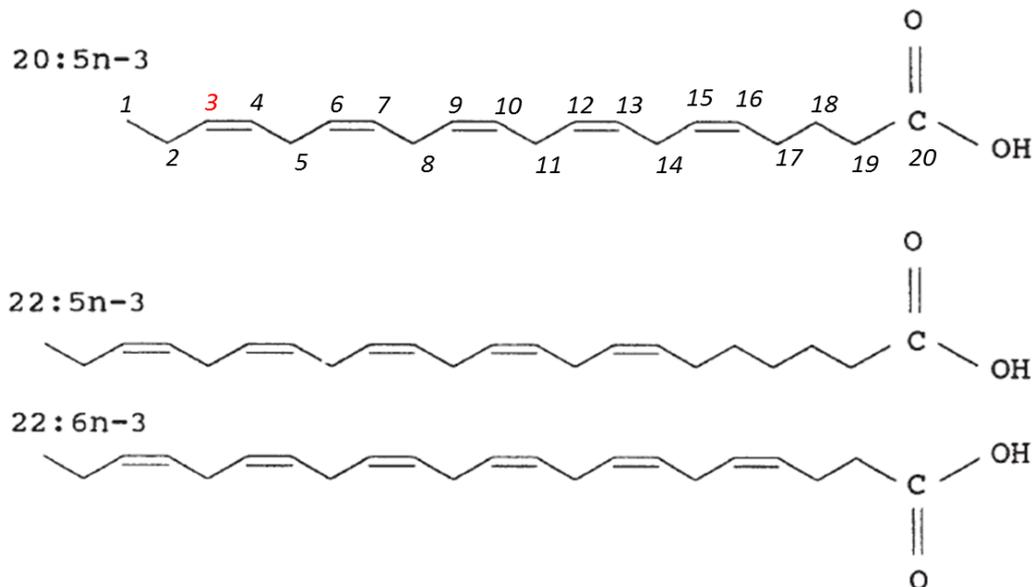
- Les AG saturés (AGS ou **SAFA**) présentant une chaîne carbonée sans double liaison.



**Figure 3** : Structure de classes importantes de lipides présents dans les écosystèmes aquatiques. ST: stérols, représentés par le cholestérol, TAG: triglycérides, représentés par le tripalmitine, GL: glycolipides, représentés par le digalactosyldiacylglycérol, PL: phospholipides, représentés par le phosphatidylcholine (Parrish, 1998).

- Les AG saturés à chaîne ramifiée (AGSR ou **BCFA**) dont la ramification peut être un groupement méthyle disposé sur l'avant dernier atome de carbone par rapport à la fonction méthyle terminale. Ce méthyle peut être branché en position iso ou anteiso.
- Les AG monoinsaturés (AGMI ou **MUFA**) et polyinsaturés (AGPI ou **PUFA**) : ils possèdent une ou plusieurs doubles liaisons sur la chaîne carbonée.

La nomenclature des AG est basée sur le nombre d'atomes de carbone et l'existence de doubles liaisons, leur nombre et leur position. Les nomenclatures classiquement utilisées sont: X : Y $\omega$ Z ou X : Yn-Z (X : nombre d'atomes de carbone ; Y : nombre de doubles liaisons ; Z : numéro du carbone de la première liaison double à compter de l'extrémité méthyle) (**Figure 4**).



**Figure 4 :** Structures de certains acides gras polyinsaturés (AGPI) à longue chaîne. L'acide eicosapentaénoïque (20 : 5n-3), acide docosapentaénoïque (22 : 5n-3) et l'acide docosahexaénoïque (22 : 6n-3) sont tous liés au niveau biochimique en raison de l'emplacement de la première double liaison à l'extrémité méthyle de la chaîne (n-3). Les numéros sur la chaîne carbonée de l'acide eicosapentaénoïque représentent la numérotation classique des carbones lors de la description des AG. Adapté de [Parrish \(1998\)](#).

Contrairement aux végétaux, la majorité des métazoaires ne disposent pas des enzymes nécessaires ( $\Delta 12$ - et  $\Delta 15$ -désaturases) à la biosynthèse de 18 : 3 $\omega$ 3 et de 18 : 2 $\omega$ 6 précurseurs des acides gras polyinsaturés (AGPI) des séries  $\omega$ 3 et  $\omega$ 6; malgré le fait qu'ils soient nécessaires pour leur développement et leur croissance ([Olsen, 1998](#)). Ces AGPI sont liés aux mécanismes physiologiques et biochimiques essentiels au bon développement des organismes aquatiques ([Arts, Ackman & Holub, 2001](#)). Les AGPI à longue chaîne carbonée (acide eicosapentaénoïque : EPA et acide docosahexaénoïque : DHA), très abondants dans les LP ont un rôle structuro-modulateur au sein des membranes cellulaires. La longueur de leur chaîne carbonée et leur degré d'insaturation élevé confèrent à ces molécules une très grande flexibilité permettant à la bicouche lipidique de maintenir sa fluidité, essentielle dans des conditions de basses températures ([Eldho et al., 2003](#)). Ainsi, les membranes cellulaires peuvent maintenir leurs propriétés de perméabilité, d'élasticité, de transport latéral de protéines transmembranaires, de formation et d'absorption de vésicules sous une large gamme de conditions externes ([Wassall et al., 2004](#)). Par ailleurs, la formation au sein des membranes cellulaires de « radeaux » lipidiques constitués de LP riches en DHA permet aux protéines transmembranaires d'adopter leur conformation spatiale optimale et donc de fonctionner de manière optimale ([Arts & Kohler, 2009](#)).

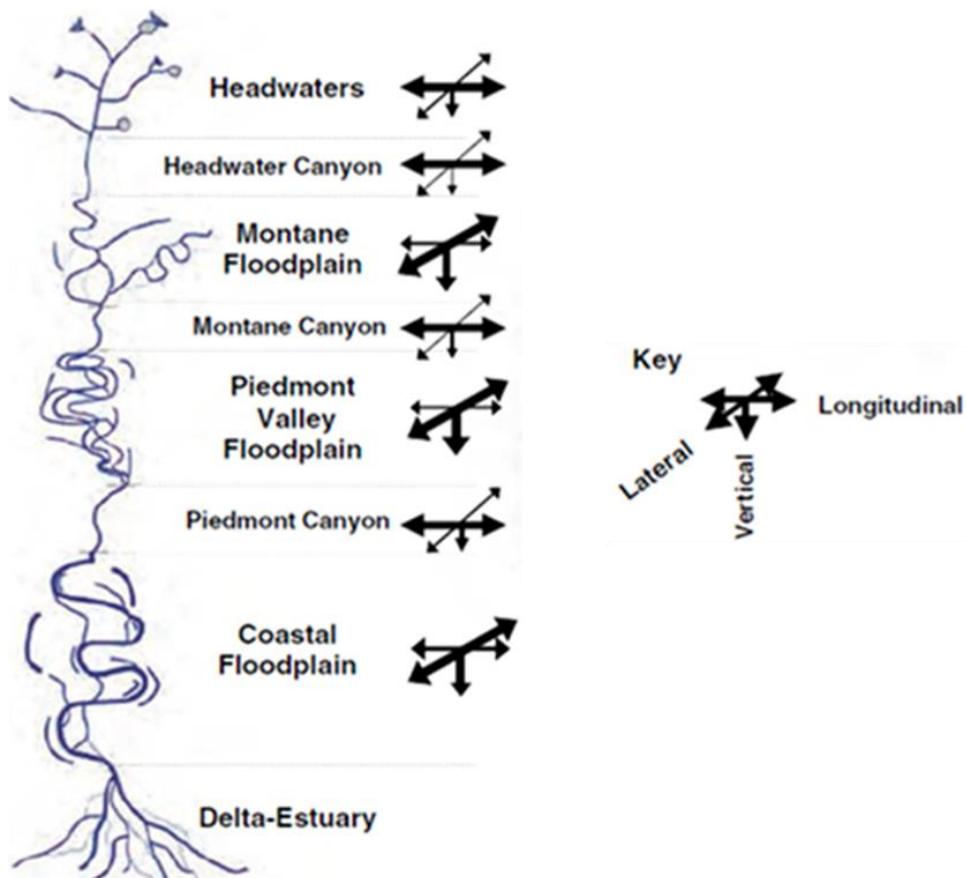
Seuls certains taxons sont capables de synthétiser des AGPI à longue chaîne. Ceux en étant incapable, se voient en conséquence, dans l'obligation de récupérer ces molécules dans leur nourriture. Certains AGPI à longue chaîne sont donc considérés comme des molécules essentielles pour les consommateurs (Acides Gras Essentiels : AGE ou EFA). Certains AG

spécifiques d'un organisme ou d'un groupe d'organismes peuvent également permettre d'évaluer la présence, l'abondance relative, ou encore d'identifier les taxons au sein de mélanges complexes de matière organique (par exemple : seston, biofilm, sédiment, etc.). La stabilité métabolique de certains AG le long de la chaîne trophique permet également de les utiliser comme des traceurs de relations proies-prédateurs. Par exemple, lors d'une expérience visant à nourrir le copépode *Acartia tonsa* avec un cilié bactériovore, Ederington, McManus & Harvey (1995) ont mis en évidence un transfert et une accumulation d'AG d'origine bactérienne chez les copépodes et les ciliés. Plusieurs études ont ainsi pu caractériser le régime alimentaire naturel de nombreux microcrustacés zooplanctoniques (Lee, Nevenzel & Paffenhöfer, 1971 ; Kattner, Hirche & Krause, 1989 ; El-Sabaawi *et al.*, 2009). St. John & Lund (1996) ont également observé le transfert d'AG spécifiques de diatomées à des larves de morue par l'intermédiaire de leurs proies (nauplius d'*Acartia tonsa*). De plus, la sélectivité pour un AGPI spécifique peut être modifiée en réponse à l'abondance relative de ces derniers dans la nourriture (Copeman *et al.*, 2002 ; Fountoulaki *et al.*, 2003 ; Hessen & Leu, 2006) ou bien en réponse à des stimuli extérieurs tels que la température (Arts & Kohler, 2009 ; Brett, Müller-Navarra & Persson, 2009) ou la salinité (Cordier *et al.*, 2002 ; Khérifi *et al.*, 2003). Ces processus de sélection permettent aux organismes d'assurer un fonctionnement optimal de leurs membranes cellulaires et de maintenir un niveau énergétique dans une large gamme de conditions environnementales ainsi que lors de stress.

L'intérêt mais aussi les limites de l'utilisation des AG en tant que biomarqueurs résident dans la relative stabilité et spécificité de ces composés. La spécificité d'un AG biomarqueur dépend de la composition taxonomique de l'échantillon étudié. A titre d'exemple, le 18 : 4 $\omega$ 3 a souvent été utilisé comme biomarqueur des dinophycées (Leveille *et al.*, 1997). Néanmoins, Bec *et al.* (2003) ont pu montrer que des cryptophycées et des chrysophycées pouvaient également être riches en 18 : 4 $\omega$ 3. Dans cette dernière étude, les acides gras n'ont donc pu être utilisés comme biomarqueurs trophiques spécifiques. Lors d'études sur le transfert trophique, il est donc primordial de garder à l'esprit qu'un AG pris de manière isolé, est rarement spécifique d'un groupe taxonomiquement homogène d'organismes (Reuss & Poulsen, 2002 ; Dalsgaard *et al.*, 2003 ; Bec *et al.*, 2003). De plus la composition biochimique d'un groupe taxonomique est susceptible de varier en fonction des conditions environnementales (par exemple : lumière, température, nutriments, phase de croissance, période de stress etc.) (Guschina & Harwood, 2009). Les métazoaires peuvent, jusqu'à un certain degré, retenir préférentiellement certains AG (Copeman *et al.*, 2002 ; Hessen & Leu, 2006). Cela peut aboutir, sur des études à long terme, à des profils d'AG qui ne reflètent plus ceux de la nourriture ingérée à court ou moyen terme et il est important de le considérer lors d'études concernant le traçage trophique via les AG.

#### IV. Les acteurs de la chaîne trophique et du fonctionnement des têtes de bassin versant.

Les différents groupes du biota constituant le réseau trophique des écosystèmes de bassin versant global se répartissent principalement dans 4 zones : la zone riparienne, la colonne d'eau, la zone benthique et la zone hyporhéeique, le long des 3 axes spatiaux : longitudinal, latéral et vertical (Stanford, 2006). Cette répartition s'applique bien évidemment également aux cours d'eau de tête de bassin versant, où l'on observe une plus forte connectivité longitudinale (**Figure 5**) en comparaison avec les systèmes situés plus en aval.

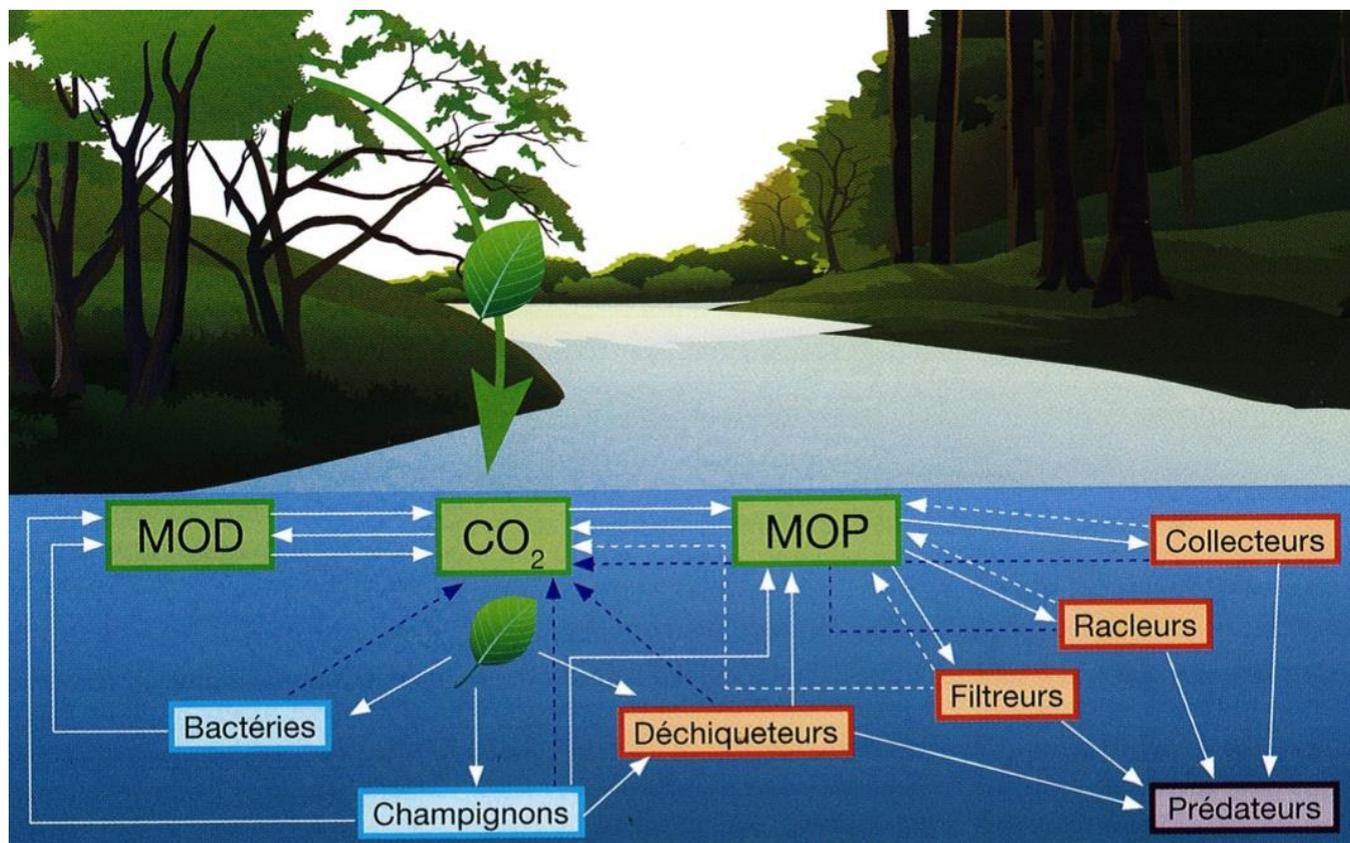


**Figure 5 :** Représentation schématique de la connectivité d'un bassin versant. Les groupes de flèches indiquent la force attendue des interactions entre les échanges verticaux (lit du cours d'eau-eau de surface), latéraux (littorales alluviales) et longitudinaux (amont-aval). Les assemblages des taxa du biota peuvent se répartir dans les trois dimensions spatiales, y compris la zone riparienne (terrestre adjacente), benthique (fond du cours d'eau), hyporhéeique (eaux interstitielles du sédiment) et phréatique (eaux souterraines profondes) en plus des poissons (pélagique) et autres organismes de la colonne d'eau. Adapté de Stanford (2006).

Les principaux groupes d'organismes des cours d'eau de tête de bassin versant sont présentés succinctement ci-après.

## IV.1. Décomposeurs

Les décomposeurs vont être les premiers acteurs à rentrer en jeu vis-à-vis de la ressource dans la chaîne trophique. Il s'agit de microorganismes saprotrophes. Ils sont parmi les premiers à intervenir dans le processus de décomposition de la matière organique (**Figure 6**).



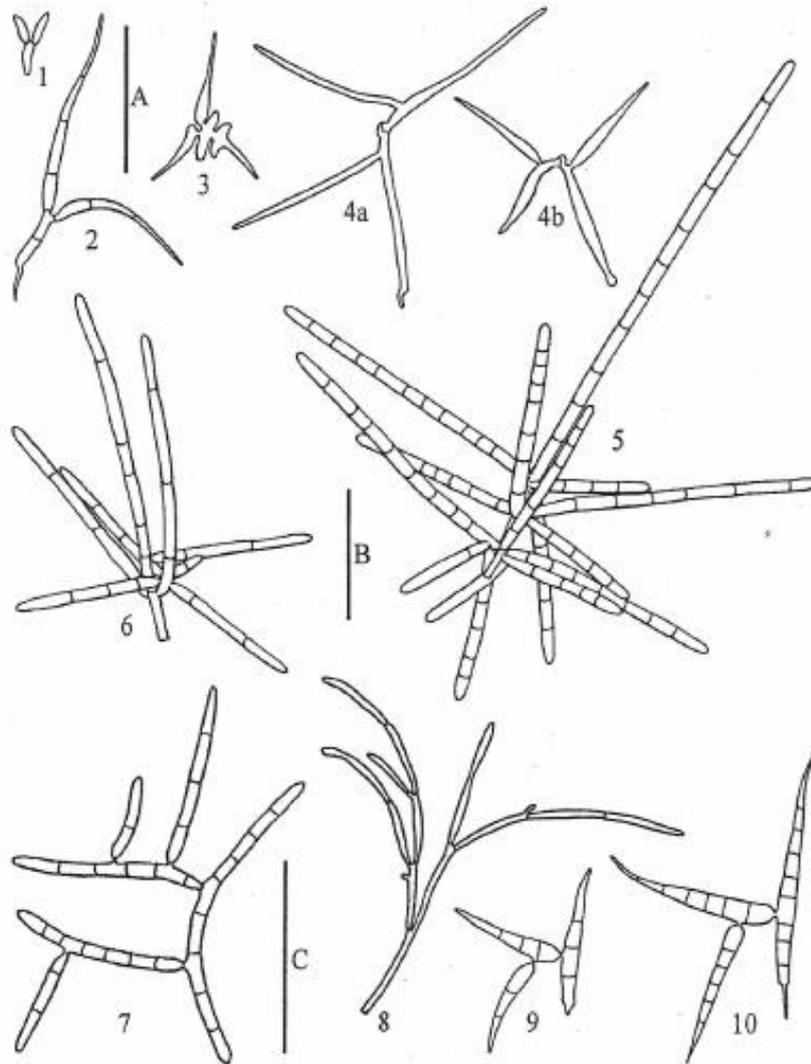
**Figure 6** : Réseau trophique détritique : la décomposition débute par la chute de feuilles dans le cours d'eau. Sous l'action des décomposeurs (microorganismes) et déchetteurs (invertébrés) la décomposition libère du CO<sub>2</sub>, ainsi que des matières organiques particulières (MOP) et dissoutes (MOD) qui seront utilisées directement ou indirectement par les différents types d'organisme du réseau trophique détritique. D'après [Chauvet & Guérol \(2015\)](#).

### IV.1.a. Hyphomycètes aquatiques

Il existe une très grande diversité de champignons identifiés à ce jour dans nos écosystèmes aquatiques, sous différentes formes, associés à différents substrats ou matières en décomposition ([Cornut, 2010](#)). Ils sont considérés comme le deuxième plus grand groupe d'eucaryotes répertoriés sur Terre (après les insectes, avec seulement 5% des espèces décrites). Actuellement, un peu plus de 2000 espèces de champignons aquatiques ont été isolées et décrites dans les écosystèmes dulçaquicoles comprenant entre autres des Chytridiomycètes, des Zygomycètes, des Ascomycètes, et des Basidiomycètes.

L'un des groupes (non monophylétique) les plus étudiés parmi les champignons aquatiques est le groupe des hyphomycètes aquatiques, qui sont des formes asexuées (anamorphe) principalement d'Ascomycètes mais également de Basidiomycètes, tandis que certaines espèces ne sont pas encore phylogénétiquement affiliées à un groupe donné. Ils sont capables de réaliser la totalité de leur cycle de vie dans l'eau par la colonisation d'un substrat propice au développement de leur mycélium. Ils colonisent majoritairement la litière végétale. Après la colonisation et prolifération au sein d'une matrice organique, ils produisent et dispersent leurs conidies (c'est-à-dire des spores asexuées pouvant représenter jusqu'à 80% de la production du champignon (Suberkropp, 1991). Ces conidies (**Figure 7**) qui présentent des formes variées (tétraradiées, ramifiées ou filiformes) sont une adaptation à la dispersion dans les systèmes lotiques et à un ancrage à des substrats immergés (Webster & Descals, 1981 ; Webster & Davey, 1984 ; Webster, 1987), et sont particulièrement efficaces à l'automne lors de la chute des feuilles dans les cours d'eau. Les hyphomycètes aquatiques sont jusqu'à présent considérés comme étant des acteurs majeurs de la décomposition de la matière organique détritique d'origine végétale dans les cours d'eau. Les plus hautes biomasses et les taux de sporulation des hyphomycètes aquatiques sont d'ailleurs assez bien corrélés avec les plus grands taux de décomposition des litières (Gessner & Chauvet, 1994 ; Niyogi, Simon & Townsend, 2003). Ils apparaissent comme l'un des groupes de décomposeurs principaux de la matière organique allochtone des cours d'eaux de tête de bassin versant. La biomasse fongique représente d'ailleurs entre 95 et 99% du total de la biomasse microbienne (bactéries et champignons réunies) associée à la litière en décomposition dans les cours d'eau (Baldy & Gessner, 1997 ; Hieber & Gessner, 2002 ; Gulis & Suberkropp, 2003 a). Leur production annuelle, basée sur des bilans réalisées à l'échelle de petits cours d'eau, se trouve être comparable, voire supérieure, à la production secondaire des invertébrés (Suberkropp, 1997 ; Methvin & Suberkropp, 2003).

Les champignons aquatiques, après colonisation de leur substrat détritique, transforment la matière détritique en carbone facilement récupérable, convertissant ce dernier en leur propre biomasse, ce qui peut représenter jusqu'à 18-23% de la masse totale détritique (Suberkropp, 1995 ; Methvin & Suberkropp, 2003). C'est ainsi qu'au cours des différentes phases de la décomposition de la litière végétale, les hyphomycètes aquatiques sont impliqués dans une variété de processus (décomposition, respiration...) qui aboutissent à la conversion du carbone organique végétal en biomasse fongique, et en CO<sub>2</sub> via la respiration (Gessner *et al.*, 2007). L'activité des champignons se traduit également par l'exportation de carbone végétal sous forme de matière organique particulaire fine (FPOM, incluant les conidies) ou de matière organique dissoute (DOM) disponibles pour d'autres organismes des cours d'eau.



**Figure 7 :** Un exemple non-exhaustif des différentes formes de conidies d'hyphomycètes aquatiques.

1. *Tricellula aquatic*, 2. *Ypsilina graminea*, 3. *Lateriramulosa uniinflata*, 4a. *Taeniospora gracilis* var. *enecta*, 4b. *Taeniospora gracilis* var. *gracilis*, 5. *Dendrospora erecta*, 6. *Dendrospora tenella*, 7. *Varicosporium elodeae*, 8. *Varicosporium delicatum*, 9. *Pleuropedium tricladioides*, 10. *Pleuropedium multiseptatum*. Echelle : A (Figs. 1-4) = 25 pm, B (Figs. 5-6) = 50 pm, C (Figs. 7-10) = 50 pm (Gulis, Marvanová & Descals, 2004).

Au cours du processus de décomposition microbienne, l'activité fongique induit de nombreux changements au niveau structurel et biochimique des tissus foliaires. Plusieurs études ont démontré qu'au-delà de l'augmentation de la digestibilité et de la valeur nutritionnelle de la litière induite par les hydrolyses partielles des tissus foliaires et de la destruction de la cuticule par les exo-enzymes fongiques, ce phénomène de facilitation résultait également d'un maintien de l'activité enzymatique fongique à l'intérieur de l'appareil digestif des invertébrés après consommation de litières colonisées (Bärlocher, 1982 ; Sinsabaugh, Linkins & Benfield, 1985). Une particularité des hyphomycètes aquatiques est que malgré des températures basses (inférieures à 10°C), ils conservent et maintiennent une intense activité enzymatique (Bärlocher, 1992). Le temps nécessaire au conditionnement de la litière (c'est-à-dire à la colonisation et au développement des hyphes fongiques dans la matrice foliaire) peut varier de quelques semaines

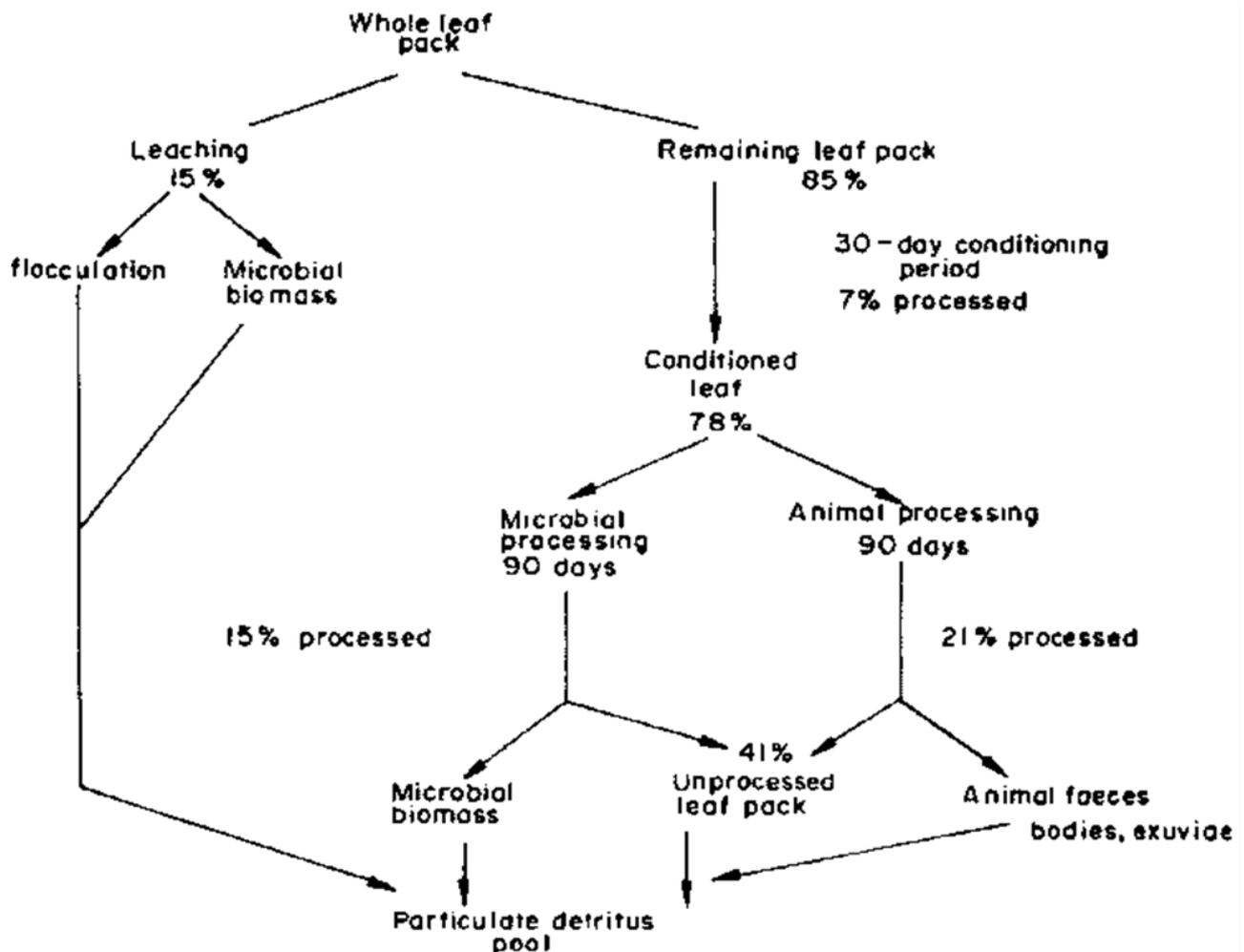
à quelques mois selon les espèces végétales considérées et le contexte environnemental (Gessner & Schwoerbel, 1989 ; Bärlocher, 1991). De ce fait, en dehors de leur rôle direct dans la décomposition de la matière organique, plusieurs études (Kaushik & Hynes, 1968 ; Bärlocher & Kendrick, 1976 ; Suberkropp & Klug, 1976) ont montré que les hyphomycètes aquatiques jouent également un rôle déterminant dans le fonctionnement écologique des cours d'eau, forestiers comme intermédiaires, dans les transferts d'énergie et de nutriments vers les niveaux trophiques supérieurs. Malgré leur découverte en tant que groupe écologique distinct à la moitié du XXème siècle (Ingold, 1942) et leur rôle clé dans le fonctionnement des écosystèmes lotiques, les hyphomycètes aquatiques ont historiquement reçu beaucoup moins d'attention que les macroinvertébrés, algues, et poissons (Gulis, Kuehn & Suberkropp, 2009).

Les activités des hyphomycètes aquatiques associés à la litière végétale dépendent fortement des caractéristiques propres au substrat (Petersen & Cummins, 1974), aux caractéristiques environnementales, et aux interactions biotiques. L'espèce végétale, ses concentrations intrinsèques en macromolécules de structure (par exemple lignine et cellulose) et en nutriments peuvent exercer un fort contrôle sur la croissance et la reproduction des hyphomycètes aquatiques (Petersen & Cummins, 1974). La lignine est particulièrement difficile à dégrader par voie enzymatique en raison de sa structure réfractaire comparée à des composés carbonés dits labile. Ainsi, la litière végétale constituée d'une forte proportion de carbone réfractaire (c'est-à-dire, d'importante concentration en lignine) et pauvre en nutriments (Moore *et al.*, 2004) induit une activité fongique réduite, d'où une décomposition des litières végétale lente. A contrario, une plus forte concentration en nutriments dans la litière tend à stimuler l'activité fongique. Ainsi, pour un substrat donné, l'activité fongique dépend en grande partie de l'interaction des différents facteurs (par exemple, les rapports entre la concentration en lignine et celles des nutriments). Elle peut également être affectée par les concentrations en azote et phosphore inorganique dissous dans la colonne d'eau (Gulis & Suberkropp, 2003 a b ; Gulis, Ferreira & Graça, 2006 ; Arce-Funck *et al.*, 2013 a ; Ferreira *et al.*, 2015). De manière générale, l'eutrophisation des écosystèmes tend à stimuler l'activité fongique, l'immobilisation des nutriments, et à accélérer la décomposition des litières. Néanmoins, au-delà d'un certain seuil, les excès en nutriments semblent pouvoir avoir des effets inverses sur la décomposition totale des litières (par les macroinvertébrés et les microorganismes ; Woodward *et al.*, 2012). De plus, des paramètres chimiques tels que le pH (Clivot *et al.*, 2013), l'aluminium (Baudoin *et al.*, 2008), l'alcalinité, l'oxygène dissous, les xénobiotiques (par exemple : effluents de mines, de stations d'épuration, contamination en métaux lourds, etc.) affectent l'activité fongique et la diversité fongique (Niyogi, Lewis & McKnight, 2001 ; Duarte *et al.*, 2008 ; Drerup & Vis, 2017). En diminuant les concentrations en oxygène dissous (Medeiros, Pascoal & Graça, 2009), les contaminations organiques aboutissent à des résultats similaires. Cependant, certains

hyphomycètes semblent présenter une certaine résistance aux pollutions métalliques (Arce-Funck *et al.*, 2013 a) probablement due au rôle protecteur de la matrice foliaire après que les hyphomycètes l'aient colonisée. Ils semblent même être plus tolérants que certains invertébrés aquatiques face aux pesticides (Brosed, Lamothe & Chauvet, 2016).

Le processus de décomposition des litières a premièrement été vu comme s'articulant en 3 étapes dissociées (**Figure 8**) : lessivage, conditionnement microbien et fragmentation/consommation, principalement par les invertébrés (Petersen & Cummins, 1974 ; Cummins, 1974). Cette vision simpliste fut reprise de manière plus intégrative des processus par Gessner, Chauvet & Dobson en 1999, mettant en évidence que ces trois processus pouvaient avoir lieu simultanément. Néanmoins, dans un souci de développement complet des différentes étapes, nous utiliserons ci-dessous la première description pour aborder chaque « étapes » mises en jeu dans ce processus, de manière isolée.

Le conditionnement est défini par la phase de colonisation de la litière végétale détritique par les espèces microbiennes et la prolifération de celles-ci au sein de la matrice foliaire, qui va enrichir cette ressource (par exemple par l'immobilisation des nutriments de la colonne d'eau) et décomposer les molécules organiques, notamment les plus complexes. Ce processus augmente la valeur nutritive et la palatabilité de la litière pour les invertébrés déchiquteurs. Plus précisément, le processus de conditionnement commence généralement dès l'intégration de la litière dans le cours d'eau, par la colonisation des microorganismes circulant dans la colonne d'eau. En parallèle de cette étape de colonisation se produit le lessivage de matières organiques solubles (acides aminés, polyphénols et polysaccharides) (Nykvist, 1962 ; Suberkropp, Godshalk & Klug, 1976 ; Chauvet, 1987), généralement effectué dans les 24 à 48h après immersion et pouvant entraîner une perte de masse de litière allant jusqu'à 25-30% de de la masse initiale (Nykvist, 1962 ; Petersen & Cummins, 1974 ; Webster & Benfield, 1986 ; Gessner & Schwoerbel, 1989). Le lessivage correspond au phénomène de dissolution et d'entraînement des particules insolubles propres aux dépôts foliaires (plus généralement aux parties aériennes des végétaux). La perte de masse induite dépend donc fortement des espèces considérées. Certaines litières peuvent être pré-conditionnées à différents degrés par des sources aériennes ou terrestres (microorganismes terrestres), avant d'être emportées par le cours d'eau (Olson, 1963). Les invertébrés déchiquteurs ne présentent pas nécessairement de spécialisation pour des litières d'une espèce végétale spécifique, mais sont plutôt adaptées à des litières ayant subi un conditionnement microbien suffisant, plus ou moins indépendamment de l'espèce [certaines espèces peu réfractaires pouvant être consommées après une colonisation fongique réduite, par exemple l'aulne (*Alnus glutinosa*, L.)].



**Figure 8 :** Résumé de la prise en charge de la litière dans les cours d'eau de tête de bassin versant lors du processus de décomposition (Petersen & Cummins, 1974). Les durées de conditionnement peuvent varier suivant l'essence des litières, la composition de la litière ainsi que de sa potentielle pré-colonisation par des souches microbiennes terrestres.

#### IV.1.b. Bactéries

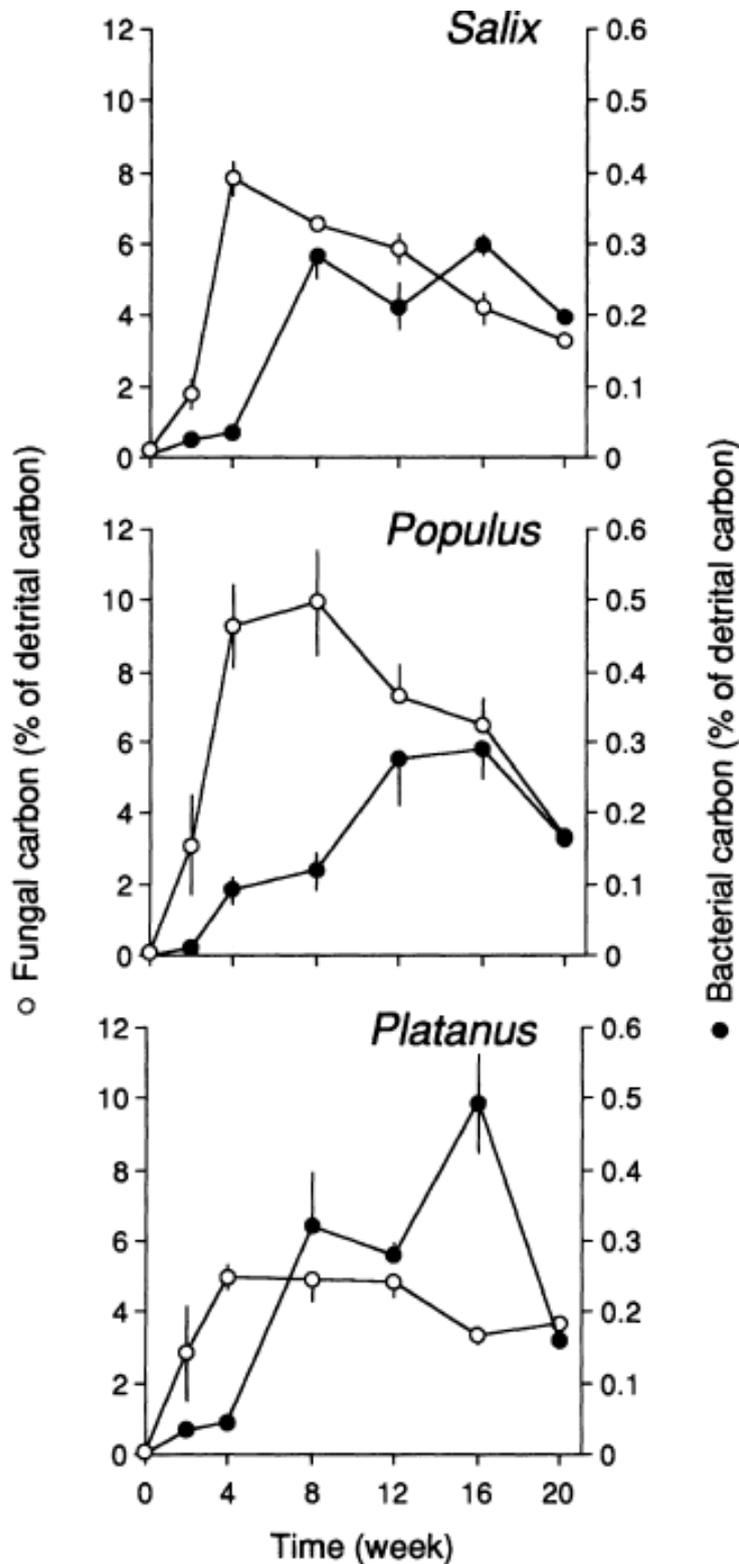
L'appellation « bactéries d'eau douce » correspond actuellement à un ensemble d'organismes constitué par un assemblage très diversifié d'organismes procaryotes, variant dans leur morphologie, physiologie et préférences écologiques. Pouvant comptabiliser de  $10^2$  à  $10^8$  cellules par millilitre (aussi bien pour des populations benthiques de lacs et rivières que pour des populations pélagiques), les bactéries sont considérées comme l'un des biota libre d'eau douce le plus abondant avec une activité métabolique très variée (présentant par exemple une excellente adaptation à des environnements très limités en nutriments) (Sigeo, 2005).

Les bactéries représentent donc l'un des principaux groupes de micro-organismes hétérotrophes de divers systèmes aquatiques et, en tant que représentant des décomposeurs, peuvent rentrer en compétition pour la ressource avec les champignons aquatiques. Dans l'étude de Suberkropp & Klug (1976), il a été montré que la colonisation bactérienne et fongique était la

plus rapide après 2 semaines d'exposition des litières dans les cours d'eau (en observant une augmentation des niveaux d'ATP comme proxy de l'activité microbienne). Plus précisément, la colonisation bactérienne est rapide durant les deux premières semaines puis devient exponentielle passé ce délai. Le dénombrement variait suivant la nature de l'essence immergée et l'augmentation du métabolisme microbien (dans ce cas, la respiration) était corrélée à la surface foliaire de la litière. L'augmentation du nombre de bactéries a pu également être corrélée à l'augmentation des températures durant les derniers mois de l'étude (avec un optimal de température des souches observées entre 5-20°C). [Baldy, Gessner & Chauvet en 1995](#), dans une étude sur les taux de décomposition, ont observé que la majeure partie de la perte de masse (à peu près 40%) était obtenue par l'activité fongique durant ces 2 premières semaines de colonisation. Ils ont également observé, à l'instar de [Suberkropp & Klug \(1976\)](#), un pic maximum observé pour les bactéries après 16 semaines (**Figure 9**), bien après les pics fongiques (entre 2 et 4 semaines).

On observe bien avec ces deux exemples que la contribution des hyphomycètes aquatiques aux processus initiaux de décomposition est prépondérante par rapport à celle des bactéries, bien que les différences d'activités soient moins nettes que les différences en terme de biomasse ([Lecerf, 2005](#)).

Le décalage temporel dans les pics de biomasse nous laisse penser que ces deux groupes de décomposeurs, intervenant à deux moments bien distincts, peuvent présenter une succession naturelle de communautés suivant les premières espèces qui vont s'implanter ou en réponse à l'avancement de décomposition des litières. Néanmoins, il existe également des cas référencés d'interactions antagonistes entre les champignons et les bactéries ([Gulis & Suberkropp, 2003 a](#) ; [Mille-Lindblom & Tranvik, 2003](#)). Par ailleurs, l'implication de protozoaires bactériophages est à ce jour quasi-inconnue dans les processus de décomposition même si l'on pressent qu'ils doivent intervenir dans les interactions de modulation de l'activité microbienne ([Ribblett, Palmer & WayneCoats, 2005](#) ; [Risse-Buhl et al., 2012](#)).



**Figure 9** : Dynamique des biomasses fongiques et bactériennes associées à la litière en décomposition (Garonne), d'après Baldy et al. (1995).

#### IV.2. Producteurs primaires

Comme vu précédemment, Odum (1956) a défini la production primaire brute des écosystèmes aquatiques comme étant le bilan de la production autotrophe et de la respiration

hétérotrophe, la production autotrophe correspondant à la fixation de carbone assurée par les producteurs primaires autotrophes. Dans les écosystèmes lotiques de petite taille, il existe une grande diversité potentielle de producteurs primaires, que l'on classe en différentes catégories (définitions adaptées de [Ramade, 2008](#)), par exemple les :

- Bryophytes : phylum de Cryptogames Archégoniates représentés dans le milieu aquatique par les mousses et les hépatiques,
- Chlorophytes : végétaux aquatiques chlorophylliens représentés par des organismes uni et pluricellulaires, communément qualifiés d'algues filamenteuses, phytoplanctonique ou de micro-algues,
- Diatomées : algues unicellulaires (pouvant présenter une frustule ou coque siliceuse non-cristalline et amorphe) ou coloniales de couleur jaune-brun (embranchement des *Bacillariophyta*),
- Cyanobactéries : procaryotes autotrophes, photosynthétiques unicellulaires ou filamenteuses ayant une vague allure d'algues (embranchement des *Cyanobacteria*).

L'influence des producteurs primaires a longtemps été négligée dans les cours d'eau de tête de bassin versant (même si certains auteurs ont commencé à les prendre en considération et à les intégrer dans leurs études tel que [Elósegui et al., 1995](#) ; [Elósegui & Pozo, 1998](#)) en comparaison aux cours d'eau de plus grande taille et aux écosystèmes lentique. En effet, plusieurs auteurs ont mis en avant la faible contribution de la production de biomasse végétale autochtone par rapport aux apports détritiques allochtones dans les ruisseaux ([Fisher & Likens, 1973](#) ; [Vannote et al., 1980](#)), mis à part dans des cas spécifiques d'ouverture de canopée ou en période estivale propice au développement des organismes autotrophes. Pourtant, des travaux datant de la même époque comme [Minshall \(1978\)](#) et [Cummins \(1979\)](#) pressentaient au contraire une forte influence de l'autotrophie et des producteurs primaires dans le fonctionnement de ces écosystèmes. Plus récemment, [Elósegui et al., \(1995\)](#) ont mis en avant le rôle majeur des producteurs primaires dans la rétention des nutriments (en particulier pour les phosphates) et dans l'autoépuration de systèmes soumis à de fortes contaminations en nutriments. [Rosenfeld & Roff \(1991\)](#) ont estimé que la production primaire nette dans des cours d'eau forestiers ou à canopée ouverte pourrait représenter jusqu'à 30% des entrées de carbone disponible pour les invertébrés aquatiques. Cette disponibilité et présence dans le régime alimentaire a d'ailleurs été mis en évidence dans le tractus de macroinvertébrés déchetiers ([Felten et al., 2008](#)). Mais plus récemment encore, [Likens \(2009\)](#) étudie l'impact des producteurs primaires dans une perspective de réchauffement climatique. Selon ces travaux, une augmentation des températures entrainerait dans les cours d'eau de tête de bassin versant une augmentation de la production primaire (de 280-290%) en région scandinave mais n'aboutirait *in fine* qu'à de l'exportation en plus grande quantité de matière organique de moindre qualité à l'aval du bassin versant.

#### IV.2.a. Qualité de la ressource autochtone

Les producteurs primaires autochtones, du fait notamment de leur qualité en tant que ressource basale pour les réseaux trophiques aquatiques, pourraient jouer un rôle fonctionnel important dans les cours d'eau de tête de bassin versant. En particulier, ces organismes sont plus riches en éléments chimiques et minéraux que les détritiques allochtones, et peuvent apporter des composés essentiels aux métazoaires de cours d'eau, notamment sous la forme, par exemple, d'AGPI.

Dans les écosystèmes aquatiques, les micro-algues sont les principales productrices d'AGPI de types  $\omega 3$  et  $\omega 6$  (Olsen, 1998). Leur composition en AG (Tableau 1) varie en fonction des classes algales considérées et de différents facteurs environnementaux tels que la lumière, la température, la salinité et les teneurs en nutriments (carbone, azote, phosphore) induisant des variations de composition en AG au niveau intraspécifique (Guschina & Harwood, 2009). Les diatomées sont caractérisées par une forte teneur en  $20 : 5\omega 3$  et  $16 : 1\omega 7$  (Tableau 1), considérés comme des marqueurs spécifiques de ce groupe, ainsi que par la présence d'AGPI à 16 atomes de carbone ( $16 : 2\omega 4$ ,  $16 : 2\omega 7$ ,  $16 : 3\omega 4$ ,  $16 : 4\omega 1$ ) (Bourdier & Amblard, 1989 ; Viso & Marty, 1993 ; Dunstan *et al.*, 1994 ; Volkman *et al.*, 1998). On trouve également parmi les diatomées pennées d'importantes proportions en  $20 : 4\omega 6$  (Dunstan *et al.*, 1994). Les algues vertes (Chlorophytes) sont caractérisées par de fortes proportions d'AGPI à 16 et 18 atomes de carbone des séries  $\omega 3$  et  $\omega 6$  ainsi que par l'absence d'AGPI à 20 et 22 atomes de carbone (Tableau 1) (Volkman *et al.*, 1989 ; Scribe *et al.*, 1991 ; Viso & Marty, 1993). Les cyanobactéries, bien qu'étant des organismes procaryotes photosynthétiques, sont caractérisées par de fortes teneurs en  $16 : 0$ , mais peuvent également contenir des teneurs non négligeables en  $18 : 2\omega 6$  et chez certains genres, en  $16 : 1\omega 7$  ou en  $18 : 3\omega 3$  (Dijkman *et al.*, 2010) (Tableau 1). Même si certaines sont capables de biosynthétiser du  $20 : 5\omega 3$  en petite quantité, la majorité des cyanobactéries ne contiennent pas d'AG dépassant les 18 atomes de carbone (Merritt *et al.*, 1991 ; Napolitano, 1998 ; Vargas *et al.*, 1998 ; Dijkman *et al.*, 2010) (Confer Tableau 1). Le rôle de la production primaire autochtone dans les cours d'eau forestiers de tête de bassin versant reste encore peu exploré, et la prise en compte de l'apport en éléments minéraux et composés essentiels (même s'il semble négligeable en comparaison à la biomasse détritique apportée dans ces systèmes) semble être une voie prometteuse pour les intégrer au bilan fonctionnel de ces écosystèmes.

**Tableau 1** : Composition en Acide Gras des différents taxa de producteurs primaires retrouvés classiquement dans les écosystèmes aquatiques d'eau douce. Adapté de [Koussoroplis \(2010\)](#).

Taxa	Acide Gras	Sources
<b>Bacillariophycées</b> <i>Diatomées</i>	16:107; 204; 207; 304; 401 / 20:406; 503	Bourcier & Amblard (1989), Dunstan et al. (1992), Viso & Marty (1993), Volkman et al. (1998), Dunstan et al. (1994)
<b>Chlorophytes</b> <i>Chlorophycées, zygochlophytes etc...</i>	Présence: 16 C et 18 C, 03 et 06 Absence: 20 C et 22 C	Scribe et al. (1991), Viso & Marty (1993), Volkman et al. (1989)
<b>Chrytophycées</b>	18:403; 303 / 20:503	Ahlgrén et al. (1990), Napolitano (1998), Nichols et al. (1984), Sargent & Whittle (1981)
<b>Dynophycées</b>	18:109; 403; 503 (traces) / 20:503 / 22:603	Mayzard et al. (1976), Napolitano (1998), Viso & Marty (1993), Volkman et al. (1998)
<b>Eustigmatophycées</b>	16:107 / 20:503	Dalsgaard et al. (2003), Volkman et al. (1999), Zhukova & Aizdaicher (1995)
<b>Prasinophycées</b>	16:403 / 18:303; 403 / 20:503	Dunstan et al. (1992), Zhukova & Aizdaicher (1995)
<b>Prymnesiophycées</b>	16:107 / 18:403 / 20:503 / 22:603 (chez certaines espèces)	Bell & Pond (1996), Pond & Harris (1996), Volkman et al. (1991), Zhukova & Aizdaicher (1995)
<b>Raphidophycées</b>	16:107 / 18:403 / 20:503	Marshall et al. (2002), Nichols et al. (1987)
<b>Cyanobactéries</b>	16:0; 107 (chez certains genres) Absence: AG supérieur à 18 C excepté 18:206 (non négligeable); 303 (chez certains genres) 20:503 (biosynthèse en petites quantités)	Dijkman et al. (2010), Vargas et al. (1998), Merritt et al. (1991)
<b>Macroalgues</b>	18:0; 109 (Chlorophycées, Phaeophycées) 20:406 (Rhodophycées, Phaeophycées)	Dembitsky et al. (1993), Fleurence et al. (1994), Kayama et al. (1989), Khotimchenko et al. (2002)
<b>Végétaux terrestres</b> <i>Angiospermes terrestres et aquatiques</i>	18:206 et/ou 18:303 Acides Gras Saturés à plus de 24 C (proportions non négligeables)	Harwood & Russel (1984)

### IV.3. Consommateurs

Les cours d'eau de tête de bassin versant abritent une diversité élevée d'organismes. Durant ces travaux, nous nous intéresserons plus particulièrement aux consommateurs principaux du réseau trophique, les détritivores (*Confer*, **Figure 5**), et plus particulièrement au déchiqueteur de la famille des *Gammaridae*, *Gammarus fossarum*.

#### IV.3.a. Détritivores

Les détritivores ont été définis comme la « Catégorie d'êtres vivants qui se nourrissent de débris d'origine végétale ou animale constituant la matière organique morte » ([Ramade, 2008](#)).

Chez les macroinvertébrés détritivores, vivant dans les cours d'eau de tête de bassin versant, nous distinguons plusieurs groupes fonctionnels en fonction des adaptations morpho-comportementales d'acquisition de la nourriture et de la nature de la ressource. Cummins et collaborateurs ([Cummins & Klug, 1979](#) ; [Gallo, 2003](#) ; [Cummins, 2016](#)) définissent ainsi trois groupes fonctionnels :

- les collecteurs (« *Gathering & filtering collectors* ») : collecteurs de particules fines en suspension dans la colonne d'eau, comme certaines larves d'éphémères (*Ephemeridae*), diptères (*Simuliidae*) et trichoptères (*Hydropsychidae*),
- les racleurs (« *Scrapers* ») : (qualifiés parfois de brouteurs) prélèvent le périphyton (mélange d'algues, bactéries champignons et de dépôts de matières organiques particulières, à la surface du substrat et/ou sédiment), comme les larves d'éphémères (*Heptageniidae*)
- les déchiqueteurs (« *Shredders* ») : broyeurs qui fragmentent la matière organique de grande taille en particules fines, comme les *Gammaridae*, certains gastéropodes (*Planorbidae*) et les trichoptères (*Limnephilidae* et *Calamoceridae*).

Cette grande diversité de détritivores ([Covich, Palmer & Crowl, 1999](#)) est l'un des moteurs de la décomposition des débris allochtones ([Gessner et al., 2010](#)) et, en conséquence, du fonctionnement général des ruisseaux de tête de bassin versant ([Gessner & Chauvet, 2002](#) ; [Chauvet et al., 2016](#)). Les différents groupes trophiques vont générer des fèces et pseudo-fèces sous formes de particules grossières (CPOM) ou de particules fines (FPOM). L'action mécanique des déchiqueteurs accélère ce processus (par rapport à la simple production de CPOM et FPOM par l'action du compartiment microbien) et peut faciliter un accès plus rapide à une plus grande quantité de CPOMs et FPOMs ([Cummins et al., 1973](#) ; [Short & Maslin, 1977](#)) pour d'autres groupes. Cette contribution favorisant le processus de décomposition de la matière en fait l'un des groupes clefs les plus importants (avec les décomposeurs microbiens) pour le fonctionnement

des écosystèmes détritiques, dans l'étude de la qualité des eaux de surfaces (Groom & Hildrew, 1989).

Les invertébrés déchetiers aquatiques, de manière générale, préfèrent se nourrir sur des litières préalablement colonisées par des hyphomycètes aquatiques en comparaison à des feuilles non colonisées (Bärlocher, 1985 ; Suberkropp, 2003) et changeront continuellement de substrats pour se nourrir sur des litières colonisées (les plus appétentes) (Cummins & Klug, 1979 ; Gessner & Chauvet, 1994). Ils présentent également des préférences vis à vis de certaines espèces d'hyphomycètes aquatiques (Arsuffi & Suberkropp, 1989) mais également vis-à-vis de l'espèce de litière colonisée (Bärlocher & Kendrick, 1973 ; Danger *et al.*, 2013 a ; Jabiol *et al.*, 2014) suivant l'état d'avancement de la colonisation microbienne. Il a également été démontré que les traits d'histoire de vie de ces organismes étaient significativement impactés par la consommation de ces différentes ressources (Chung & Suberkropp, 2009 ; Danger *et al.*, 2013 a). Cette dépendance des populations d'invertébrés déchetiers des cours d'eau de tête de bassin versant vis-à-vis des apports allochtones de matière organique sous forme de litière végétale déritique est un élément important du RCC (Vannote *et al.*, 1980 ; Minshall *et al.*, 1983). Les invertébrés déchetiers peuvent également présenter une très grande plasticité alimentaire (Dangles & Guérol, 2001 ; Kelly, Dick & Montgomery, 2002 a b).

#### IV.3.b. *Gammaridae*

Les gammarides sont des Crustacés Amphipodes , ordre qui compte de 6000 à 9000 espèces, largement répandues dans les écosystèmes marins, d'eaux douces ou terrestres (Jażdżewski, 1980 ; Väinölä *et al.*, 2008 ; Kunz, Kienle & Gerhardt, 2010). Sur les 304 espèces répertoriées composant la famille des *Gammaridae* (Väinölä *et al.*, 2008), plus d'une centaine d'espèces épigées dulçaquicole distribuées dans tout l'hémisphère Nord appartiennent au genre *Gammarus* (Karaman & Pinkster, 1977 ; Kunz *et al.*, 2010). Les 3 espèces les plus représentées et étudiées en Europe de l'Ouest sont certainement *Gammarus fossarum* (Koch, 1835), *G. pulex* (Linné, 1758) et *G. roeseli* (Gervais, 1835).

Le genre *Gammarus* est largement répandu dans la région Paléarctique (Karaman & Pinkster, 1977 ; Grabowski, Bacela & Konopacka, 2007). Ces organismes sont retrouvés autant dans des eaux salées, que douces, et aussi bien dans des écosystèmes lotiques que lentiques. Ils peuvent s'adapter à des conditions variées et dominer la faune des macroinvertébrés benthiques du milieu, tant en termes de densité que de biomasse (MacNeil, Dick & Elwood, 1997). Ce sont surtout les exigences environnementales (Toman & Dall, 1998 ; Pöckl, Webb & Sutcliffe, 2003) et les contraintes géographiques et abiotiques (température, luminosité, alcalinité, teneur en oxygène, teneur en calcium, pH, vitesse de courant, xénobiotiques, etc.) (Peeters &

Gardeniers, 1998 ; Duran, 2007) qui vont influencer la répartition (voir cohabitation) des différentes espèces. Malgré cette large répartition, nous les retrouvons majoritairement dans les zones ombragées (ripisylve, débris dans le cours d'eau, etc.) composées de substrats minéraux divers (galets, sable, graviers...) ainsi que des substrats organiques, herbiers ou zones d'accumulation de litière végétale, servant à la fois de ressource alimentaire et d'abri contre les prédateurs. Cette préférence écologique varie sensiblement en fonction des espèces (Peeters & Gardeniers, 1998). Par exemple, Felten *et al.* (2008) ont mis en évidence, grâce à des analyses de contenus stomacaux sur différentes classes de taille de *G. fossarum*, une très grande diversité d'items alimentaires : des détritiques amorphes fins, de plus larges morceaux de litières ou de bois, des diatomées, des algues filamenteuses, des bryophytes, des matières animales ainsi que des particules minérales. Ces trois derniers items pouvant représenter jusqu'à 30-40% du contenu digestif. Cette diversité dans leur alimentation pourrait en partie expliquer leur large répartition et le fait que nous les retrouvons dans un grand nombre d'habitats variés (MacNeil *et al.*, 1997). Certaines espèces présentent même des comportements de prédation voire de cannibalisme (Dick, 1995 ; MacNeil *et al.*, 1997 ; Kelly *et al.*, 2002 b a). *In fine*, les gammares peuvent être considérés comme des détritivores, herbivores, carnivores, autant proies que prédateurs, mais surtout comme des opportunistes (MacNeil *et al.*, 1997 ; MacNeil, Dick & Elwood, 1999).

Les gammares, en tant que proies, sont considérés comme l'une des ressources alimentaires non négligeables pour d'autres macroinvertébrés, amphibiens, poissons (Baudin & Garnier-Laplace, 1994 ; MacNeil *et al.*, 1999) et même oiseaux (MacNeil *et al.*, 1999 ; Beisel & Médoc, 2010). Ils participent également aux processus fonctionnels en jeu dans ces écosystèmes en tant que prédateurs et/ou nécrophages (Dick, 1995 ; Kelly *et al.*, 2002 a) mais surtout en tant qu'organismes impliqués dans la fragmentation de la litière végétale allochtone (Wallace & Webster, 1996 ; MacNeil *et al.*, 1997, 1999 ; Dangles & Guérol, 2001 ; Kelly *et al.*, 2002 b ; VanDokkum *et al.*, 2002). L'action des macroinvertébrés déchiqueteurs est crucial dans la fragmentation de la transformation de la matière détritique et dans son transfert dans l'ensemble du réseau trophique (Navel *et al.*, 2011). Cependant la majorité des métazoaires présents dans le milieu ne peuvent prendre en charge cette matière détritique telle quelle. La colonisation initiale des détritiques par les microorganismes décomposeurs va initier le processus de décomposition, ce dernier pouvant être favorisé par les détritivores déchiqueteurs avec leur action de fragmentation. La fragmentation de la matière détritique permet la conversion des particules de matière organique grossières (CPOM, > 1mm) en particules fines (FPOM, entre 0.45µm et 1mm) plus facilement accessible pour les autres acteurs du réseau trophique (Anderson & Sedell, 1979 ; Wallace & Webster, 1996 ; Dangles & Guérol, 2001 ; Navel *et al.*, 2011). Se présentant sous formes de fèces et pseudo-fèces, ces particules seront transportées via le courant le long du cours d'eau en alternance avec des phases de dépôts sur différents substrat (Cushing, Minshall

& Newbold, 1993). Elles pourront ainsi servir de ressources pour de nombreuses espèces (Figure 2) tel que des collecteurs (passifs et actifs), les brouteurs ou racleurs permettant ainsi l'intégration des nutriments allochtones (C, N, P) dans le réseau trophique (Cushing *et al.*, 1993 ; Wallace & Webster, 1996). Plus qu'une simple intégration, Navel *et al.* (2011) ont montré une augmentation des taux d'assimilation chez le collecteur *Niphargus rhenorhodanensis* en présence de *G. roeseli* fragmentant la litière. D'autres études ont mis en évidence une baisse significative de la production et du transfert des FPOMs lors d'une diminution drastique des communautés de déchiqueteurs benthiques (Wallace, Webster & Cuffney, 1982 ; Wallace & Webster, 1996) malgré la production des FPOMs par brassage et abrasion de la litière végétale dans les cours d'eau ainsi que par l'activité du compartiment microbien (Anderson & Sedell, 1979). Les macroinvertébrés déchiqueteurs benthiques, et plus précisément les gammarès, représentent donc un groupe important et peuvent présenter un intérêt comme organismes modèles pour étudier le fonctionnement des écosystèmes (Covich, Palmer & Crowl, 1999 ; Clarke *et al.*, 2008) ainsi que le cycle des nutriments et de la matière organique dans les cours d'eau. En effet, *Gammarus sp.* est reconnu comme un organisme modèle d'eau douce pour les tests en laboratoire, notamment en raison de sa large distribution dans les rivières d'Europe (Jażdżewski, 1980) et de sa facilité de maintien en laboratoire. La diversité de ses représentants présentent différents degrés de sensibilité face à une majorité de polluants environnementaux à large échelle (Kunz *et al.*, 2010), ce qui fait de *Gammarus sp.* un excellent candidat pour les tests d'écotoxicité (Arce-Funck *et al.*, 2013 b ; Chaumot *et al.*, 2015 ; Andreï, 2015 ; Andreï *et al.*, 2016).

## V. Problématique

Dans ces travaux de thèse, nous avons mis en place plusieurs expérimentations visant à comprendre la nature et l'intensité des limitations en jeu dans le fonctionnement des cours d'eau de tête de bassin versant. Les deux paramètres suivis ont principalement concerné la disponibilité en éléments chimiques (N et P) ainsi que celle en acides gras polyinsaturés.

Dans un premier temps, nous nous sommes concentrés sur l'influence de gradients d'azote ( $\text{NO}_3^-$ ) et de phosphore ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) sur les processus fonctionnels (décomposition des litières, production primaire et secondaire) dans les cours d'eau de tête de bassin versant subissant diverses pressions abiotiques :

1) dans un contexte forestier ayant été soumis par le passé à des processus d'acidification actuellement en cours de récupération, et dont les concentrations en azote ne cessent de diminuer,

2) dans un contexte de plaine le long d'un gradient de pression agricole, générant de fait un gradient de disponibilité en nutriments (N et P).

En second lieu, nous nous sommes concentrés sur le rôle des biofilms phototrophes en émettant comme hypothèse que ces biofilms constitueraient une source sous-estimée et potentiellement essentielle d'acides gras polyinsaturés dans les cours d'eau de tête de bassin versant. En particulier, nous avons :

- 1) tenté de vérifier *in natura*, le long d'un gradient d'acidification, la production et la qualité des biofilms phototrophes dans des cours d'eau forestiers,
- 2) évalué expérimentalement l'impact et l'importance fonctionnelle de la consommation d'algues benthiques par un macroinvertébré détritivore, *Gammarus fossarum*.



## **CHAPITRE II :**

Influence et rôles des nutriments sur le processus de décomposition dans les cours d'eau de tête de bassin versant.



## Partie I. Vers une restauration spontanée des cours d'eau acidifiés ? : Étude diachronique (1998-2015) dans des cours d'eau de tête de bassin versant des Vosges (Nord-Est, France).

### I. Introduction

Au cours du XX<sup>ième</sup> siècle, des décennies de dépôts atmosphériques acides ont sévèrement affecté les écosystèmes aquatiques continentaux dans de nombreuses régions de l'hémisphère nord (Erisman & Draaijers, 1995 ; Driscoll *et al.*, 2001). Compte tenu des conséquences délétères de ces dépôts atmosphériques acides (provenant d'émissions à longues distances) sur les écosystèmes terrestres et aquatiques, les gouvernements des pays concernés ont pris, à partir de la fin des années 70, différents engagements nationaux (par exemple le « Clean Air Act » aux USA) et internationaux (comme la « Convention on Long Range Transboundary Air Pollution » en Europe) pour réduire les émissions atmosphériques de NO<sub>x</sub> et SO<sub>2</sub> (Likens, Butler & Buso, 2001). Conséquence de ces mesures d'abattement, les émissions ont fortement diminuées (**Figure 10**) et dans de nombreuses régions, des signes de restauration des caractéristiques physico-chimiques des milieux ont été observés (Stoddard *et al.*, 1999 ; Skjelkvåle *et al.*, 2005 ; Waldner *et al.*, 2014 ; Lawrence *et al.*, 2015).

Cependant, cette restauration spontanée de la qualité physico-chimique demeure lente, hétérogène et, dans certaines régions, les problèmes d'acidification persistent et représentent toujours une cause importante de dégradation des écosystèmes (Stoddard *et al.*, 1999). Cette absence ou ce retard de restauration peut s'expliquer par : i) les quantités importantes de composés soufrés accumulés dans les sols et qui sont encore lessivés, ii) le maintien, voir l'augmentation dans certaines régions des dépôts atmosphériques en NH<sub>3</sub>, iii) l'appauvrissement des sols en cations basiques suite aux dépôts acides passés, et iv) la diminution des dépôts de cations basiques (Likens, Driscoll & Buso, 1996 ; Lawrence *et al.*, 1999 ; Alewell *et al.*, 2001 ; Evans *et al.*, 2001).

Quand des signes de restauration spontanée sont observés, ces derniers se manifestent dans l'eau par une diminution des concentrations en sulfates (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) et en aluminium (Al) conjugués à une augmentation du pH et de la capacité à neutraliser les acides. Cependant, une restauration spontanée des caractéristiques physico-chimiques semble rarement suivie d'une restauration biologique (Malcolm *et al.*, 2014 a b) et quand elle se produit, les changements dans les communautés aquatiques (par exemple, le retour d'espèces acido-sensibles) demeurent modestes.

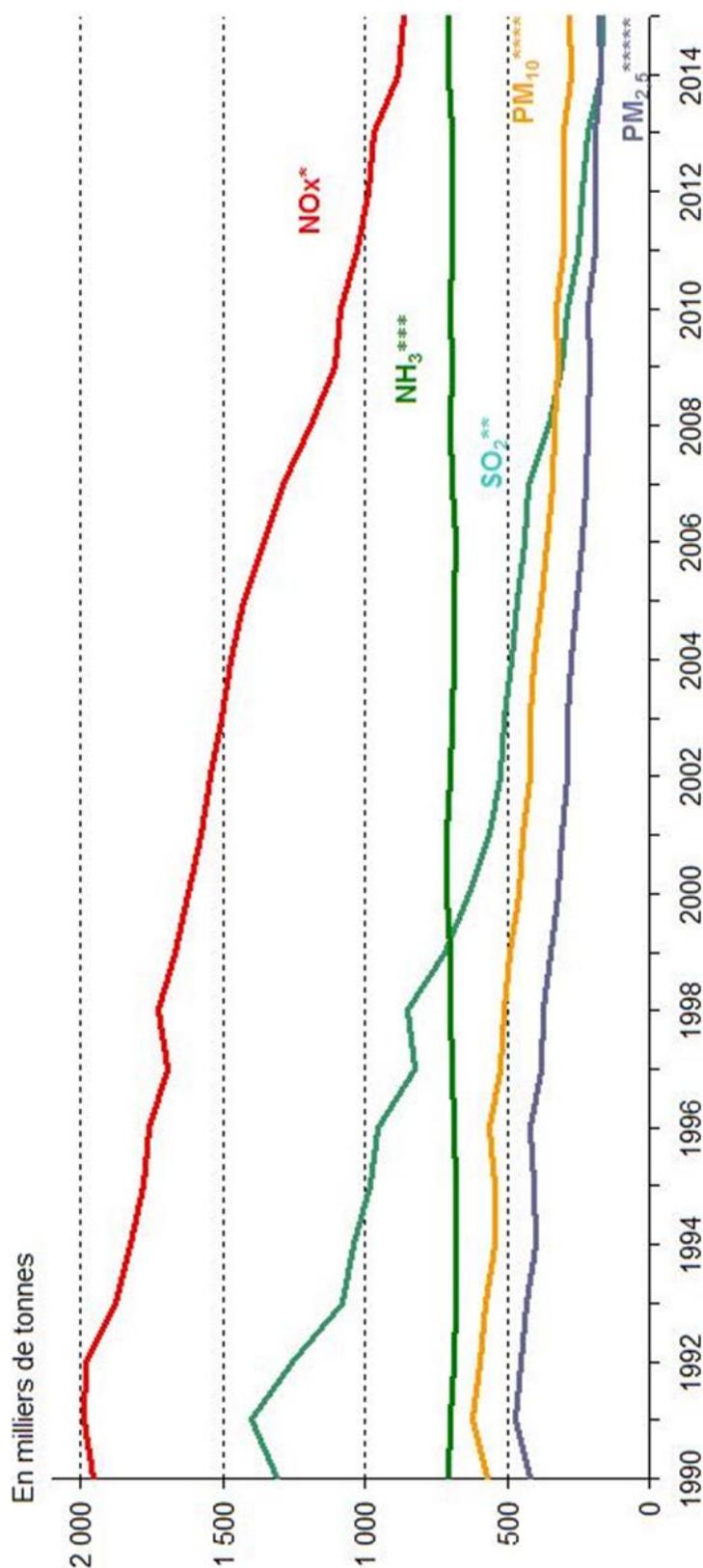


Figure 10 : Evolution des émissions de NO<sub>x</sub>, -SO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> et de particules en France métropolitaine (Ministère de la transition écologique et solidaire, 2017).

**Notes sur les sources** : industrie : transformation d'énergie et industrie manufacturière ; transports : transport routier et autres transports (aérien, ferroviaire, fluvial et maritime) ; \* oxydes d'azote (NO<sub>x</sub>) ; \*\* dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>) ; \*\*\* ammoniac(NH<sub>3</sub>) ; \*\*\*\* particules de diamètre inférieur à 10µm (PM<sub>10</sub>) ; \*\*\*\*\* particules de diamètre inférieur à 2,5µm (PM<sub>2.5</sub>).

Ainsi, il apparaît que malgré les efforts réalisés pour diminuer les émissions et donc les dépôts atmosphériques, les écosystèmes aquatiques devraient demeurer chroniquement ou épisodiquement perturbés par l'acidification durant encore de nombreuses années (Driscoll *et al.*, 2001).

Une meilleure compréhension de ce que peut être la restauration des écosystèmes ayant subis des processus d'acidification doit reposer sur une évaluation efficace. La plupart des programmes d'évaluation se sont limités au suivi de la chimie des masses d'eau de surface, alors que les effets sur les communautés biologiques et surtout la réalisation des processus fonctionnels ne sont pas suffisamment étudiés (Lancaster *et al.*, 1996 ; Bradley & Ormerod, 2002).

Dans un contexte global d'évaluation de la qualité biologique des cours d'eau, l'analyse de la composition et de la structure des communautés (macroinvertébrés benthiques, diatomées, poissons) demeure le fondement des principales méthodes d'évaluation (Birk *et al.*, 2012 ; O'Brien *et al.*, 2016). Cependant, la structure des communautés et les fonctions écosystémiques ne sont pas toujours couplées et différentes propositions visant à prendre en compte des processus fonctionnels comme indicateurs dans les programmes de bioévaluation ont été formulées (voir par exemple : Gessner & Chauvet, 2002 ; Young, Matthaei & Townsend, 2008).

Les principaux exemples de processus écosystémiques potentiellement pertinents pour le suivi de l'état de santé et la conservation des cours d'eau concernent les suivis de la production primaire, de la disponibilité ou de la rétention des nutriments, ou encore de la décomposition de la matière organique allochtone (Minshall, 1996 ; Giller & Malmqvist, 1998 ; Gessner & Chauvet, 2002). Parmi ces processus fonctionnels, la décomposition des litières est un processus bien connu et qui a fait l'objet de très nombreuses études sur un plan fondamental. Il s'agit d'un processus clé dans l'approvisionnement en carbone organique et en énergie de l'ensemble du réseau trophique que l'on qualifie alors de détritique (Maltby, 1996). La sensibilité de ce processus à différentes altérations comme par exemple les pollutions métalliques (Ferreira *et al.*, 2015, 2016 a), les pollutions par les nutriments (Ferreira *et al.*, 2015), la contamination par les pesticides (Brosed, Lamothe & Chauvet, 2016) ou encore la dégradation de l'hydromorphologie (Colas *et al.*, 2017) en font un processus clé pour proposer des approches fonctionnelles d'évaluation de l'intégrité des écosystèmes.

En ce qui concerne l'acidification des cours d'eau forestiers, différentes études ont montré que la décomposition des litières était également un processus très sensible à ce type de perturbation dans les têtes de bassins versants (Dangles *et al.*, 2004 ; Baudoin *et al.*, 2008 ; Cornut *et al.*, 2012 ; Clivot *et al.*, 2013). Plus récemment, en se basant sur une étude *in situ* couplée à une méta-analyse, Ferreira & Guérol (2017), ont généralisé l'intérêt d'utiliser la décomposition des litières comme outil d'évaluation des effets de l'acidification.

Dans ce contexte, la présente étude affiche un double objectif : i) évaluer si la diminution des dépôts atmosphériques acides se traduit par une restauration des caractéristiques physico-chimiques des cours d'eau vosgiens acidifiés et ii) le cas échéant, si cette restauration physico-

chimique s'accompagne d'une restauration des fonctions assurées par les communautés de décomposeurs et détritivores associées à la décomposition des litières.

Pour cela, nous avons réalisé une étude diachronique permettant de comparer, à 16 ans d'intervalle, les caractéristiques physico-chimiques et les taux de décomposition de litières dans des cours d'eau vosgiens. En 1998-99, [Dangles et al. \(2004\)](#), ont étudié la décomposition de litières de hêtre (*Fagus sylvatica*, L.) dans 25 cours d'eau représentant un large gradient de niveau d'acidification. Les résultats de cette étude ont montré une forte réponse de la décomposition de la litière à l'acidification, confortant ainsi l'idée d'utiliser les taux de décomposition de la litière comme un outil pertinent et peu coûteux pour évaluer le fonctionnement de l'écosystème. En 2014-15, nous avons répliqué cette même étude, c'est à dire sur les mêmes sites, à la même période et en utilisant les mêmes protocoles.

## II. Méthodes

### II.1. Sites d'études

L'intégralité des sites d'étude sont situés dans le massif de moyenne montagne des Vosges localisé au Nord-Est de la France. L'altitude moyenne y est de 500m avec un point culminant à 1424m d'altitude.

Le climat vosgien est de type montagnard inférieur (des températures plus faibles et une pluviométrie plus élevée que dans les plaines voisines). Il est soumis aux influences océaniques et continentales dont l'intensité varie localement, suivant l'exposition du versant. Les températures moyennes annuelles ne dépassent pas 8°C à 600 m d'altitude et les précipitations, bien qu'abondantes (supérieures à 1000mm sur la quasi-totalité du massif), présentent d'importantes disparités (de 500 à 2400mm). La pluviométrie est d'ailleurs considérée comme un facteur majeur influençant le degré d'acidification des cours d'eau vosgiens ([Nedeltcheva, 2005](#)), d'autant plus dans les zones où la roche mère est pauvre en minéraux altérables.

Deux grands ensembles géologiques dominant le massif vosgien : des roches mères silicatées, gréseuses, au Nord et à l'Ouest et des roches cristallines principalement granitiques, au Sud et à l'Est (**Figure 11**).

Les Vosges sont caractérisées par l'importance du couvert forestier (70%) et sont dominées par la présence de hêtraies-sapinières, typiques de l'étage montagnard moyen. De nombreuses parcelles ont été déboisées et utilisées pour l'agriculture (surtout des prairies) jusqu'au milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle puis replantées le plus fréquemment avec de l'épicéa (*Picea abies*, L.). Aux plus hautes altitudes du massif, la lande et les pelouses dominant la plupart des sommets. Pour ce qui est du couvert herbacé, il est dominé par une flore acidophile : Myrtille

(*Vaccinium myrtillus*), Luzule (*Luzula* spp.), Canche (*Deschampsia flexuosa*) et Callune (*Calluna vulgaris*).

Le massif vosgien est parcouru par un important réseau hydrographique. Ce dernier est composé de petits bassins versants forestiers drainés majoritairement par des cours d'eau d'ordre 1 et 2. Compte tenu des caractéristiques édaphiques (roches pauvres en éléments minéraux et difficilement altérables), climatiques (forte pluviosité) et de l'occupation des sols (végétation acidophile, conifères), ces cours d'eau sont naturellement oligotrophes, peu minéralisés et sensibles aux dépôts atmosphériques acides (Guérol et al., 1997 ; Nedeltcheva, 2005).

Pour rappel, en 1998-99, Dangles (2000) avait réalisé une étude de la décomposition de litières de hêtre dans 25 cours d'eau vosgiens. Cet ensemble de cours d'eau drainant des grès et des granites permettait de disposer d'une gamme importante de niveaux d'acidification (ruisseaux très acides à neutres). Afin d'évaluer la restauration de ces cours d'eau, cette étude comparant les caractéristiques physico-chimiques et les taux de décomposition des litières a été reproduite à l'identique, sur les mêmes sites, en 2014-15. Le **Tableau 2** et la **Figure 14** donnent l'identité des cours d'eau, leurs principales caractéristiques et la localisation des stations. La végétation riparienne est principalement dominée par le sapin blanc (*Abies alba*, Mill), l'épicéa commun et le hêtre commun (cette dernière espèce contribuant majoritairement aux apports de feuilles mortes dans les cours d'eau). A l'exception de pratiques sylvicoles, aucune nouvelle influence de nature anthropique (habitations, agriculture, activités industrielles...) depuis 1998-99 n'a été observée en 2014-2015.

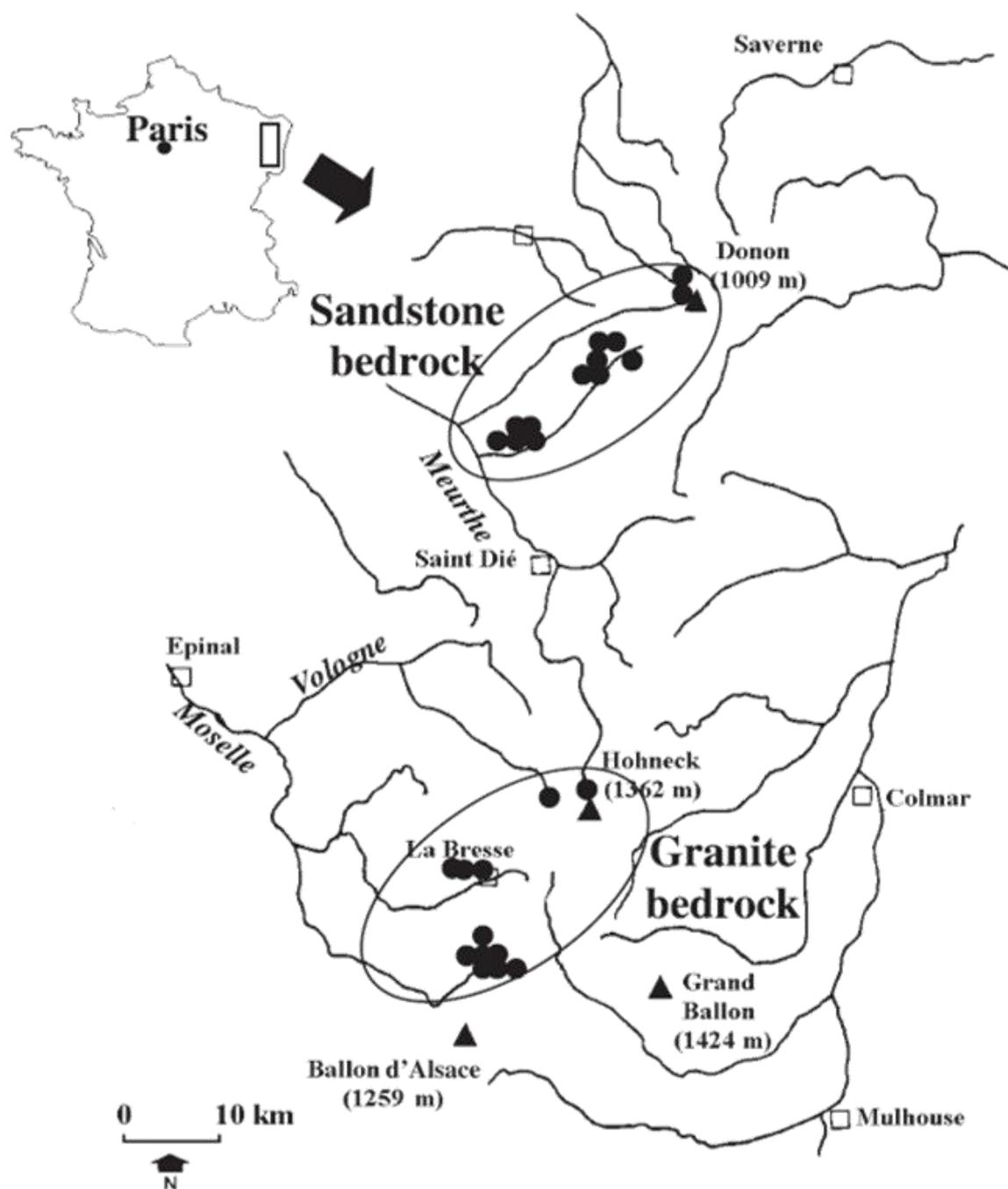


Figure 11 : Localisation des 25 sites d'études Vosgiens (Nord-Est de la France). D'après Dangles et al. (2004).

Tableau 2 : Caractéristiques des sites d'après Dangles et al. (2004).

Site	Code	Coordonnées WGS84 (degrés minutes)	Sous-sol géologique	Ordre	Altitude (m)	Distance à la source (m)	Largeur du chenal (m)	Pente du chenal (‰)	Végétation riparienne
Bas-Rupts	BR	6°52'54"E 48°02'17"N	Granite	1	845	900	1,4	20,0	<i>Abies alba</i> , <i>Fagus sylvatica</i>
Chevrosgoutte	CH	6°55'01"E 48°24'21"N	Grès	1	390	1500	1,2	28,0	<i>F. sylvatica</i> , <i>Picea abies</i> , <i>A. alba</i>
Echarges	EC	6°54'29"E 47°58'39"N	Granite	1	730	2000	2,3	14,0	<i>F. sylvatica</i> , <i>A. alba</i>
Grands-Clos	GC	6°52'35"E 47°58'47"N	Granite	1	650	1750	2,3	21,1	<i>F. sylvatica</i> , <i>A. alba</i>
Gentil Sapin	GS	7°05'23"E 48°02'17"N	Grès	1	510	3100	2,3	10,0	<i>A. alba</i> , <i>F. sylvatica</i> , <i>P. abies</i> , <i>Acer pseudoplatanus</i>
Hauts-Rupts	HR	6°53'37"E 48°02'41"N	Granite	2	855	2550	3,3	13,9	<i>A. alba</i> , <i>F. sylvatica</i>
Longfoigneux	LG	6°52'17"E 47°58'15"N	Granite	1	600	1180	1,3	22,0	<i>F. sylvatica</i> , <i>A. alba</i>
La Maix 1	LM1	7°05'40"E 48°29'03"N	Grès	1	516	2200	2,0	8,0	<i>F. sylvatica</i> , <i>A. alba</i> , <i>Alnus glutinosa</i>
La Maix 2	LM2	7°05'07"E 48°28'06"N	Grès	2	512	2250	2,0	8,0	<i>F. sylvatica</i> , <i>A. alba</i> , <i>A. glutinosa</i>
La Maix 3	LM3	7°03'36"E 48°29'34"N	Grès	1	514	30	1,3	3,0	<i>F. sylvatica</i> , <i>A. alba</i> , <i>A. glutinosa</i>
La Maix 4	LM4	7°05'16"E 48°29'08"N	Grès	2	410	4900	2,2	9,5	<i>F. sylvatica</i> , <i>P. abies</i> , <i>A. alba</i> , <i>A. glutinosa</i>
Malfosse	MA	6°56'07"E 48°25'18"N	Grès	2	350	3400	5,0	8,0	<i>F. sylvatica</i> , <i>P. abies</i> , <i>A. alba</i>
Madeleine	MD	7°07'50"E 48°27'26"N	Grès	1	510	2400	1,9	16,0	<i>F. sylvatica</i> , <i>P. abies</i> , <i>A. alba</i>
Meurthe	ME	7°00'52"E 48°04'50"N	Granite	1	825	3300	2,9	6,8	<i>F. sylvatica</i> , <i>A. alba</i> , <i>pasture</i>
Moyens-Rupts	MR	6°52'55"E 48°02'24"N	Granite	1	850	1000	1,6	24,0	<i>A. alba</i> , <i>F. sylvatica</i>
Plaine	PL	7°08'24"E 48°31'39"N	Grès	2	490	4900	4,9	3,3	<i>F. sylvatica</i> , <i>P. abies</i> , <i>A. alba</i> , <i>A. glutinosa</i>
Ravines	RA	6°57'08"E 48°25'47"N	Grès	1	410	3300	2,5	6,0	<i>F. sylvatica</i> , <i>P. abies</i> , <i>A. alba</i>
Rabodeau	RB	7°03'21"E 48°27'35"N	Grès	2	520	5000	4,9	16,0	<i>A. alba</i> , <i>F. sylvatica</i> , <i>P. abies</i> , <i>A. pseudoplatanus</i>
Repafosse	RE	6°57'16"E 48°25'31"N	Grès	1	405	1809	2,1	6,0	<i>F. sylvatica</i> , <i>P. abies</i> , <i>A. alba</i>
Rouge-Rupt	RR	6°53'19"E 47°58'28"N	Granite	2	675	4700	5,5	8,4	<i>F. sylvatica</i> , <i>A. alba</i>
Tihay	TI	6°52'32"E 47°58'50"N	Granite	1	660	1250	1,8	20,0	<i>A. alba</i> , <i>F. sylvatica</i> , <i>prairie</i>
Truite	TR	7°08'47"E 48°28'08"N	Grès	1	500	2500	2,1	12,0	<i>F. sylvatica</i> , <i>P. abies</i> , <i>A. alba</i>
Ventron	VE	6°55'22"E 47°58'18"N	Granite	1	820	2500	1,5	10,0	<i>F. sylvatica</i> , <i>A. alba</i>
Vologne	VO	6°59'36"E 48°03'17"N	Granite	1	810	2100	3,1	19,5	<i>F. sylvatica</i> , <i>A. alba</i>
Wassongoutte	WA	6°53'22"E 47°58'40"N	Granite	1	690	2600	2,0	13,8	<i>F. sylvatica</i> , <i>A. alba</i>

## II.2. Chimie de l'eau

Les paramètres chimiques ont été mesurés mensuellement de Décembre 2014 à Juin 2015. Pour cela, des échantillons d'eau ont été prélevés dans des bouteilles de 500ml en polyéthylène. Le pH a été mesuré en laboratoire avec un pH-mètre microprocesseur (pH 3000, WTW). La capacité à neutraliser les acides (Acid-Neutralizing Capacity, ANC) des échantillons, a été déterminée par titration de Gran (Gran, 1952). La conductivité a été mesurée avec un conductimètre Metrohm Heriseau E518 (Herisau, Suisse) à 25°C (les données de 1998-99, mesurées à l'époque à 20°C ont été corrigées par un facteur de 1,116 pour assurer la comparaison avec les données de 2014-15). Les concentrations en  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ont été mesurées par spectrophotométrie d'absorption atomique (AAS) en flamme et les concentrations en aluminium total en AAS au four graphite après acidification au  $\text{HNO}_3$  (AAnalyst 100; Perkin Elmer and SpectrAA 300; Varian). Les concentrations en  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  et  $\text{NO}_3^-$  ont été mesurées par chromatographie ionique (Dionex 4500i, colonne AS4ASC ; Sunnyvale, USA).

## II.3. Décomposition de la litière

A l'automne 2014, des feuilles de hêtre ont été collectées à l'abscission sur le même site qu'en 1998. Les litières ont ensuite été séchées à l'air libre jusqu'à masse constante et des lots de 3g de feuilles sèches ont été insérés dans des sacs à litière (15x10cm) présentant un vide de maille de 5mm. Ils ont été immergés sur chaque site le 11 Décembre 2014 par François Guérol et Philippe Wagner. Pour cela, ils ont été maintenus en place sur le fond du cours d'eau et fixés à la rive des cours d'eau grâce à un câble métallique plastifié sur lequel des blocs rocheux ont été disposés (**Figure 12**). Après 200 jours d'immersion, 4 répliqués par site ont été prélevés, placés dans des sachets zip-lock identifiés contenant de l'eau du site et transportés jusqu'au laboratoire dans une glacière par Alice Gossiaux, Philippe Wagner et moi-même. Au laboratoire, les feuilles ont été délicatement rincées avec l'eau du site afin d'en retirer les particules fines et les invertébrés. Une fois nettoyées, les feuilles ont été séchées à l'air libre jusqu'à masse constante puis pesées. Des aliquots ont ensuite été réduits en cendres au four à moufle (4h à 550°C) puis pesés afin pour d'obtenir les masses sèches sans cendres (MSSC). Des échantillons initiaux de litière ont suivi le même traitement dans le but de corriger la masse initiale.



Figure 12 : Exemple de mise en place du dispositif de sacs GM.

#### II.4. Données 1998-99 utilisées dans la présente étude

De l'étude réalisée par [Dangles et al. \(2004\)](#), nous avons utilisé : i) les variables physico-chimiques mesurées mensuellement entre Décembre et Juin sur l'ensemble des cours d'eau et ii) les masses restantes après 200 jours. La comparaison à 15 années d'intervalle des données physico-chimiques et de décomposition peuvent permettre de révéler d'éventuels changements de la qualité physico-chimique en réponse à la diminution des dépôts acidifiants et, le cas échéant, si ces changements se sont traduits par une modification du processus de décomposition des litières, en l'occurrence ici la vitesse de décomposition de litières de hêtre.

#### II.5. Détermination des taux de décomposition

Le calcul du taux de décomposition ( $k$ ) à partir des masses sèche sans cendres (MSSC) obtenues après avoir brûlé les échantillons 4h à 550°C) des litières est dérivé du modèle exponentiel selon la transformation logarithmique suivante ([Brosed et al., 2016](#)) :

$$k = -\ln\left(\frac{m_f}{m_i}\right) \cdot t^{-1}$$

Avec :  $m_i$  : la masse sèche initiale (MSSC en g) ;  $m_f$  : la masse restante (MSSC en g) et  $t$  : la durée d'exposition (j).

#### II.6. Analyse des données

L'évolution physico-chimique des différents sites a été évaluée en effectuant des tests de Student (test t) de comparaison de moyennes pour chaque paramètre entre les 2 périodes.

Nous avons également effectué une analyse en composante principale (ACP) sur chaque période. Pour se soustraire de la variabilité inhérente aux sites nous avons également effectué une ACP intra-classe ( $wca$  : analyse normée centrée prenant en compte la variabilité globale et non site par site) sur les deux périodes que nous avons complété par un test t sur les coordonnées des points du plan de l'ACP $_{wca}$ .

Les taux de décomposition à T200 entre les deux périodes ont été analysés par le test non paramétrique de Mann-Whitney (test U). Une analyse similaire a été effectuée en séparant les cours d'eau acidifiés et non-acidifiés par une ANOVA de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunn. Des corrélations de Spearman ont été utilisées pour étudier les relations entre les taux de décomposition et les moyennes des principaux paramètres chimiques.

Toutes les analyses ont été effectuées sur le logiciel R Studio (v 0.98.1091) ([R Development Core Team, 2015](#)).

### III. Résultats

#### III.1. Paramètres physico-chimiques

##### III.1.a. Comparaison des moyennes

Les données moyennes des principaux paramètres suivis en 1998-99 et 2014-15 ont été rassemblées dans le **Tableau 3** (Complément en **Annexe 1**) et leurs comparaisons ont été représentées avec des graphiques biplots entre les deux périodes.

Nous observons des modifications marquées des caractéristiques physico-chimiques des cours d'eau entre 1998-99 et 2014-15 (**Tableau 4** et **Figure 13**). Ainsi, le pH des cours d'eau a significativement augmenté de 0,35 unité (test t :  $p < 0,0001$ ) et l'ANC de  $52 \mu\text{eq.L}^{-1}$  (test t ;  $p < 0,001$ ).

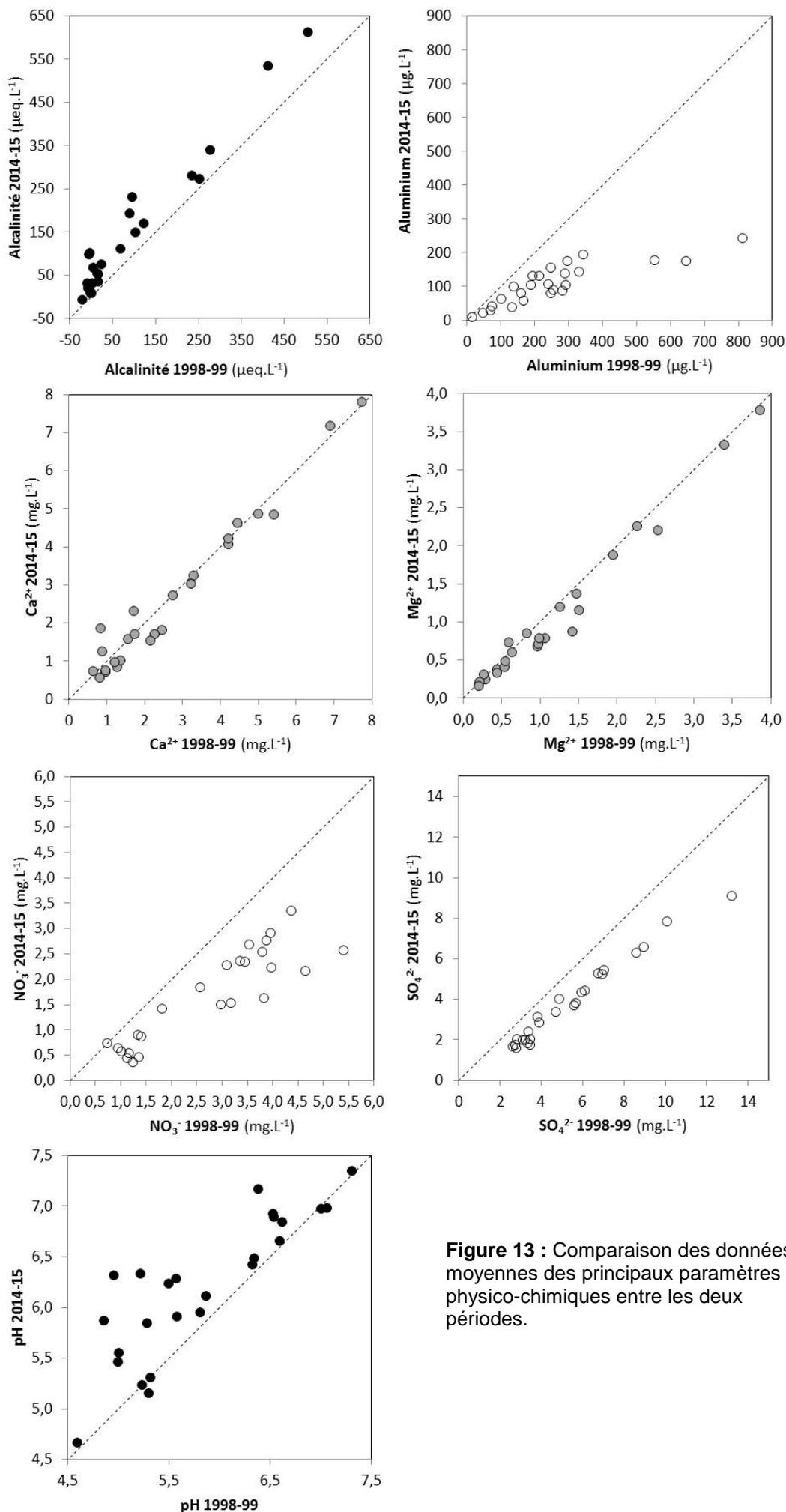
Cette amélioration de la qualité des eaux s'accompagne d'une forte diminution des concentrations en Al total (près de 60% ; test t :  $p < 0,001$ ), l'Al représentant le principal facteur de toxicité des eaux acides.

Si l'on considère, les principaux traceurs de dépôts atmosphériques  $\text{SO}_4^{2-}$  et  $\text{NO}_3^-$ , nous observons également une diminution marquée des concentrations (test t ;  $p < 0,001$ ) qui semble traduire une réduction des dépôts atmosphériques azotés et soufrés.

Enfin, bien que les concentrations moyennes en calcium et en magnésium aient diminué dans certains cours d'eau, les différences entre les moyennes de tous les cours d'eau ne sont pas significatives.

**Tableau 3 : Principales caractéristiques (moyenne ± écart-type) physico-chimiques des sites d'études en 1998-99 et 2014-15.**

Site	pH		Alcalinité (µeq.L <sup>-1</sup> )		Ca <sup>2+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )		Mg <sup>2+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )		SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )		Al (µg.L <sup>-1</sup> )	
	1998-99	2014-15	1998-99	2014-15	1998-99	2014-15	1998-99	2014-15	1998-99	2014-15	1998-99	2014-15	1998-99	2014-15
	Moy. ± Et.	Moy. ± Et.	Moy. ± Et.	Moy. ± Et.	Moy. ± Et.	Moy. ± Et.	Moy. ± Et.	Moy. ± Et.	Moy. ± Et.	Moy. ± Et.	Moy. ± Et.	Moy. ± Et.	Moy. ± Et.	Moy. ± Et.
BR	5,00 ± 0,32	5,46 ± 0,35	-5,89 ± 7,67	19,77 ± 12,48	0,98 ± 0,13	0,70 ± 0,10	0,44 ± 0,06	0,37 ± 0,05	1,34 ± 0,67	0,90 ± 0,56	3,47 ± 0,34	1,71 ± 0,26	343,78 ± 93,97	193,88 ± 58,24
CH	5,58 ± 0,58	6,28 ± 0,47	24,89 ± 49,08	75,55 ± 53,04	3,29 ± 0,32	3,25 ± 0,84	1,43 ± 0,20	0,87 ± 0,05	3,83 ± 0,45	1,62 ± 0,17	13,24 ± 1,28	9,09 ± 0,28	282,00 ± 168,13	86,88 ± 24,75
EC	5,50 ± 0,34	6,23 ± 0,42	5,78 ± 7,48	66,99 ± 54,64	0,90 ± 0,08	1,25 ± 1,09	0,29 ± 0,04	0,25 ± 0,03	1,17 ± 0,27	0,54 ± 0,27	2,85 ± 0,21	2,02 ± 0,24	195,33 ± 25,93	129,50 ± 21,87
GC	5,81 ± 0,23	5,95 ± 0,32	16,67 ± 3,57	35,23 ± 13,79	1,29 ± 0,11	0,84 ± 0,18	0,44 ± 0,05	0,33 ± 0,04	1,42 ± 0,39	0,85 ± 0,29	3,46 ± 0,27	2,01 ± 0,40	137,33 ± 22,73	98,63 ± 75,92
GS	4,60 ± 0,15	4,66 ± 0,36	-20,22 ± 7,56	-6,43 ± 10,81	1,38 ± 0,13	1,00 ± 0,23	0,55 ± 0,06	0,41 ± 0,08	5,41 ± 0,65	2,57 ± 0,39	5,69 ± 0,57	3,79 ± 0,34	813,56 ± 212,47	242,13 ± 131,33
HR	6,34 ± 0,24	6,49 ± 0,26	68,33 ± 33,73	110,36 ± 42,30	1,56 ± 0,29	1,58 ± 0,44	0,83 ± 0,13	0,84 ± 0,20	0,74 ± 0,28	0,72 ± 0,20	2,74 ± 0,33	1,75 ± 0,26	189,44 ± 31,35	103,88 ± 30,18
LG	5,29 ± 0,34	5,85 ± 0,47	3,56 ± 7,23	31,40 ± 33,25	0,98 ± 0,13	0,75 ± 0,48	0,27 ± 0,05	0,31 ± 0,04	1,35 ± 0,30	0,46 ± 0,31	3,39 ± 0,25	2,37 ± 0,33	291,78 ± 137,89	104,00 ± 44,43
LM1	6,33 ± 0,54	6,42 ± 0,60	122,89 ± 127,95	169,27 ± 120,71	3,24 ± 1,13	3,01 ± 1,35	1,48 ± 0,53	1,37 ± 0,63	3,46 ± 0,91	2,35 ± 0,38	5,62 ± 0,93	3,69 ± 0,23	289,00 ± 173,17	138,13 ± 109,77
LM2	6,54 ± 0,15	6,92 ± 0,30	277,56 ± 80,33	339,52 ± 124,56	5,00 ± 0,87	4,87 ± 1,42	2,27 ± 0,28	2,26 ± 0,58	3,81 ± 0,71	2,54 ± 0,30	6,13 ± 0,95	4,40 ± 0,41	166,78 ± 114,21	56,38 ± 65,62
LM3	7,31 ± 0,07	7,17 ± 0,19	505,22 ± 91,19	533,71 ± 74,56	7,74 ± 0,70	7,16 ± 1,25	3,86 ± 0,29	3,33 ± 0,15	3,36 ± 0,91	2,76 ± 0,20	7,04 ± 0,98	5,27 ± 0,62	69,00 ± 25,57	7,38 ± 12,32
LM4	6,38 ± 0,10	7,35 ± 0,16	412,44 ± 33,03	610,77 ± 105,80	6,92 ± 0,51	7,80 ± 1,32	3,39 ± 0,29	3,78 ± 0,56	3,88 ± 0,30	2,35 ± 0,23	6,77 ± 1,62	5,44 ± 0,38	16,78 ± 26,74	28,50 ± 21,81
MA	5,24 ± 0,40	5,24 ± 0,33	1,22 ± 10,32	8,65 ± 8,05	2,46 ± 0,09	1,82 ± 0,15	1,07 ± 0,11	0,78 ± 0,03	3,19 ± 0,59	1,52 ± 0,26	10,10 ± 1,45	7,83 ± 0,38	249,11 ± 188,55	80,00 ± 35,72
MD	5,58 ± 0,55	5,90 ± 0,87	15,67 ± 26,90	53,74 ± 50,83	1,75 ± 0,25	1,70 ± 0,60	0,64 ± 0,10	0,60 ± 0,17	3,97 ± 1,13	2,90 ± 0,49	4,72 ± 0,87	3,36 ± 0,40	553,56 ± 327,65	175,75 ± 128,93
ME	6,54 ± 0,14	6,89 ± 0,42	96,89 ± 21,32	230,51 ± 143,54	4,47 ± 0,53	4,62 ± 2,37	1,51 ± 0,14	1,15 ± 0,14	2,57 ± 0,46	1,83 ± 0,31	3,83 ± 0,33	3,11 ± 0,24	47,11 ± 16,52	21,00 ± 12,73
MR	5,87 ± 0,28	6,11 ± 0,27	16,22 ± 9,78	51,67 ± 18,80	1,22 ± 0,11	0,97 ± 0,17	0,55 ± 0,05	0,48 ± 0,08	0,95 ± 0,36	0,63 ± 0,26	3,36 ± 0,39	1,81 ± 0,26	214,00 ± 42,06	130,25 ± 31,80
PL	7,01 ± 0,15	6,97 ± 0,14	253,56 ± 63,94	272,26 ± 69,19	5,43 ± 0,48	4,84 ± 0,82	2,53 ± 0,22	2,20 ± 0,34	4,38 ± 0,71	3,35 ± 0,71	6,95 ± 0,59	5,22 ± 0,50	75,78 ± 42,98	41,38 ± 20,19
RA	5,32 ± 0,40	5,30 ± 0,41	-0,22 ± 9,16	10,36 ± 9,73	2,27 ± 0,10	1,71 ± 0,18	0,97 ± 0,13	0,68 ± 0,02	3,99 ± 0,53	2,22 ± 0,28	8,63 ± 1,33	6,28 ± 0,41	255,33 ± 163,89	89,88 ± 47,08
RB	4,96 ± 0,50	6,31 ± 0,84	-3,78 ± 25,09	97,95 ± 86,02	1,71 ± 0,31	2,30 ± 0,11	0,60 ± 0,13	0,73 ± 0,20	4,65 ± 0,63	2,16 ± 0,26	5,97 ± 0,45	4,31 ± 0,29	647,67 ± 225,40	174,63 ± 102,71
RE	5,30 ± 0,43	5,15 ± 0,40	0,00 ± 9,82	7,51 ± 9,51	2,16 ± 0,25	1,53 ± 0,11	0,99 ± 0,13	0,71 ± 0,02	2,98 ± 0,50	1,49 ± 0,25	8,98 ± 1,80	6,56 ± 0,42	241,00 ± 115,88	105,50 ± 40,41
RR	5,01 ± 0,24	5,55 ± 0,30	-4,67 ± 6,06	19,80 ± 10,59	0,82 ± 0,10	0,55 ± 0,08	0,21 ± 0,05	0,18 ± 0,02	1,13 ± 0,37	0,44 ± 0,26	2,78 ± 0,18	1,59 ± 0,18	297,78 ± 26,51	173,88 ± 36,54
TI	6,59 ± 0,22	6,65 ± 0,23	105,00 ± 38,33	148,29 ± 68,14	2,74 ± 0,36	2,73 ± 0,51	1,27 ± 0,16	1,20 ± 0,21	3,55 ± 0,90	2,67 ± 1,40	3,22 ± 0,26	1,99 ± 0,18	102,56 ± 88,33	61,50 ± 31,77
TR	7,07 ± 0,06	6,98 ± 0,21	234,78 ± 51,60	281,09 ± 71,67	4,23 ± 0,40	4,07 ± 0,82	1,95 ± 0,16	1,88 ± 0,34	3,10 ± 0,42	2,27 ± 0,30	4,87 ± 0,73	4,03 ± 0,59	160,22 ± 119,87	79,25 ± 53,03
VE	5,22 ± 0,31	6,33 ± 0,79	-1,78 ± 6,22	101,89 ± 100,71	0,84 ± 0,09	1,85 ± 1,45	0,22 ± 0,04	0,21 ± 0,04	1,01 ± 0,34	0,57 ± 0,26	2,65 ± 0,33	1,65 ± 0,38	248,11 ± 47,34	154,00 ± 24,68
VO	6,62 ± 0,19	6,84 ± 0,40	91,22 ± 24,83	193,32 ± 111,50	4,22 ± 0,82	4,21 ± 1,54	0,99 ± 0,14	0,78 ± 0,13	1,82 ± 0,34	1,41 ± 0,29	3,91 ± 0,47	2,81 ± 0,44	134,11 ± 57,25	38,38 ± 12,03
WA	4,86 ± 0,25	5,86 ± 0,40	-8,56 ± 7,88	30,76 ± 24,33	0,64 ± 0,05	0,73 ± 0,58	0,21 ± 0,04	0,15 ± 0,01	1,25 ± 0,48	0,35 ± 0,19	3,11 ± 0,27	1,98 ± 0,25	330,89 ± 70,60	141,75 ± 11,85
Total	5,84 ± 0,82	6,19 ± 0,80	88,27 ± 144,47	139,71 ± 172,92	2,73 ± 1,99	2,63 ± 2,18	1,16 ± 0,98	1,03 ± 0,97	2,73 ± 1,47	1,66 ± 0,99	5,34 ± 2,76	3,76 ± 2,08	254,08 ± 218,80	106,26 ± 80,40



**Figure 13 :** Comparaison des données moyennes des principaux paramètres physico-chimiques entre les deux périodes.

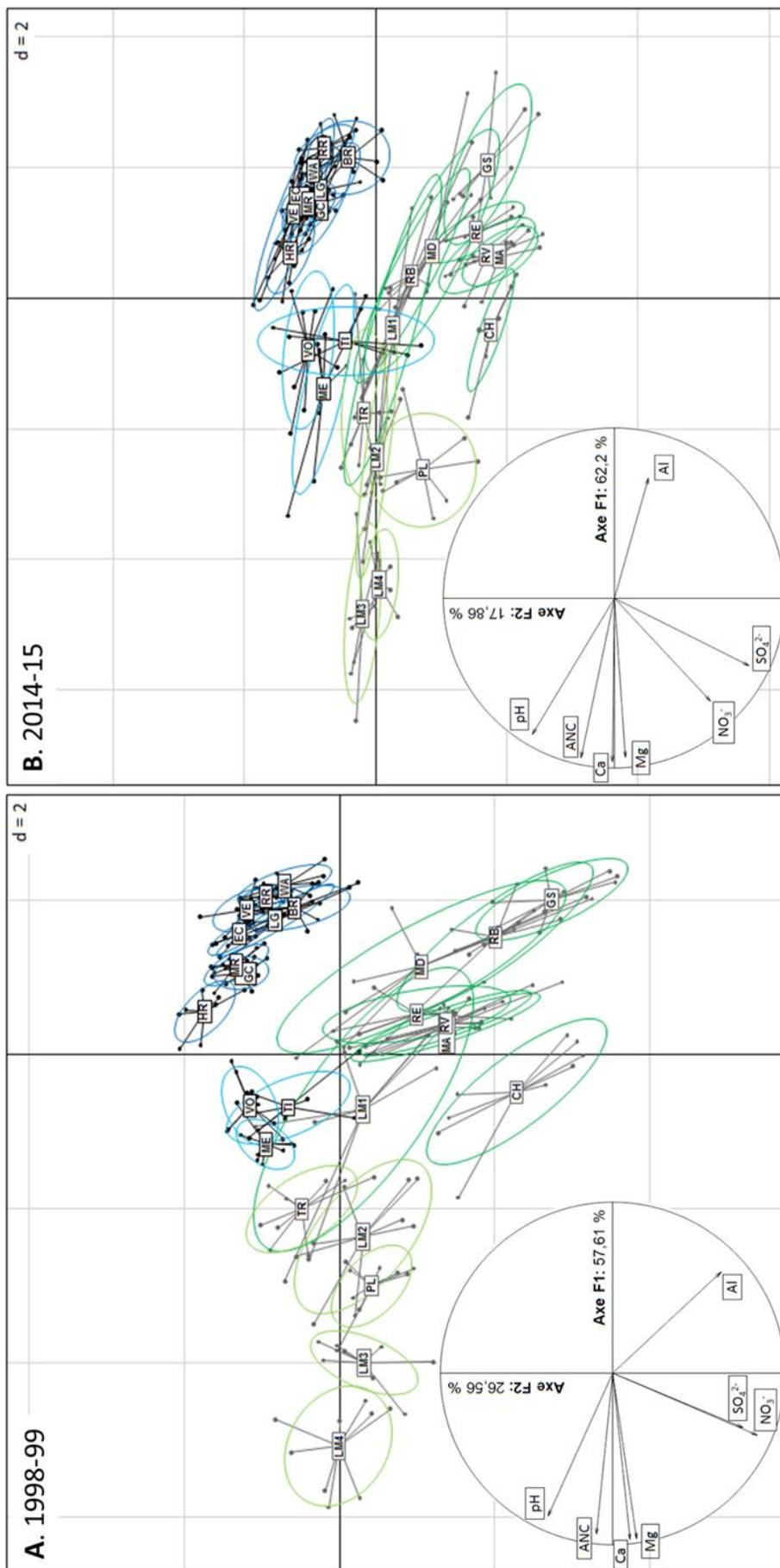
**Tableau 4** : Résultats et p-values des tests t non-appariés comparant les données physico-chimiques moyennes entre les 2 périodes d'étude. p-value significatives en gras.

<i>Paramètres chimiques</i>	1998-1999		2014-2015		p-value
	Moy.	± Et.	Moy.	± Et.	
pH	5,84	± 0,82	6,19	± 0,80	<b>&lt;0,001</b>
Alcalinité (µeq.L <sup>-1</sup> )	88	± 144	140	± 173	<b>&lt;0,001</b>
Ca <sup>2+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	2,73	± 1,99	2,63	± 2,18	0,637
Mg <sup>2+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	1,16	± 0,98	1,03	± 0,97	0,184
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	2,73	± 1,47	1,66	± 0,99	<b>&lt;0,001</b>
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	5,34	± 2,76	3,76	± 2,08	<b>&lt;0,001</b>
Al (µg.L <sup>-1</sup> )	254	± 219	106	± 80	<b>&lt;0,001</b>

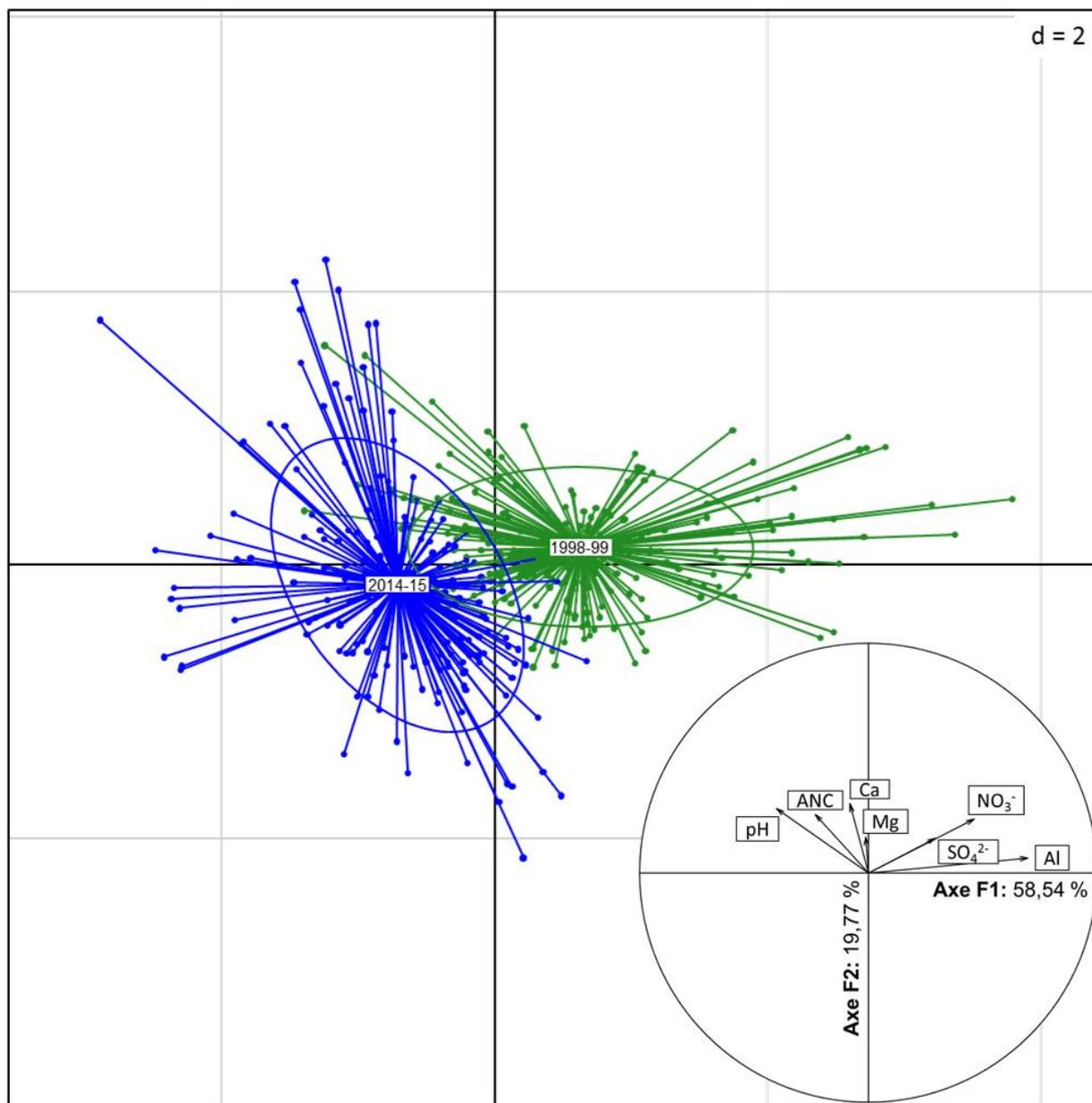
### III.1.b. Analyses en composante principale

Les ACP réalisées sur les paramètres physico-chimiques des sites à chaque période (**Figure 14**), apparaissent très semblables, montrant que les paramètres physico-chimiques permettant de discriminer les sites sont sensiblement identiques en 1998-99 et 2014-15. Les paramètres expliquent pour chaque année respectivement 84,17% et 80,06% de la variabilité. Ainsi, quelle que soit la période considérée, l'axe F1 traduit un gradient d'acidification (pH, ANC) et de minéralisation (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) correspondant à 57,61% de la variabilité pour les données de 1998-99 et 62,20% pour 2014-15. L'axe F2 est plutôt défini par les concentrations en NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> et explique 26,56% de la variabilité pour les données de 1998-99 et 17,86% pour 2014-15. Nous remarquons également que les sites drainant un substratum granitique (en bleu) se distinguent des sites drainant un substratum gréseux (en vert), ces derniers étant caractérisés par des concentrations en NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> et Al plus élevées. Enfin, les sites proches de la neutralité qui sont considérés comme étant des sites de référence (LM2, LM3, LM4, PL, TR sur grès et ME, VO, TI sur granite) se distinguent des sites qui présentent des problèmes d'acidification (teinte claire).

Bien que les représentations dans le premier plan factoriel soient très semblables pour les deux périodes, nous remarquons qu'en 2014-15, les sites sont plus rapprochés sur l'axe F2 (moins visible sur l'axe F1) traduisant une évolution notable des paramètres physico-chimiques. Finalement, l'ACP intra classe (**Figure 15**) réalisée sur les données physico-chimiques de chacune des 2 périodes, montre significativement une séparation des 2 périodes sur chaque axe (**Tableau 5**) et donc une amélioration sensible de la qualité des eaux.



**Figure 14** : Analyse en composante principale effectuée sur les données de 1998-99 (A) et de 2014-15 (B). Les sites sur substratum granitique sont représentés en bleu et les sites sur substratum gréseux en vert. La teinte foncée de chaque couleur correspond aux sites acidifiés en 1998-99 et la teinte claire aux sites non acidifiés en 1998-99.



**Figure 15** : Analyse en composante principale intra-classe effectuée sur les données regroupées de 1998-99 (représentées en vert) et 2014-15 (en bleu).

**Tableau 5** : Tests t comparant les coordonnées sur les axes F1 et F2 de l'ACP en analyse intra-classe effectuée sur les données physico-chimiques des deux périodes. p-value significatives en gras.

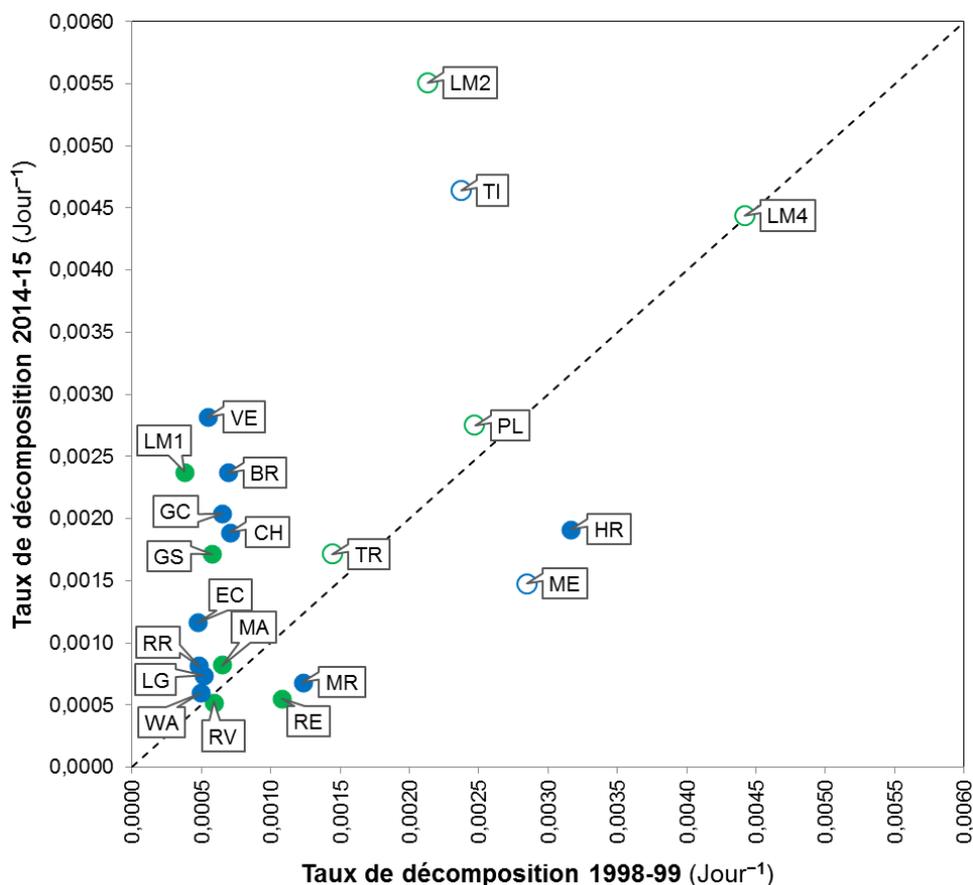
Coordonnées axe ACP <i>wca</i>	1998-1999	2014-2015	Test t
	Moyenne ± Ecart-type	Moyenne ± Ecart-type	
Axe F1	0,63 ± 0,85	-0,71 ± 0,62	<b>&lt; 0,001</b>
Axe F2	0,13 ± 0,39	-0,15 ± 0,72	<b>&lt; 0,001</b>

### III.2. Décomposition des litières

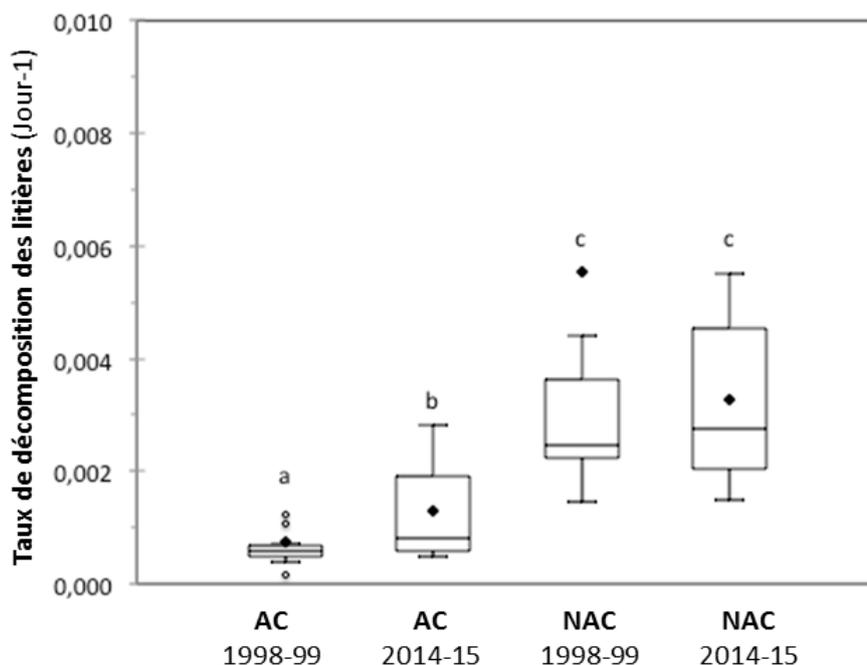
La **Figure 16** qui présente les taux de décomposition en 2014-15 en fonction de ceux observés en 1998-99, montre une augmentation générale des taux de décomposition pour la plupart des cours d'eau acidifiés (Test de Mann-Whitney-Wilcoxon,  $p$ -value  $<0,001$ ).

Une ANOVA de Kruskal-Wallis réalisée sur les taux de décomposition observés dans les cours d'eau acidifiés et non acidifiés en 1998-99 et 2014-15 montrent des différences significatives ( $K=24,83$  ;  $p<0,0001$ ). Les tests post-hoc de Dun indiquent que les taux de décomposition dans les cours d'eau acides sont significativement inférieurs à ceux observés dans les cours d'eau non acidifiés que ce soit en 1998-99 ( $p<0,0001$ ) ou en 2014-15 ( $p<0,012$ ) (**Figure 17**). D'autre part, les taux de décomposition mesurés dans les cours d'eau acides en 1998-99 sont significativement inférieurs à ceux observés dans les mêmes cours d'eau en 2014-15 ( $p<0,045$ ) alors qu'aucune différence significative n'est observée entre les taux de décomposition dans les cours d'eau non acides en 1998-99 et en 2014-15 ( $p=0,939$ ).

Bien que l'on observe une amélioration de la qualité des eaux des ruisseaux acidifiés en 1998-99, qui semble se traduire par une augmentation des taux de décomposition, il existe toujours en 2014-15 des relations significatives entre les taux de décomposition et les principales variables physico-chimiques que sont le pH, l'ANC et les concentrations en Al, Ca et Mg (**Tableau 6**).



**Figure 16** : Comparaison des taux de décomposition entre les données de 1998-99 et 2014-15. Les sites sur granite sont représentés en bleu et les sites sur grès en vert. Les ronds pleins de chaque couleur correspondent aux sites acides en 1998-99 (pH entre 0 et 6,5 unités pH) et les ronds vides aux sites proches de la neutralité en 1998-99 (supérieurs à 6,5 unités pH).



**Figure 17** : Box-plot (médiane, 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> quartiles) des taux de décomposition dans les cours d'eau acides (AC) et non acides (NAC) en 1998-99 et 2014-15. Les moyennes sont figurées par des losanges noirs. Des lettres différentes indiquent des différences significatives (ANOVA de Kruskal-Wallis et test post-hoc de Dunn).

**Tableau 6** : Tableau des corrélations de Spearman (les valeurs de rho et la significativité y sont reportés) entre les taux de décomposition de la litière et les paramètres chimiques des années correspondantes. p-value significatives en gras.

<i>Paramètres chimiques</i>	<i>Taux de décomposition de la litière</i>	
	Années 1998-99	Années 2014-15
pH	<b>0,696</b>	<b>0,601</b>
Alcalinité ( $\mu\text{eq.L}^{-1}$ )	<b>0,662</b>	<b>0,601</b>
$\text{Ca}^{2+}$ ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	<b>0,681</b>	<b>0,480</b>
$\text{Mg}^{2+}$ ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	<b>0,689</b>	<b>0,497</b>
$\text{NO}_3^-$ ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	0,063	0,361
$\text{SO}_4^{2-}$ ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	0,244	-0,070
Al ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	<b>-0,800</b>	<b>-0,403</b>

#### IV. Discussion

A l'instar de nombreuses régions en Europe et en Amérique du Nord (Stoddard *et al.*, 1999 ; Skjelkvåle *et al.*, 2005) il apparaît clairement que les cours d'eau de tête de bassin versant acidifiés des Vosges sont dans une phase de restauration spontanée et progressive de leur qualité physico-chimique suite à la diminution des dépôts acidifiants observée en Europe (Waldner *et al.*, 2014). Ces résultats confirment également les travaux d'Angéli *et al.* (2009) dans lesquels les auteurs avaient démontré une diminution générale des concentrations en sulfates dans les cours d'eau vosgiens, diminution plus marquée dans les cours d'eau sur granite que sur grès. Cette diminution s'accompagnait généralement d'une décroissance des concentrations en calcium et magnésium, décroissance que nous n'observons pas dans la présente étude à l'exception de quelques ruisseaux. Les auteurs avaient également noté une diminution des concentrations en aluminium et dans une moindre mesure des nitrates.

Dans la présente étude, nous observons une amélioration générale du pH et de l'alcalinité indépendamment du substratum géologique et confirmons que la diminution des concentrations en sulfates et en aluminium se poursuit dans tous les ruisseaux. Toutefois, bien que les cours d'eau se restaurent, ces derniers n'ont pas encore retrouvé les caractéristiques chimiques de cours d'eau non acidifiés, montrant que la restauration spontanée demeure un processus qui nécessitera encore beaucoup de temps. Nous assistons désormais également à une diminution très marquée des concentrations en nitrates dans ces cours d'eau. Une diminution des concentrations en nitrates a déjà été rapportée par Evans *et al.* (2001) qui ont observé cette

même tendance au nord et au centre de l'Europe, Scandinavie, République Tchèque, Slovaquie et Allemagne) alors qu'une augmentation était observée dans les îles britanniques et en Italie. Plus récemment, dans une étude concernant 110 cours d'eau allemands de montagne, [Musolff et al. \(2017\)](#) ont montré une diminution globale des concentrations en  $\text{NO}_3^-$  au cours des 20 dernières années. Le premier élément pouvant expliquer cette diminution des concentrations en nitrates dans les eaux courantes est la conséquence des politiques de réductions des émissions (**Figure 10**) qui ont abouti à une diminution des dépôts atmosphériques azotés au cours des dernières décennies. Ce phénomène pourrait également s'expliquer et se trouver accentué dans les zones présentant un fort couvert forestier ([Cooper & Cooke, 1984](#)) où les processus de dénitrification sont les plus actifs. [Musolff et al. \(2017\)](#) mettent également en avant que suite à cette diminution en  $\text{NO}_3^-$ , les concentrations retrouvées ne permettent plus l'inhibition suffisante de la réduction de l'Ag(III), entraînant une augmentation d'argent dissous dans l'eau. Cette augmentation d'Ag dissous aurait pour résultat l'adsorption de divers composés tels que le carbone organique dissous et le  $\text{PO}_4^{3-}$  expliquant l'augmentation de la concentration de ces composés dans les eaux de surfaces retrouvées par [Musolff et al. \(2017\)](#).

Cette diminution générale et souvent importante des concentrations en nitrates se traduit par une (hyper) oligotrophisation des cours d'eau. Certains ruisseaux vosgiens affichent désormais des concentrations en nitrates bien inférieures à  $1\text{mg.L}^{-1}$  ( $226\mu\text{g.L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$ ), ce qui pourrait hypothéquer une restauration biologique de ces écosystèmes en limitant l'azote disponible. Dans un contexte de réchauffement global, le prélèvement d'éléments essentiels tendrait à augmenter en maximisant l'activité des microorganismes ce qui aboutirait *in fine* à une diminution des concentrations dans les eaux de surfaces ([Demars et al., 2011](#)) ainsi qu'à des phénomènes de prolifération bactérienne pouvant entraîner des conséquences lourdes pour les écosystèmes ainsi que pour l'Homme (exemple à l'aval des têtes de bassin versant avec les « blooms » de cyanobactéries observés en milieu lentique : [Paerl & Paul, 2012](#)).

La restauration des conditions physico-chimiques des ruisseaux s'accompagne d'une augmentation des taux de décomposition dans les cours d'eau qui étaient acidifiés en 1998-99 où l'on observe désormais des taux de décomposition jusqu'à 3 fois supérieurs. [Jenkins, Woodward & Hildrew \(2013\)](#) ont observé, grâce à une expérimentation sur la décomposition cellulolytique de bandes de coton sur des mêmes sites à 30 années d'intervalle, une perte de résistance à l'étirement de bandes de cotons ayant séjourné 49 jours en période hivernale dans 31 cours d'eau de la forêt d'Ashdown (au sud de l'Angleterre). Ils ont mis en évidence une augmentation du pH (0,7 unité) ainsi qu'une décomposition du coton 18,1% plus rapide en 2011-12 qu'en 1978-79. Toutefois les auteurs ont observé le maintien d'une relation forte entre décomposition et pH des cours d'eau. Cependant, comme les auteurs le précisent, l'utilisation de bandes de cotons ne permettant pas facilement la colonisation par les macroinvertébrés, la

décomposition du coton est donc principalement assurée par des décomposeurs microbiens. Dans l'étude que nous avons réalisée, la décomposition concerne un substrat plus complexe que la cellulose et le dispositif utilisé (grosse maille) permet d'étudier l'activité des communautés microbiennes associée à celle des communautés d'invertébrés déchetiers.

L'augmentation de la vitesse de dégradation des litières de hêtre dans les cours d'eau vosgiens semble corrélée à une restauration progressive des caractéristiques physico-chimiques des sites vosgiens. La diminution des concentrations en Al représente un facteur important, de nombreuses études ayant démontré des effets directs de l'aluminium sur un grand nombre d'espèces aquatiques mais également des effets indirects résultant de cette toxicité. C'est le cas par exemple pour un déchetier tel que *G. Fossarum* (Felten & Guérold, 2001, 2004 ; Felten, Baudoin & Guérold, 2006) dont l'exposition *in situ* à des concentrations élevées ( $>200 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) se traduit à court terme par un taux de mortalité élevé induit par un dysfonctionnement de la régulation ionique. De la même façon, Baudoin *et al.* (2008) ont montré un appauvrissement marqué des communautés d'hyphomycètes aquatiques en fonction d'un gradient croissant de concentration en Al et finalement une relation négative entre taux de décomposition et Al. Clivot *et al.* (2013, 2014 a) se sont intéressés à l'impact de l'Al sur les communautés fongiques et ont observé un effet de l'acidification et des concentrations en Al sur la diminution des taux de décomposition et l'augmentation de l'activité de l'acide phosphatase. Des valeurs faibles de pH associées à des concentrations élevées en Al dans les cours d'eau acidifiés limitent également le développement de la biomasse fongique, toutes ces conditions entraînant une diminution des taux de décomposition. Ces résultats corroborent la prise en considération de l'aluminium comme un cofacteur de toxicité qui vient s'ajouter à la pression exercée par l'acidification, ainsi que nos projections dans un contexte de récupération de l'acidification avec des concentrations en aluminium décroissantes.

Même s'il n'a pas été suivi durant cette étude, nous pouvons nous interroger de la conséquence de cette récupération sur les concentrations en phosphore. Dans une autre étude, réalisée en laboratoire cette fois, Clivot *et al.* (2014) ont mis en évidence expérimentalement une annulation des effets délétères causés par de fortes concentrations en aluminium par des ajouts de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  lors de la décomposition des litières. Les plus forts ajouts ( $1000 \mu\text{g P.L}^{-1}$ ), en plus d'une amélioration des taux de décomposition, permettaient une meilleure immobilisation du P (indépendamment des concentrations en Al) dans les litières ainsi qu'un meilleur développement fongique. Même si de telles concentrations en P n'existent pas dans les têtes de bassin vosgiennes et demeurent rares, y compris en contexte agricole, dans d'autres systèmes, cette expérimentation en batch conduite en microcosmes apporte des éléments permettant d'envisager les conséquences de la restauration des cours d'eau sur la disponibilité en  $\text{PO}_4^{3-}$ . L'activité enzymatique potentielle élevée de la phosphatase acide avec les plus fortes concentrations en

Al se retrouvait jusqu'à 20 fois inférieures en conditions fortement enrichies en P laissant penser à une levée de carence en P, permettant aux hyphomycètes de contenter leurs besoins. Sachant que sous différentes formes, l'Al peut immobiliser le  $\text{PO}_4^{3-}$  (Kopacek *et al.*, 2000 ; Simon, Simon & Benfield, 2009 ; Clivot *et al.*, 2013), nous pourrions nous attendre à une augmentation des concentrations en  $\text{PO}_4^{3-}$  disponible liée à une diminution des concentrations en Al. Une augmentation des concentrations en  $\text{PO}_4^{3-}$  disponible couplée à une diminution des concentrations en  $\text{NO}_3^-$  de manière concomitante à une augmentation du pH, pourrait modifier les ratios stœchiométriques des éléments disponibles (ratios N/P dans la colonne d'eau). Cela pourrait influencer ou initier une modification des communautés en présence (Rosemond *et al.*, 2001 ; Del Arco *et al.*, 2015). Woodward *et al.* (2012), dans leur étude menée sur 100 cours d'eau européens, ont mis en évidence une relation unimodale entre les taux de décomposition de litières (chêne et aulne) et les concentrations en azote inorganique dissous (DIN) et les concentrations en phosphore réactif soluble (SRP). Ils ont mis en évidence des taux de décomposition à l'optimum de cette courbe et des diminutions très fortes des taux de décomposition aux deux extrêmes du gradient, l'un correspondant à un écosystème subissant une forte limitation en nutriment et, à son opposé, un écosystème dystrophe avec de fortes concentrations en DIN et SRP. Dans les systèmes suivis durant notre expérimentation, les concentrations en azote diminuent et les taux de décomposition augmentent. Une persistance de la diminution des concentrations en azote dans la colonne d'eau pourrait entraîner, à terme, une diminution des taux de décomposition et hypothéquer les bénéfices de la récupération de l'acidification dans les cours d'eau de tête de bassin versant.

Malgré la restauration physico-chimique constatée des cours d'eau de tête de bassin versant et de son effet positif sur un processus fonctionnel, nous pouvons donc nous interroger sur les effets à moyen terme d'une diminution marquée en azote sur les processus fonctionnels ainsi que sur la réponse des communautés macro-benthiques. Pour exemple, une modification partielle du cycle de vie de l'éphéméroptère *Baetis rhodani* (bivoltin avec une cohorte d'hiver et d'été en contexte proche de la neutralité à légèrement acides alors qu'en contexte acidifié, la génération d'hiver était fortement réduite voir absente) a été mise en évidence par Tixier, Felten & Guéroid (2009) dans des cours d'eau acidifiés. Baldy *et al.* (2007), dans leur étude de la décomposition des litières dans des cours d'eau de divers statuts trophiques, ont observé de faibles densités de décheteteurs dans les milieux oligotrophes ainsi que des changements de dominance des taxa. Cette modification partielle du cycle de vie dans un contexte d'acidification des eaux de surfaces chez une espèce ainsi que la diminution des nombres des taxa observés, la modification des communautés benthiques en contexte d'acidification (Dangles & Guéroid, 1999 ; Guéroid *et al.*, 2000 ; Lepori *et al.*, 2003) et d'une autre part, dans un contexte non-acidifié, les faibles densités de certains taxa dans des contextes de faibles statuts trophiques nous amène

à penser que malgré la restauration physico-chimique constatée (comme observé par [Malcolm et al., 2014 b](#)), la diminution des concentrations en nitrates pourraient compromettre la pérennisation de cette restauration.

## Partie 2. Effets de la disponibilité en azote et phosphore sur le processus de décomposition de la litière dans les cours d'eau de tête de bassin versant (Nord-est, France).

### I. Introduction.

Les ruisseaux de tête de bassin qui correspondent souvent à des cours d'eau d'ordre 1 et 2 (Strahler, 1957) peuvent représenter jusqu'à 80% du réseau hydrographique (Schumm, 1956). Ces ruisseaux sont, pour partie, généralement situés dans des zones de reliefs boisés, peu propices aux potentielles activités humaines intensives. Mais on en observe toute une diversité avec des couverts et reliefs variés. Sous une impulsion du Conseil Européen (Council of the European Union, 2001) ainsi qu'une problématique croissante sur les territoires, les études portées sur les ruisseaux de têtes de bassin versant ont été orientées sur la problématique majeure de l'acidification dû aux oxydes d'azote (NO<sub>x</sub>) et au dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>) (Dangles & Guérold, 2000 ; Guérold *et al.*, 2000 ; Dangles *et al.*, 2004 ; Cornut *et al.*, 2012 ; Clivot *et al.*, 2014 a b) et ce spécialement dans les zones forestières (Confer Chapitre 2-Partie I) relativement épargnées par les pressions anthropiques. Néanmoins, la vision des ruisseaux de tête de bassin versant correspondant à des zones forestières nous semble se focaliser sur un échantillonnage restreint de la totalité des ruisseaux de tête de bassin versant. En effet, les cours d'eau de tête de bassin versant situés en zone de plaine subissent directement les conséquences de l'agriculture intensive et ont suscité l'intérêt de nombreuses études à ce sujet (par exemple : Knox, 1977 ; Karr & Dudley, 1981). Ces cours d'eau sont des candidats intéressants pour étudier l'impact des activités agricoles sur la qualité physico-chimique des eaux de surface ainsi que ses effets sur les processus fonctionnels. Ils possèdent souvent des chimies particulièrement dégradées (Le Bihan, 2009) et font partie des écosystèmes qui ont subi le plus d'altérations de leur hydromorphologie au cours des dernières décennies (recalibrage, rectification, busage, etc. ; Le Bihan, 2009).

De par leur position en extrême amont, les ruisseaux de tête de bassin versant assurent (quand ils sont épargnés par des perturbations anthropiques) des fonctions importantes pouvant conditionner le fonctionnement des masses d'eau situées à l'aval. En particulier, ces ruisseaux constituent des axes de transport d'énergie de l'amont vers l'aval et assument notamment le rôle de dégrader la matière organique particulaire détritique (feuilles mortes, bois mort, etc.) qui entre en grande quantité dans les parties forestières de ces cours d'eau ou par des transferts latéraux (Vannote *et al.*, 1980). Possédant naturellement de nombreuses zones de rétention de la matière organique (méandres, embâcles, sédiments minéraux, etc.) lorsqu'ils ne sont pas dégradés (par exemple, par les traces de traversées de bétail ou de matériel agricole lourd), ces écosystèmes

sont capables de gérer des quantités importantes de nutriments et de carbone organique dissout (Ensign & Doyle, 2006) que ce soit par intégration au cycle biogéochimique local ou par transport vers les masses d'eau aval. Ils assurent donc différents services écosystémiques essentiels, de régulations, socioculturels et principalement de soutien. Pour finir, ces milieux servent également de zone refuge pour de nombreuses espèces animales et végétales (Meyer *et al.*, 2007). Compte tenu des multiples altérations qu'ils subissent, il apparaît désormais nécessaire d'évaluer « l'intégrité biologique » (*sensu* Karr, 1991) des ruisseaux de tête de bassin versant, dans un objectif premier, de restauration et de préservation des systèmes, puis potentiellement, par la suite, mettre en place des plans de conservation des systèmes pour détecter et prévenir de futures perturbations dans les systèmes amont avant qu'elles ne se complexifient et n'affectent négativement les systèmes en aval.

Au niveau de leur fonctionnement, les ruisseaux de têtes de bassin versant sont généralement considérés comme des systèmes hétérotrophes, dont le fonctionnement est principalement basé sur la décomposition de matière organique morte allochtone comme source d'énergie à la base des réseaux trophiques (Minshall, 1967 ; Fisher & Likens, 1973 ; Cummins, 1974). Ces apports de matière détritique particulaire proviennent majoritairement de zones forestières, ou *a minima*, de la végétation riparienne. L'ouverture de la canopée, en augmentant la luminosité perçue par les cours d'eaux (pouvant supplanter, ponctuellement et localement, les détritiques comme source principale d'énergie dans l'écosystème par les producteurs primaires transformant l'énergie lumineuse en composés carbonés via la photosynthèse ), influence fortement le processus de décomposition (Lagrué *et al.*, 2011). En plus des apports de matière organique particulaire, les sols des bassins versants sont susceptibles d'apporter aux ruisseaux des quantités importantes de Matières Organiques Dissoutes Utilisables (UDOM) (Münster & Chrost, 1990), à la base du développement de nombreux microorganismes hétérotrophes. Malgré ces apports plus ou moins réguliers, les détritiques restent de qualité médiocre (Moore *et al.*, 2004). De plus, en raison des flux d'eau importants, les détritiques particuliers ainsi que les matières dissoutes sont rapidement transportés vers l'aval. Dans le cas de systèmes dégradés les processus écologiques sont susceptibles d'être limités par les nutriments de manière récurrente (Newbold *et al.*, 1981).

Dans certains ruisseaux de tête de bassin versant, néanmoins, les quantités de nutriments (par exemple, sous forme de  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{PO}_4^{3-}$ ) peuvent être importantes, notamment dans le cas où des activités agricoles intensives sont réalisées à l'échelle du bassin versant (Zhou *et al.*, 2016). En effet, l'occupation du sol est un paramètre important pour expliquer l'état trophique des eaux, et qui est de plus en plus intégré (développement d'indices spécifiques tel que le « Riparian disturbance index » utilisé par Pan *et al.* en 2004) pour l'étude de la qualité des eaux de surfaces (Giri & Qiu, 2016 ; Vrebos, Beauchard & Meire, 2017). Le travail mécanique des sols (destruction

de sa faune, semelle de labour, etc.) couplé à l'épandage d'intrants tels que les engrais et les substances phytosanitaires sont susceptibles d'induire d'importantes modifications structurelles et fonctionnelles du sol. Le lessivage et/ou la percolation des précipitations aboutira au transport de matières organiques et inorganiques dissoutes, des eaux de surfaces jusqu'aux aquifères. L'activité agricole intensive est à l'origine notamment d'une augmentation des concentrations de certains éléments chimiques dans les eaux comme l'azote et le phosphore (Powers, Tank & Robertson, 2015 ; Johnson, Tank & Arango, 2009 ; Zhou *et al.*, 2016). Un risque potentiel supplémentaire concerne également le transport de produits toxiques (fongicides, insecticides, métaux lourds, etc.) lors de périodes de fort lessivage des sols, arrivant en supplément des éléments essentiels que sont l'azote et le phosphore. Ces composés pourraient avoir des conséquences délétères sur les écosystèmes ainsi que sur les processus fonctionnels (Brosed *et al.*, 2016). Ils pourront également se retrouver immobilisés et stockés durant des périodes plus ou moins longues dans les sédiments, eaux plus profondes ou interstitielles, pouvant ainsi affecter périodiquement et durablement les écosystèmes aquatiques plusieurs années voire dizaines d'années après leur épandage, avec des conséquences difficilement prédictibles sur les communautés aquatiques (Zubrod *et al.*, 2014, 2015 a b, 2017 a b). Il est à noter que l'intensification actuelle (augmentation des surfaces, de l'utilisation de produits phytosanitaire, etc.) des pratiques agricoles ne fait qu'augmenter ces effets (Allan *et al.*, 2015).

En raison de la complexité et de la diversité des mélanges de composés potentiellement toxiques retrouvés dans ces milieux, une approche pour prendre en considération les activités agricoles dans leur globalité consiste à considérer l'occupation du sol des bassins versants à plus ou moins grande échelle comme indicateur de stress. Pan *et al.* (2004) ont mis en évidence l'influence d'un gradient d'activité agricole dans la variabilité des assemblages d'espèces de diatomées observées et plus significativement à l'échelle du ruisseau dans une zone tampon de 10 à 30m. Young & Collier (2009) et Uriarte *et al.* (2011) ont mis en évidence le fort impact de l'occupation du sol sur la qualité des eaux de surfaces (respectivement en Nouvelle-Zélande et à Puerto Rico) mais également plus localement (Muscutt *et al.*, 1993 et Chapman, 1996). Emilson *et al.* (2016) ont mis en évidence une perturbation de diverses activités enzymatiques des communautés microbiennes ainsi qu'une modification de l'abondance des taxa fongiques en présence d'activité anthropique (agriculture, zones de sylviculture, de brûlis, industrielles et industrielles urbanisées).

Afin d'évaluer l'impact de l'occupation des sols sur le fonctionnement des cours d'eau de tête de bassin versant, l'étude de la décomposition des litières apparaît comme un outil intégrateur particulièrement pertinent (Gessner & Chauvet, 2002). La décomposition est définie par Sinsabaugh, Antibus & Linkins en 1991, comme « *La conséquence de la croissance et de la succession de communautés microbiologiques* ». L'impact des détritivores macroinvertébrés,

n'est qu'une conséquence de cette croissance première de communautés microbiennes, stockant des nutriments et en conséquence, améliorant la qualité de la ressource (Cheever, Kratzer & Webster, 2012). En utilisant des sacs fines mailles (FM) lors d'expérimentation de décomposition, nous pouvons exclure les macroinvertébrés et obtenir des données focalisées sur la décomposition microbienne (Gessner & Chauvet, 1994) contrairement aux sacs "grosses mailles" (GM) (utilisées dans le Chapitre 2-Partie I).

En plus du transfert de la matière organique détritique, l'étude des processus d'acquisition de nutriments au travers de l'étude d'activités enzymatiques microbiennes pourrait s'avérer être un indicateur très complémentaire de la décomposition microbienne. Les premières études, sur les activités enzymatiques microbienne dans les sols, ont débuté à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle mais ces dernières ne sont devenu un sujet d'intérêt en recherche qu'à partir de la fin des années 1950 (Confer Sinsabaugh *et al.*, 1991), et il a fallu attendre les années 90, plus précisément Chrost *et collaborateurs* en 1990 et 1991, pour observer un intérêt croissant de l'étude des activités enzymatiques dans les systèmes aquatiques. Chrost et son équipe y développent et utilisent le terme d'« *enzymes extracellulaire* », « *ectoenzyme* », ou encore « *exoenzyme* » avec la définition suivante : « *Toute enzyme qui est sécrétée et traverse de manière active la membrane cytoplasmique et qui est associée avec son producteur* ». Selon la définition de Sinsabaugh *et al.* (1991), cette activité enzymatique agit comme « un agent de contrôle microbien pour le processus de décomposition » et suit les variations spatiotemporelles du système (Romaní & Sabater, 2001). Le suivi de ces activités a par exemple permis de mettre en évidence des carences en éléments minéraux, en particulier des déficits marqués en phosphore dans la matière détritique apparaissant dans le cas de l'acidification des eaux de surface (Clivot *et al.*, 2013 b, 2014 a). En effet, dans l'étude de Clivot *et al.* (2014 a), l'activité phosphatase s'est avérée être négativement corrélée à plusieurs paramètres physico-chimiques dont le phosphore. Etudier les activités enzymatiques récupératrices du carbone (C), de l'azote (N), et du phosphore (P) ainsi que les ratios enzymatiques dans un contexte de décomposition de la litière (Sinsabaugh, Hill & Follstad Shah, 2009) pourrait ainsi potentiellement nous permettre d'évaluer la nature et l'intensité des éventuelles limitations des processus de décomposition par la disponibilité en nutriments (limitants ou en excès).

L'objectif de cette étude était ainsi d'étudier l'effet de l'occupation des sols à l'échelle des bassins versants sur le fonctionnement des ruisseaux de tête de bassin versant. Pour cela, 27 sites ont été sélectionnés à l'aide d'approches cartographiques en SIG (Système d'Information Géographique), formant un panel de cours d'eau correspondant à un gradient de disponibilité en éléments chimiques (Spitoni, 2012). Le fonctionnement des cours d'eau a été évalué par l'étude combinée des taux de décomposition microbienne de litières, des niveaux d'activités enzymatiques des décomposeurs microbiens, et des niveaux d'azote et de phosphore dans les

eaux de surface et les litières. Nous nous attendions à observer (comme observé par [Woodward et al., 2012](#)) une stimulation de la décomposition microbienne jusqu'à atteindre un maximum, puis une décroissance pour les valeurs les plus élevées, en fonction de la disponibilité en azote et en phosphore dans les cours d'eau. Nous souhaitons tester dans ce chapitre les hypothèses suivantes : 1) des mesures d'activités enzymatiques et de concentrations en nutriments dans les litières nous indiqueront les types et niveaux de limitation minérale (azote ou phosphore) du processus de décomposition et 2) le comparatif décomposition/activité enzymatique nous permettra de valider les activités enzymatiques comme un indicateur fiable et pertinent des niveaux de limitations nutritives dans les cours d'eau de tête de bassin versant.

## **II. Matériel et méthodes.**

### **II.1. Sélection des Sites/Bassins versant.**

#### **II.1.a. Sélection géographique.**

Les délimitations géographiques de la région Lorraine ont été récupérées via la base de données GEOFLA® (échelle 1:1000000; 2013; "Institut Géographique National", IGN). En y intégrant des informations de données hydrographiques, BDTopo® (ruisseaux d'ordre 1 et 2, échelle 1:10000; 2008;IGN) et SYRAH-CE (échelle 1:10000; 2012; « Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture », IRSTEA), 1540 bassins versants ont pu être délimités sur le secteur. Afin de ne conserver que les petits cours d'eau de tête de bassin versant, 656 (42% de l'ensemble des bassins versants de Lorraine) bassins versants d'une surface comprise entre 5-20km<sup>2</sup> ont été sélectionnés. Ce nombre a encore été réduit à 315 bassins versants en supprimant les bassins versants présentant des masses d'eau lenticules sur le linéaire des cours d'eau.

Pour obtenir des sites représentatifs, nous avons trié et sélectionné les sites en utilisant CORINE Land Cover 2006 (CLC06) (échelle 1:100000 ; "Commissariat Général du Développement Durable", CGDD; "Service de l'Observation et des Statistiques", SOeS 2009) ([Desjardins & Cavayas, 1991](#)) et le « Registre Parcellaire Graphique » (RPG) 2012, niveau 3 (échelle 1:1000 à 1:5000, "Agence de Services et de Paiements", ASP and "Ministère de l'Agriculture et de la Pêche"). Le gradient d'occupation du sol a été divisé en six catégories : Forêts, Milieux arbustifs-herbacés, Prairies, Zones agricoles hétérogènes, Terres arables et cultures permanentes ainsi que Zones urbanisées similairement à l'étude de [Young & Collier \(2009\)](#).

Toutes les analyses ont été effectuées avec le logiciel ArcGIS (v.10) ([Esri France, 2013](#)) et l'outil "Spatial Analyst" par Marie Spitoni ([Spitoni, 2012](#)). Ce travail, complété par une

reconnaissance de terrain, a permis *in fine*, de sélectionner 32 bassins versants d'intérêt, proposant un gradient d'occupation des sols depuis des bassins versants 100% forestiers à des bassins versants fortement dominés par de l'agriculture intensive (Fouillet, 2014).

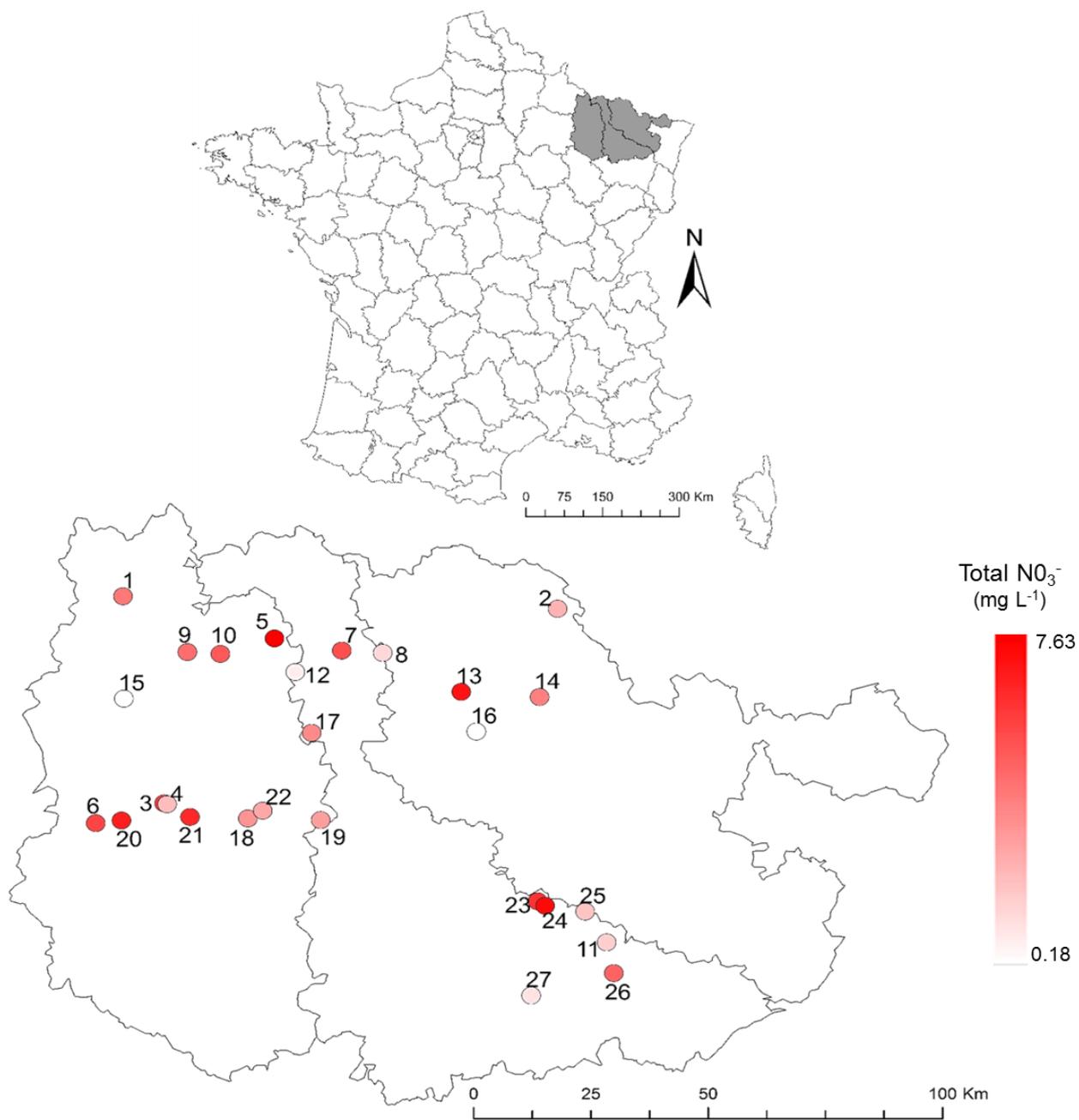
### II.1.b. Sélection chimique.

Une fois le tri et la sélection des 32 bassins versants effectués, nous avons procédé à des mesures des paramètres physico-chimiques des eaux le long du gradient d'occupation des sols. Des échantillons de 500ml pour chaque site ont été collectés, conservés au noir à 4°C de retour au laboratoire et analysés dans les 48h. Les paramètres mesurés incluent le pH, la conductivité à 25°C ainsi que les concentrations en phosphates ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ), nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ), ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) et sulfates ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). L'alcalinité (Titre Alcalimétrique Complet, TAC) a été quantifiée à T0 et après 7 jours, pour chaque échantillon. La conductivité et le pH ont été mesurés avec un conductimètre Metrohm Herisau E518 (Herisau, Suisse) à 25°C et un pH-mètre microprocesseur (pH 3000, WTW), respectivement. Les concentrations en  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{NO}_2^-$  ont été déterminées par chromatographie ionique (Dionex 4500i, colonne AS4ASC; Dionex, Sunnyvale, CA), tandis que celles en  $\text{NH}_4^+$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  ont été mesurées par colorimétrie après digestion alcaline persulfate (exemple pour le phosphore: Danger *et al.*, 2007). Les concentrations en  $\text{O}_2$  et le pourcentage de saturation ont été mesurées *in situ* avec une sonde oxygène portable (Oxi 330i handheld meter; WTW, Weilheim, Germany).

Les ions chlorures ( $\text{Cl}^-$ ), calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ), sodium ( $\text{Na}^+$ ) et potassium ( $\text{K}^+$ ) ainsi que la concentration en fer II et III ( $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$ ) à T0 ont également été suivis en amont pour valider le choix des sites (Fouillet, 2014). Sur les 32 sites présélectionnés, 5 sites ont été éliminés (vandalisme, cours d'eau intermittent avec une rupture d'écoulement précoce ainsi qu'une pollution saline de 0,6 à 2g.L<sup>-1</sup> sur la période de déploiement, pour l'un d'entre eux), nous offrant donc 27 bassins versants pour l'étude expérimentale (Figure 18 et Annexe 2), ces bassins versants formant un gradient d'occupation du sol marqué (Figure 19).

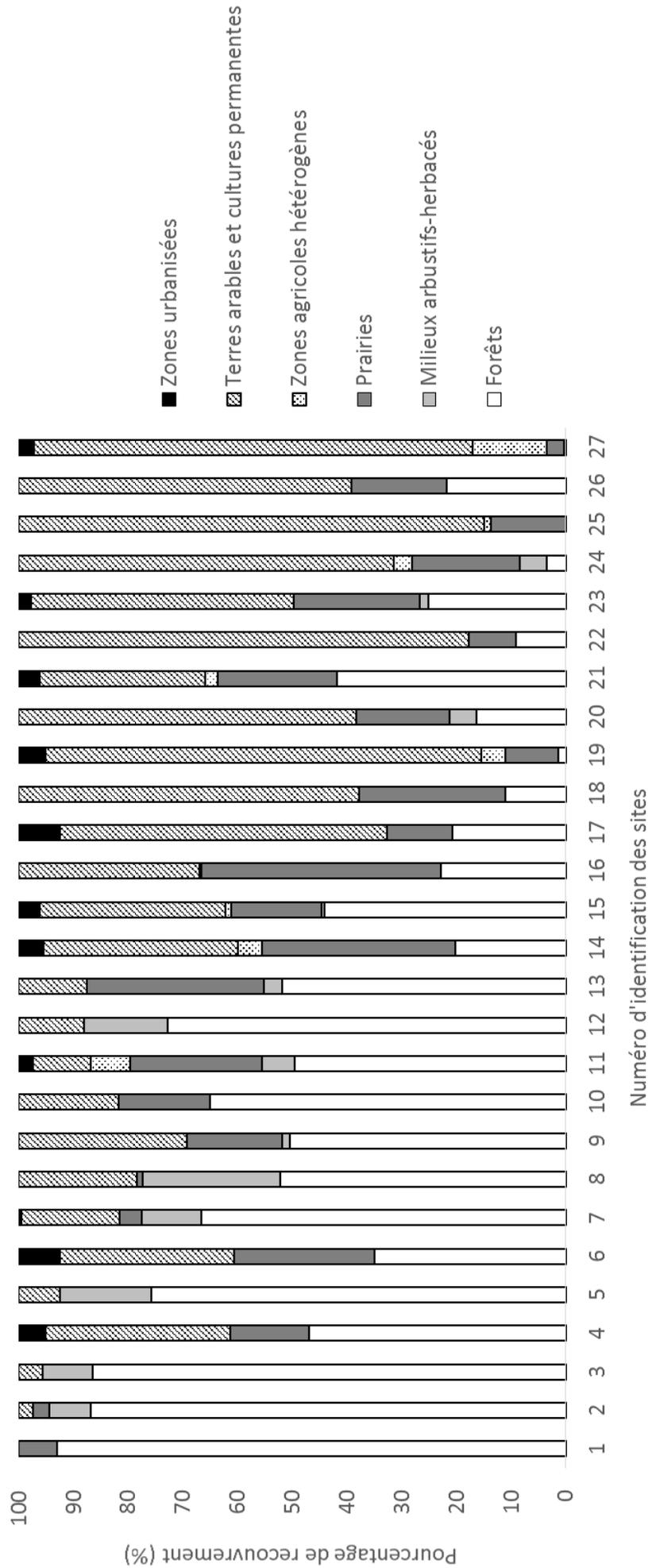
### II.2. Chimie de l'eau et analyse de températures.

Les analyses physico-chimiques ont été effectuées tout au long de l'expérimentation (à T0 puis après 7, 14, 21, 28, 42 et 56 jours) de décomposition des litières (Tableau 7). Les températures ont été enregistrées en continu avec une sonde HOB0®, placée en amont de chaque site avec une mesure toutes les 30 minutes, durant toute l'expérimentation.



**Figure 18** : Location des sites étudiés en Lorraine, Nord-Est de la France. Le gradient coloré va des plus faibles aux plus fortes concentrations des concentrations moyennes en Nitrates mesurées sur les sites durant l'expérimentation.

**Figure 19 :** Occupation des sols des sites par les 6 items identifiés (Forêts, Milieux arbustifs-herbacés, Prairies, Zones agricoles hétérogènes, Terres arables-cultures permanentes et Zones urbanisées).



**Tableau 7** : Coordonnées et caractéristiques chimiques principales des 27 sites étudiés rangés numériquement par rapport au gradient de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Les moyennes (n=7) sont reportées avec leur écart-types.

Site	Coordonnées WGS84		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (µg.L <sup>-1</sup> )	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µg.L <sup>-1</sup> )	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	O <sub>2</sub> (% de saturation)	Conductivité (µS.cm <sup>-1</sup> )	Alcalinité (meq.L <sup>-1</sup> )	pH
	(degrés minutes seconde)									
1	5°14'43.6873" E	49°25'35.0980" N	0,61 ± 0,19	55 ± 27	25 ± 10	34 ± 9	83,5 ± 8,2	591 ± 76	4,02 ± 0,25	7,94 ± 0,06
2	6°31'11.1457" E	49°22'12.7398" N	1,31 ± 1,19	31 ± 20	60 ± 0	16 ± 5	107,9 ± 6,7	1353 ± 431	3,77 ± 1,74	8,13 ± 0,14
3	5°20'48.8458" E	48°59'35.4080" N	1,65 ± 1,45	61 ± 19	0 ± 0	20 ± 5	91,9 ± 3,3	1858 ± 513	4,19 ± 1,67	7,96 ± 0,08
4	5°21'19.4263" E	48°59'28.0594" N	2,21 ± 0,22	8 ± 12	0 ± 0	11 ± 3	105,1 ± 3,5	1273 ± 39	6,72 ± 0,07	8,19 ± 0,06
5	5°41'8.9923" E	49°19'46.5265" N	2,85 ± 0,59	55 ± 83	33 ± 25	29 ± 15	99,3 ± 2,6	430 ± 19	4,30 ± 0,13	8,29 ± 0,07
6	5°8'45.0690" E	48°57'19.7651" N	4,84 ± 2,83	405 ± 1030	54 ± 53	36 ± 43	106,3 ± 11,6	720 ± 35	5,71 ± 0,04	7,84 ± 0,11
7	5°52'54.0250" E	49°17'59.4730" N	5,21 ± 1,50	34 ± 22	38 ± 4	25 ± 19	105,6 ± 5,0	418 ± 11	4,05 ± 0,33	8,34 ± 0,05
8	6°0'4.7117" E	49°17'31.9632" N	5,51 ± 4,00	90 ± 103	59 ± 29	131 ± 172	89,7 ± 27,7	532 ± 122	4,07 ± 0,88	8,08 ± 0,18
9	5°25'45.4836" E	49°18'23.8309" N	6,20 ± 1,23	58 ± 14	20 ± 0	50 ± 64	100,9 ± 0,9	442 ± 7	4,25 ± 0,13	8,29 ± 0,04
10	5°31'32.8026" E	49°18'2.8796" N	6,43 ± 1,13	26 ± 11	36 ± 5	33 ± 9	96,0 ± 1,8	551 ± 21	5,14 ± 0,03	8,30 ± 0,06
11	6°36'53.2012" E	48°40'17.2132" N	7,27 ± 0,93	22 ± 19	40 ± 0	98 ± 63	118,0 ± 13,0	1170 ± 121	4,72 ± 0,31	8,51 ± 0,13
12	5°44'36.0690" E	49°15'30.3602" N	7,77 ± 0,21	8 ± 6	20 ± 0	16 ± 5	93,0 ± 6,5	383 ± 28	3,66 ± 0,06	8,20 ± 0,00
13	6°13'35.5490" E	49°12'18.3467" N	8,77 ± 7,76	95 ± 56	67 ± 42	52 ± 20	114,7 ± 29,8	749 ± 129	3,90 ± 0,64	8,13 ± 0,15
14	6°27'16.5150" E	49°11'16.9908" N	11,52 ± 0,66	157 ± 90	223 ± 82	256 ± 83	101,9 ± 10,9	675 ± 40	5,86 ± 0,00	8,23 ± 0,05
15	5°14'19.8751" E	49°12'48.2058" N	11,80 ± 1,12	38 ± 18	91 ± 27	218 ± 124	102,9 ± 9,3	720 ± 69	6,73 ± 0,34	8,26 ± 0,26
16	6°15'54.4090" E	49°7'16.3985" N	14,44 ± 4,73	27 ± 13	47 ± 27	21 ± 8	99,6 ± 6,2	657 ± 21	6,28 ± 0,11	8,06 ± 0,10
17	5°47'2.9047" E	49°7'50.9772" N	16,40 ± 6,16	343 ± 307	271 ± 186	126 ± 27	83,3 ± 8,4	1036 ± 75	6,24 ± 0,01	8,08 ± 0,10
18	5°35'21.0203" E	48°57'24.0883" N	18,34 ± 3,30	52 ± 36	137 ± 90	30 ± 34	124,0 ± 10,2	634 ± 21	5,67 ± 0,16	8,14 ± 0,34
19	5°48'2.6842" E	48°56'54.2494" N	18,77 ± 3,44	49 ± 30	143 ± 78	319 ± 134	105,1 ± 17,6	806 ± 73	5,44 ± 0,01	8,39 ± 0,21
20	5°13'15.1054" E	48°57'34.5449" N	19,94 ± 7,46	51 ± 38	82 ± 117	29 ± 7	105,9 ± 2,7	504 ± 22	4,75 ± 0,09	8,10 ± 0,08
21	5°25'15.2299" E	48°57'48.0240" N	22,59 ± 1,37	180 ± 73	141 ± 58	193 ± 48	120,6 ± 12,5	1483 ± 71	6,95 ± 0,00	8,26 ± 0,07
22	5°37'59.2712" E	48°58'18.6953" N	23,66 ± 7,71	70 ± 46	211 ± 160	111 ± 48	134,7 ± 19,1	676 ± 30	5,46 ± 0,18	8,27 ± 0,15
23	6°25'14.2694" E	48°45'46.6517" N	26,99 ± 6,48	197 ± 149	207 ± 201	508 ± 146	72,7 ± 9,4	857 ± 26	5,30 ± 0,19	7,95 ± 0,08
24	6°26'30.9451" E	48°45'10.6855" N	31,55 ± 1,82	100 ± 38	222 ± 58	76 ± 24	105,6 ± 5,9	624 ± 14	5,65 ± 0,02	8,30 ± 0,08
25	6°33'25.5751" E	48°44'14.8805" N	31,74 ± 2,18	93 ± 41	62 ± 49	76 ± 19	97,1 ± 6,3	627 ± 6	5,63 ± 0,04	7,90 ± 0,06
26	6°37'52.7153" E	48°36'25.0268" N	31,77 ± 30,06	41 ± 42	748 ± 1740	30 ± 8	93,0 ± 6,5	635 ± 50	5,87 ± 0,11	7,90 ± 0,06
27	6°23'21.6200" E	48°34'2.2361" N	34,59 ± 1,72	52 ± 35	107 ± 19	106 ± 22	120,4 ± 5,1	1115 ± 50	6,83 ± 0,01	8,17 ± 0,05

### II.3. Expérimentation de la décomposition des litières de feuilles.

#### II.3.a. Collecte des litières et protocole expérimental.

Les feuilles d'aulne (*Alnus glutinosa*) ont été collectées sur un même site par Fanny Colas, à l'aide d'un filet tendu à environ 1m au-dessus du sol, à l'abscission durant l'automne 2013. Elles ont été séchées à l'air jusqu'à masse constante puis conditionnées en sacs fines mailles (0,5mm) contenant 4g ( $\pm 0.5\%$ ) de feuilles dont les pétioles ont été retirés. Les sacs à litière ont été placés sur chaque station début mars 2014 par Maxime Fouillet et Julien Cornut, avec 4 réplicas de 2 sacs par site et installés sur quatre radiers de la station, ou alors espacés de plusieurs mètres lorsque seul un faciès d'écoulement lentique était observé (Fouillet, 2014). Ils ont été récupérés après 21 et 42 jours.

#### II.3.b. Décomposition de la litière.

Après 21 et 42 jours d'immersion, les sacs fines mailles ont été rapportés au laboratoire et délicatement lavés avec l'eau du site pour retirer le matériel exogène. Trois lots de cinq disques de feuilles ( $\varnothing$  16mm) ont été coupés à l'emporte-pièce dans les feuilles et stockés à  $-18^{\circ}\text{C}$ . Des échantillons pré-expérimentation (T0) et le reste des sacs FM ont été séchés à l'étuve durant 72h à  $65^{\circ}\text{C}$ , puis réduits en cendre durant 4h à  $550^{\circ}\text{C}$  pour déterminer les masses sèches sans cendre (MSSC). Les taux de décomposition ( $k$  en  $\text{jour}^{-1}$  que nous avons par la suite corrigés en fonction des températures en  $\text{degrés.jour}^{-1}$ ) des sacs FM, ont été déterminés à l'aide d'un modèle exponentiel (Gessner & Chauvet, 1994) :

$$m_t = m_0 \times e^{-kt}$$

Avec :  $m_t$  = masse au temps  $t$  (g) ;  $m_0$  = masse initiale (g) ;

$k$  = taux de décomposition ( $\text{jour}^{-1}$ ) ;  $t$  = temps (jour)

### II.4. Contenu en Carbone, Azote et Phosphore.

Les contenus en Carbone, Azote et Phosphore (CNP) des litières ont été mesurés en utilisant cinq disques de feuilles prélevés sur cinq feuilles distinctes de chaque sac à litière. Les disques ont été séchés dans une étuve à  $105^{\circ}\text{C}$  durant 24h puis finement broyés. Le contenu en C et N a été déterminé avec un analyseur élémentaire CHN et le contenu en P a été déterminé en utilisant une méthode colorimétrique après oxydation au persulfate de sodium (Ormaza-González & Statham, 1996 ; Danger *et al.*, 2013 a). Ils sont exprimés en pourcentage de masse sèche (% DM).

## II.5. Analyses enzymatiques.

Pour les analyses enzymatiques, le protocole utilisé a été adapté de [Clivot \*et al.\* \(2013\)](#) en réalisant des mesures d'absorbance sur microplaques (96 puits). Brièvement, cinq disques de feuilles congelés à -80°C après prélèvements dans les sacs FM, ont été broyés dans des tubes Falcon avec un ultra-turrax (sur glace pour prévenir toute surchauffe de l'échantillon) dans 10ml de tampon d'acétate de sodium à 50mM (SAB, pH 5,0). L'homogénat a été centrifugé pendant 20min à 10000g et à 4°C. Le surnageant utilisé comme extrait enzymatique a été subdivisé en 5 aliquots et conservé à -80°C avant utilisation.

L'activité potentielle de quatre exoenzymes classiquement étudiées a été évaluée ([Sinsabaugh \*et al.\*, 1991](#) ; [Sinsabaugh, Moorhead & Linkins, 1994](#)) : la  $\beta$ -1,4-glucosidase (Beta-Glucosidase : **BG**, EC 3.2.1.21), la 4- $\beta$ -D-glucancellobiohydrolase (CelloBioHydrolase : **CBH**, EC 3.2.1.91), la  $\beta$ -4-N-acetylglucosaminidase (N-AcetylGlucosaminidase : **NAG**, EC 3.2.1.52) et la phosphatase acide (**AP**, EC 3.1.3.2) avec respectivement 5mM 2 pNP- $\beta$ -D-glucopyranoside, 2mM 4 pNP- $\beta$ -D-cellobioside, 2mM 4 pNPN acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase et 5mM pNP-phosphate (pNPP) comme substrat. Tous les produits ont été achetés chez Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France.

Les contrôles consistent en un « Blanc » (B) de 200 $\mu$ l de SAB, le « Control Substrat » (SC) de 100 $\mu$ l de substrat avec 100 $\mu$ l de SAB et le « Contrôle Homogénat » de 100 $\mu$ l d'homogénat (extrait d'exoenzymes) avec 100 $\mu$ l de SAB. Le test, à proprement parler, des activités potentielles (T) consiste en 100 $\mu$ l d'homogénat et 100 $\mu$ l de substrat. Les contrôles et les tests ont été homogénéisés et incubés à 22°C durant 6h pour la BG, 4h pour la CBH, 7h pour la NAG et 1h pour l'AP. Les réactions ont été stoppées par un ajout de 50 $\mu$ l de NaOH 0,1M. L'absorbance à 405nm a été mesurée avec un lecteur de plaque SAFAS Xenius XML (SAFAS Monaco).

Les résultats ont été exprimés en  $\mu$ mol de produit (p-Nitrophénol, pNP) formé par gramme de matière sèche (DM) par heure.

## II.6. Analyses statistiques.

Des corrélations de Spearman ont été effectuées pour rechercher d'éventuelles relations entre les taux de décomposition, les moyennes d'activités potentielles des exoenzymes extracellulaires, les contenus en Azote et Phosphore de la litière et les valeurs moyennes de  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{PO}_4^{3-}$ , durant la période d'expérimentation.

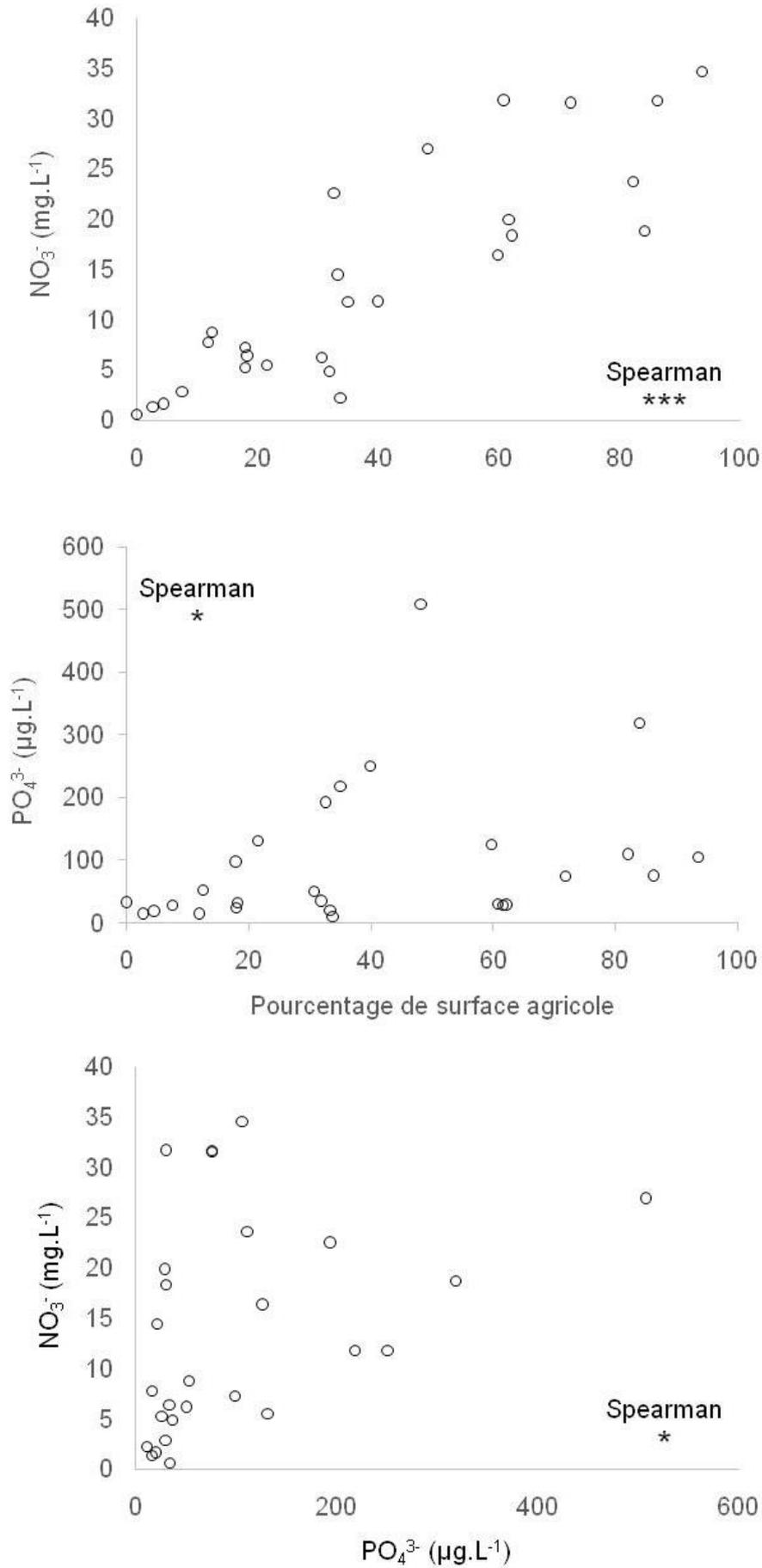
### III. Résultats.

#### III.1. Gradients agricole, $\text{NO}_3^-$ et $\text{PO}_4^{3-}$ .

Les concentrations en  $\text{PO}_4^{3-}$  et  $\text{NO}_3^-$  sont positivement et significativement corrélées aux pourcentages de surface agricole (somme des pourcentages "Terre arable et cultures permanentes" et "Zones agricoles hétérogènes" représentée en **Figure 19**) (respectivement,  $p < 0.05$  et  $p < 0.001$ ), ce qui confirme le lien entre activité agricole et phosphates/nitrates (**Figure 20**). Malgré la significativité de la relation, le lien entre activité agricole et les concentrations en phosphates semble plus compliqué à confirmer avec sûreté du fait de la variabilité des données. Nous observons d'ailleurs une corrélation significative entre les concentrations en  $\text{PO}_4^{3-}$  et  $\text{NO}_3^-$  ( $p < 0.05$ ) mais il semble encore une fois que cette corrélation ne soit influencée que par un point (correspondant à la plus forte concentration en  $\text{PO}_4^{3-}$ ).

#### III.2. Taux de décomposition de la litière en fonction du gradient de nutriments $\text{NO}_3^-$ et $\text{PO}_4^{3-}$ .

Les taux de décomposition sont significativement et positivement corrélés avec les concentrations en  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $p < 0,05$ ) et les concentrations en  $\text{NO}_3^-$  ( $p < 0,05$ ) (**Tableau 8** et **Figure 21**). Nous observons toujours ce point extrême pour les concentrations en  $\text{PO}_4^{3-}$  qui semble porter la corrélation alors que l'on observe une plus grande similarité des réponses des taux de décomposition pour les concentrations faibles. Pour la réponse aux concentrations en  $\text{NO}_3^-$ , nous observons une variabilité plus importante des données pour la réponse des taux de décomposition.



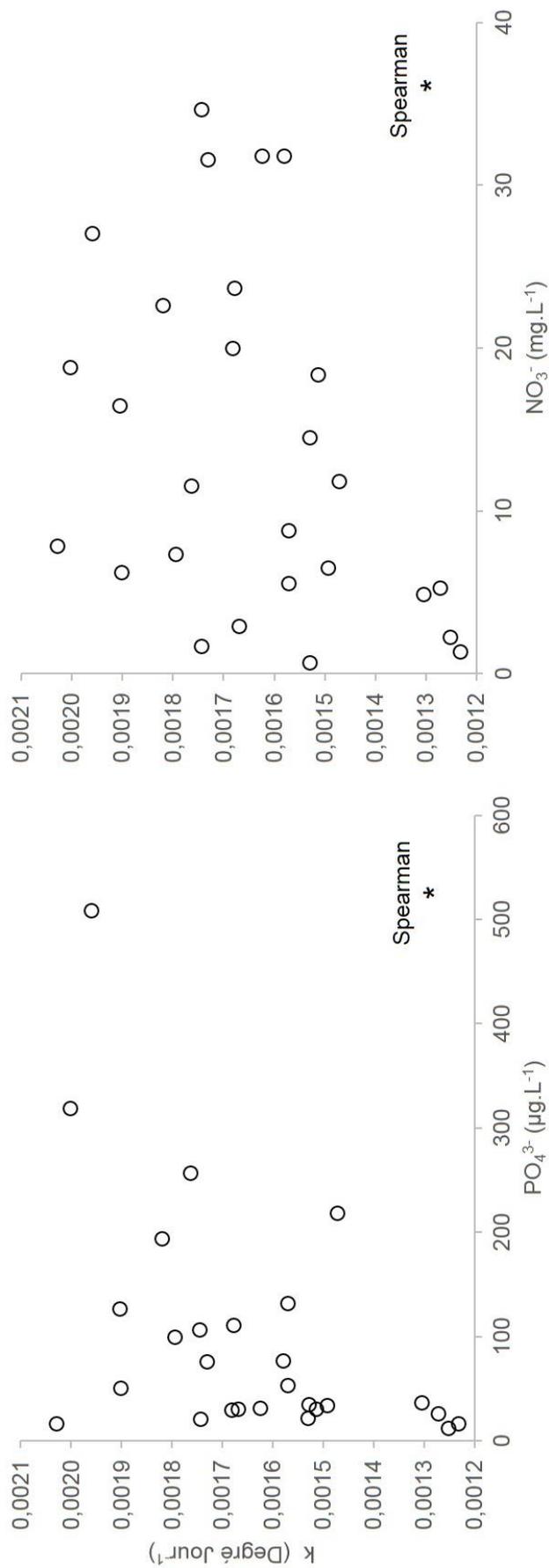
**Figure 20** : Corrélations entre le pourcentage de surface agricole (somme des pourcentages "Terre arable et cultures permanentes" et "Zones agricoles hétérogènes") et les concentrations des eaux en  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  (respectivement en mg.L<sup>-1</sup> et μg.L<sup>-1</sup>) et corrélation entre les concentrations en  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  (respectivement en mg.L<sup>-1</sup> et μg.L<sup>-1</sup>).

### III.3. Activités enzymatiques potentielles en fonction des gradients de nutriments $\text{NO}_3^-$ et $\text{PO}_4^{3-}$ .

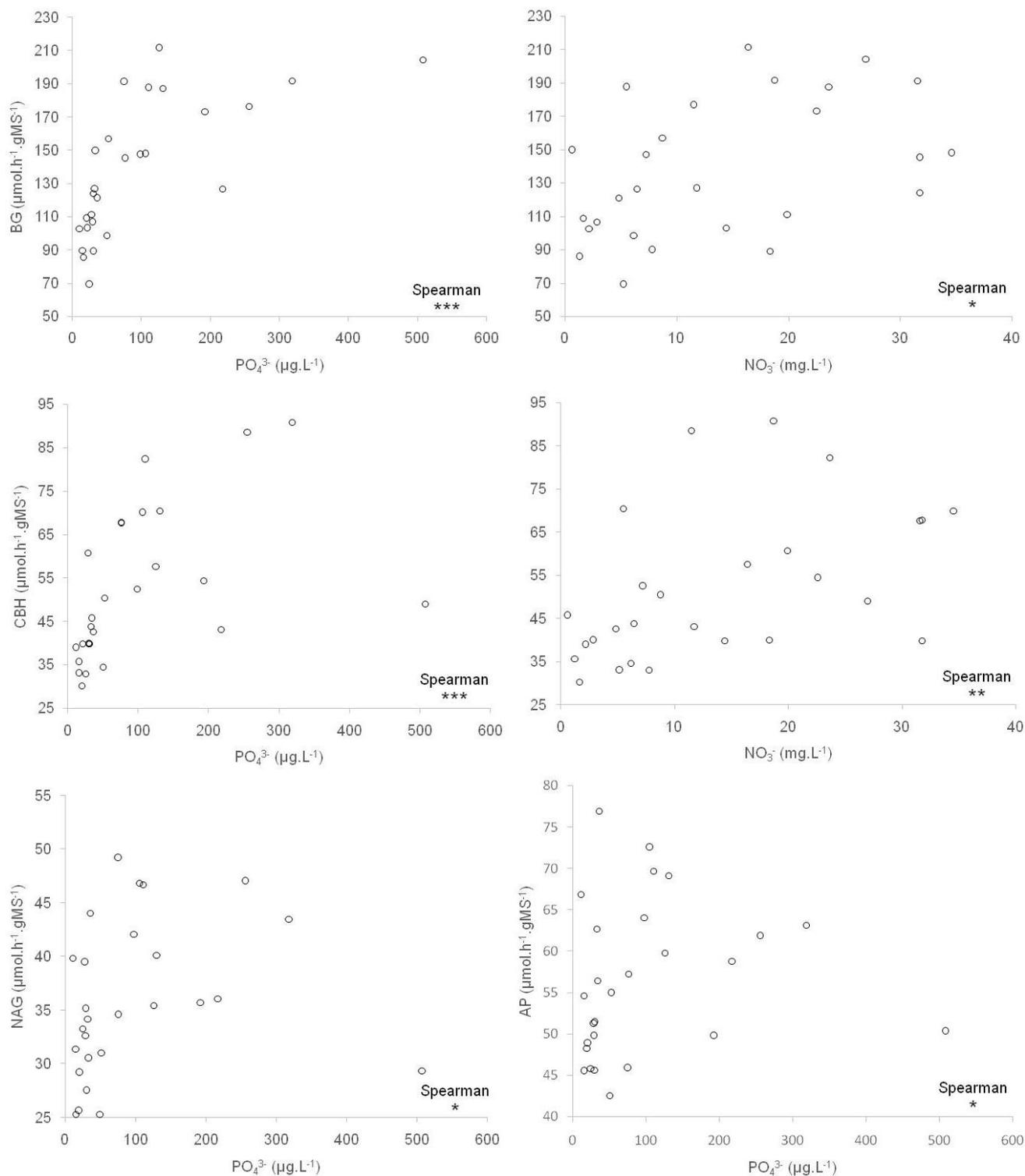
Des corrélations positives significatives (**Tableau 8** et **Figure 22**) ont été mises en évidence entre les activités de la BG, la CBH et la concentration en  $\text{PO}_4^{3-}$  dans les eaux ( $p < 0,001$ ) ainsi qu'avec la concentration en  $\text{NO}_3^-$  (respectivement,  $p < 0,05$  et  $p < 0,01$ ). Les activités de la NAG et de l'AP sont positivement corrélées aux concentrations en  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $p < 0,05$ ). Les différentes réponses semblent mettre en évidence une activité des enzymes dirigées vers la récupération du carbone favorisées par les concentrations en  $\text{PO}_4^{3-}$  et  $\text{NO}_3^-$  alors que les activités récupératrices de N et P ne semblent pas liées aux concentrations en  $\text{PO}_4^{3-}$  et  $\text{NO}_3^-$ .

**Tableau 8** : Corrélations de rang de Spearman les concentrations en  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  (en  $\text{mg.L}^{-1}$ ) et (a) le taux de décomposition des litières ( $\text{Degré Jour}^{-1}$ ); (b) les activités enzymatiques potentielles de la  $\beta$ -1,4-glucosidase (BG), 4- $\beta$ -D-glucancellobiohydrolase (CBH),  $\beta$ -4-N-acetylglucosaminidase (NAG), phosphatase acide (AP) ( $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{gDOM}^{-1}$ ); (c) le pourcentage d'azote (N) et de phosphore (P) dans les litières. Les caractères en gras indiquent une corrélation significative  $p < 0,05$  ( $n=27$ ).

<i>Nutriments</i>		$\text{PO}_4^{3-}$	$\text{NO}_3^-$
(a)	<i>Décomposition sac fine maille (<math>\text{Degré Jour}^{-1}</math>)</i>	<b>0,460 *</b>	<b>0,442 *</b>
(b)	<i>Activité enzymatique (<math>\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{gMS}^{-1}</math>)</i>		
	BG	<b>0,842 ***</b>	<b>0,472 *</b>
	CBH	<b>0,771 ***</b>	<b>0,559 **</b>
	NAG	<b>0,481 *</b>	0,269
	AP	<b>0,394 *</b>	-0,038
(c)	<i>Pourcentage dans les feuilles</i>		
	P	<b>0,853 ***</b>	0,322
	N	<b>0,756 ***</b>	0,283



**Figure 21** : Relations entre les taux de décomposition (Degré Jour<sup>-1</sup>) des litières d'auline et les concentrations en NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (mg.L<sup>-1</sup>). Les corrélations de rang de Spearman indiquent des relations significatives au seuil de 5% (n=27).



**Figure 22 :** Relations entre activités enzymatiques potentielles :  $\beta$ -1,4-glucosidase (BG), 4- $\beta$ -D-glucancellobiohydrolase (CBH),  $\beta$ -4-N-acetylglucosaminidase (NAG), phosphatase acide (AP) ( $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{gMS}^{-1}$ ) et concentrations en nutriments ( $NO_3^-$  en  $\text{mg.L}^{-1}$  et  $PO_4^{3-}$  en  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ).

### III.4. Contenus en carbone, azote et phosphore de la litière en fonction des concentrations en $\text{NO}_3^-$ et $\text{PO}_4^{3-}$ .

Aucune corrélation significative n'ayant été mise en évidence entre les pourcentages de C (avec une moyenne de  $47,13 \pm 1,10$  % dans les litières finales) et les activités enzymatiques ou les concentrations en  $\text{PO}_4^{3-}$  et  $\text{NO}_3^-$ , nos analyses se sont donc concentrées sur les corrélations des activités enzymatiques et des concentrations en  $\text{PO}_4^{3-}$  et  $\text{NO}_3^-$  avec les pourcentages en N et P de la litière.

Les pourcentages en N et P (respectivement  $3,04 \pm 0,29$  et  $0,10 \pm 0,03$  %) de la litière sont significativement corrélés aux concentrations en  $\text{PO}_4^{3-}$  dans les eaux (Spearman,  $p < 0,001$ ). Par contre, nous n'observons pas de corrélation entre ces pourcentages et les concentrations en  $\text{NO}_3^-$  (Tableau 8 et Figure 23).

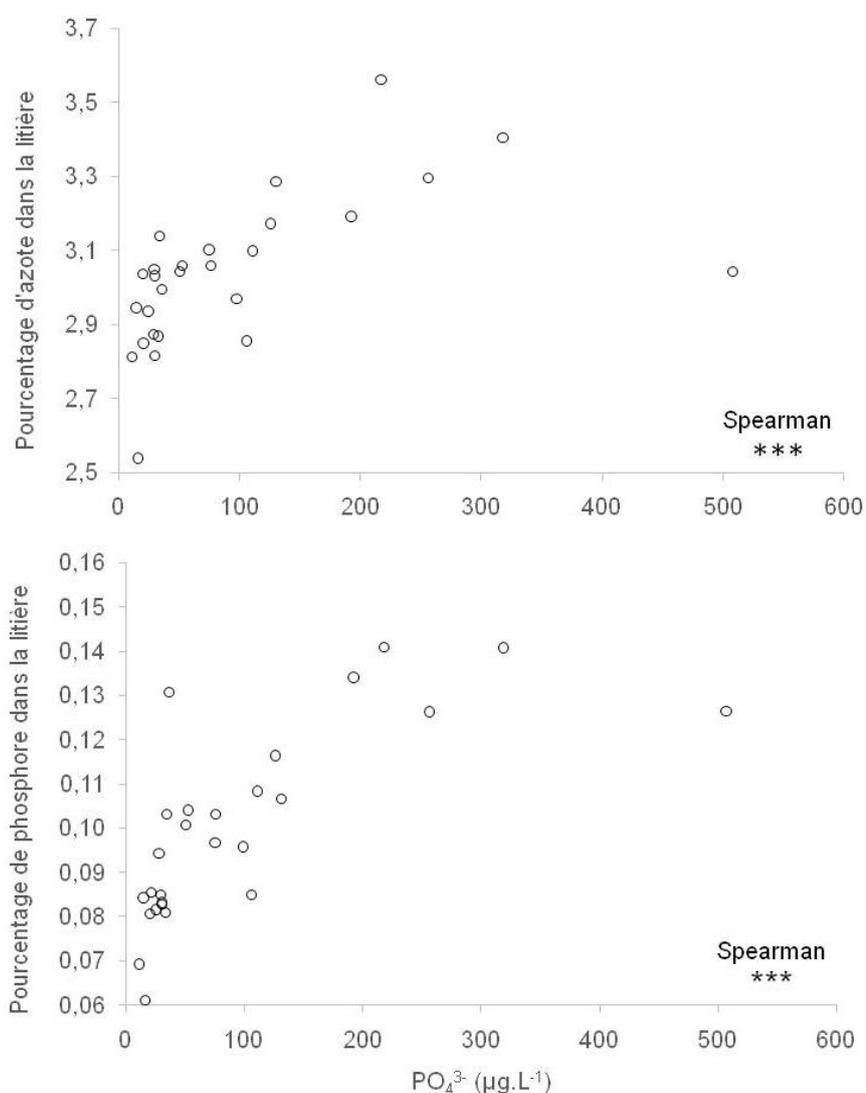


Figure 23 : Corrélations entre le pourcentage d'azote (N) et de phosphore (P) dans les litières à la fin de l'expérimentation en fonction de la concentration des eaux en  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

### III.5. Taux de décomposition des litières en fonction des activités enzymatiques potentielles.

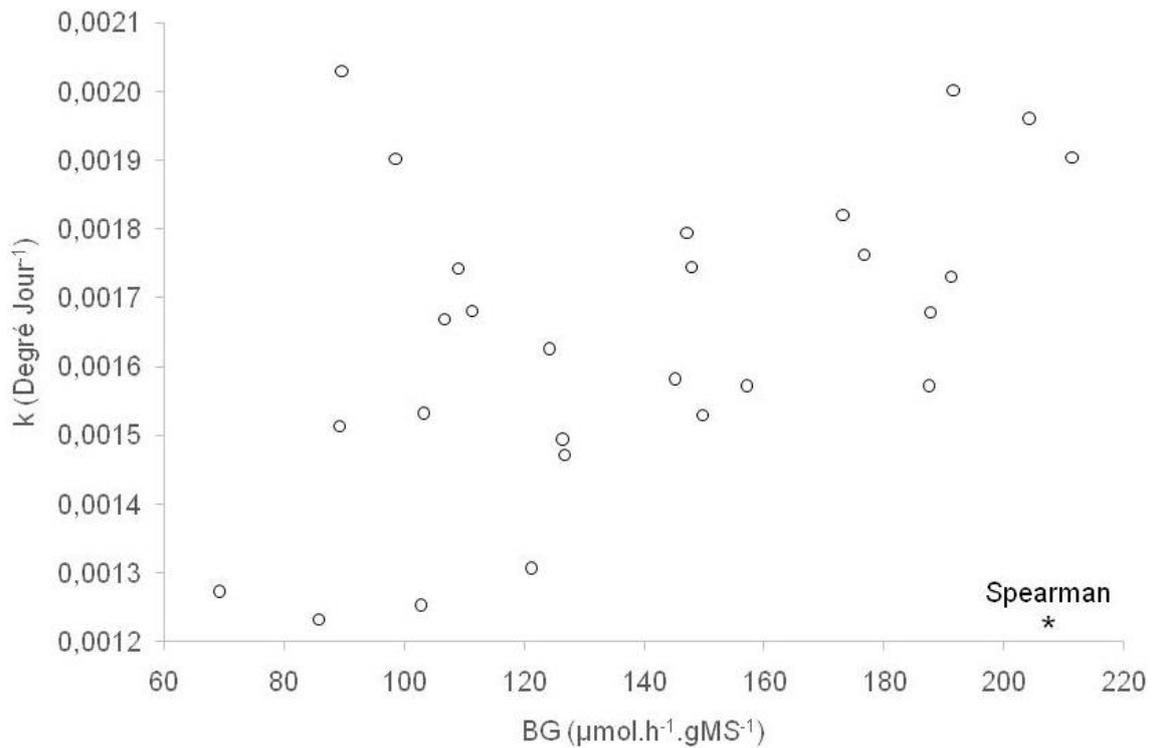
Les taux de décomposition varient du simple au double (de 0,0012 à 0,0021 degré.Jour<sup>-1</sup>). Les k augmentent en conséquence et sont significativement corrélés à l'activité de la BG (Spearman,  $p < 0,05$ ) mais apparaissent être indépendants des activités CBH, NAG et AP (**Tableau 9** et **Figure 24**). Lorsque l'activité BG augmente, les k augmentent significativement. Nous observons cependant deux points (aux alentours de  $BG \approx 100 \mu\text{mol.h}^{-1}.\text{gMS}^{-1}$ ) qui semblent s'écarter de la tendance globale et présentent des valeurs de k proches de celles correspondant à l'activité BG la plus élevée ( $BG \approx 210 \mu\text{mol.h}^{-1}.\text{gMS}^{-1}$ ).

### III.6. Contenus en Carbone, Azote et Phosphore de la litière en fonction des activités enzymatiques potentielles.

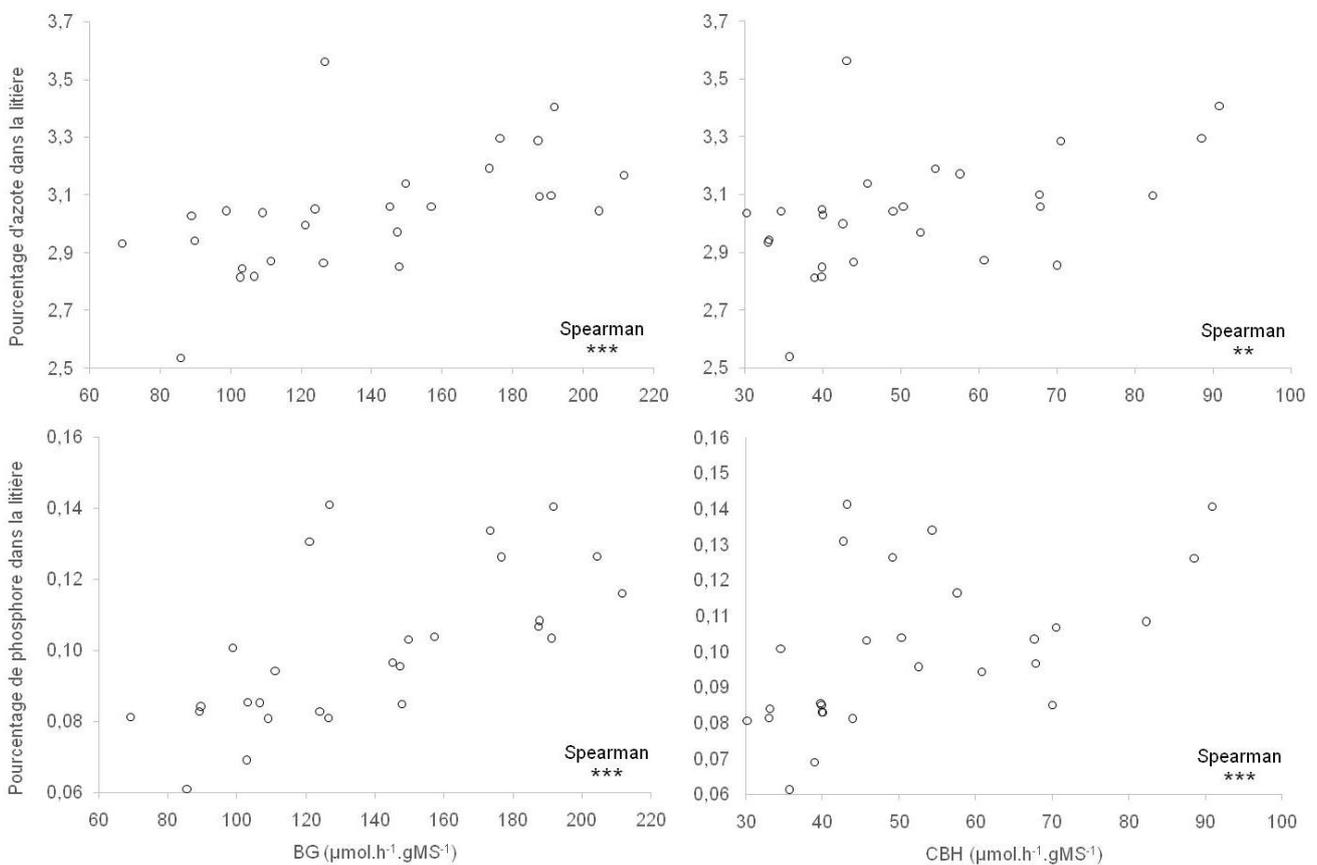
Des corrélations positives significatives ont été observées entre les contenus en P et en N des litières et les activités de la BG et de la CBH (Spearman,  $p < 0.001$ ), ainsi que pour les contenus en N (respectivement  $p < 0.001$  et  $p < 0.01$ ), (**Tableau 9** et **Figure 25**). Par contre, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre les contenus en N et P des litières et les activités NAG et AP.

**Tableau 9** : Corrélations de rang de Spearman entre les activités enzymatique potentielles de la  $\beta$ -1,4-glucosidase (BG), 4- $\beta$ -D-glucancellobiohydrolase (CBH),  $\beta$ -4-N-acetylglucosaminidase (NAG), phosphatase acide (AP) ( $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{gMS}^{-1}$ ) et (a) le taux de décomposition de la litière en sac fine maille (Degré Jour<sup>-1</sup>); (b) le pourcentage d'azote (N) et de phosphore (P) dans les litières. Les caractères en gras indiquent une corrélation significative à  $p < 0,05$  ( $n=27$ ).

<i>Corrélations de Spearman</i>		<i>Activité enzymatique (<math>\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{gMS}^{-1}</math>)</i>			
		BG	CBH	NAG	AP
(a)	<i>Décomposition sac fine maille (Degré Jour<sup>-1</sup>)</i>	<b>0,481 *</b>	0,341	-0,034	-0,200
(b)	<i>Pourcentage dans les feuilles</i>				
	P	<b>0,739 ***</b>	<b>0,627 ***</b>	0,378	0,294
	N	<b>0,697 ***</b>	<b>0,552 **</b>	0.000	0,119



**Figure 24 :** Relation entre le taux de décomposition des sacs fine maille (degré jour<sup>-1</sup>) en fonction de l'activité enzymatique potentielle de la  $\beta$ -1,4-glucosidase (BG) ( $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{gMS}^{-1}$ ).



**Figure 25 :** Relations entre le pourcentage d'azote (N) et de phosphore (P) dans les litières à la fin de l'expérimentation (42j) et les activités enzymatiques potentielles de la  $\beta$ -1,4-glucosidase (BG) et de la 4- $\beta$ -D-glucan cellobiohydrolase (CBH) ( $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{g MS}^{-1}$ ).

#### IV. Discussion

De nombreux facteurs sont susceptibles d'influencer les concentrations en nutriments dans les cours d'eau. Les activités anthropiques avec des sources ponctuelles d'apports (sortie de station d'épuration, eaux usées, etc.) et l'urbanisation sont des facteurs pouvant expliquer les enrichissements en nitrates et en phosphates des eaux de surfaces par des apports directs (via le rejet d'eaux généralement usées) ou par des dépositions atmosphériques. Une autre source de nutriments dans les eaux de surface sont les activités agricoles, ces dernières ayant pour particularité d'entraîner des apports diffus (appelés « non-point source pollution » dans la littérature anglo-saxonne), sur de plus ou moins grandes parties du linéaire des cours d'eau. Afin d'appréhender les impacts de l'agriculture sur les caractéristiques chimiques des eaux courantes, les approches prenant en compte l'occupation des sols à l'échelle des bassins versant se sont avérées être particulièrement pertinentes. [Keeney & DeLuca \(1993\)](#) ont observés une corrélation sur 11 ans entre l'utilisation de fertilisants azotés et les concentrations en  $\text{N-NO}_3^-$  dans les eaux de surface de l'Iowa (allant de 2,0 à 9,1  $\text{mg.L}^{-1}$  de moyenne annuelle) correspondant à une intensification de l'activité des pratiques agricoles dès 1945. Similairement, [Turner & Rabalais \(2003\)](#) ont mis en évidence l'influence majoritaire des pratiques agraires (élevage intensif et extensif, utilisation de fertilisants, etc.) sur la qualité des eaux du Mississippi depuis 200 ans, mettant en avant les effets des activités anthropiques au niveau des écosystèmes terrestres sur l'état des écosystèmes aquatiques. Dans notre étude, la prise en compte de l'occupation des sols a permis d'observer une corrélation positive entre les pourcentages de surface agricole avec les concentrations en nitrates dans les eaux. A noter toutefois que les gradients de nitrates et de phosphates observés dans notre étude ne sont pas parfaitement corrélés, probablement en raison des spécificités des nitrates et de leur forte lixivibilité par rapport aux phosphates, plus facilement retenus par la matière organique des sols ([Di & Cameron, 2002](#)), mais aussi probablement dû à d'autres sources d'apports en nitrates et en phosphates dans les cours d'eau qui ne présenterait aucun lien avec l'activité agricole (rejets urbains, rejets d'habitations, etc.).

De nombreux travaux expérimentaux ont démontré l'impact positif d'enrichissement en  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  sur le processus de décomposition des litières. Dans leur méta-analyse, [Ferreira et al. \(2015\)](#) ont mis en avant, par l'analyse de 99 études publiées entre 1970 et 2012, une stimulation de la décomposition par un enrichissement en nutriments spécialement dans les systèmes les plus pauvres en nutriments, mettant en avant la vulnérabilité des systèmes oligotrophes aux enrichissement en nutriments. Pour illustration, [Elwood et al., en 1981](#), avaient déjà mis en évidence, dans un cours d'eau soumis à des augmentations expérimentales de la concentration en  $\text{PO}_4^{3-}$ , l'effet positif du phosphore sur les taux de décomposition (+24%) de litières de chêne rouge (*Quercus rubra*) ainsi qu'un enrichissement en N et P des litières (respectivement 60 et 83% par rapport aux conditions contrôles). Néanmoins, malgré la quantité

de données récoltées durant cette expérimentation, la forme de la relation entre le processus de décomposition microbienne des litières et les concentrations en nutriments n'est pas encore totalement éclaircie. Dans leur article de 2012, [Woodward et al.](#), en se basant sur les résultats d'une expérience de décomposition menée à l'échelle internationale, ont mis en évidence une relation de type unimodale entre les taux de décomposition par les invertébrés de litières et les concentrations en N et P dissout. Dans notre étude, ciblée sur la décomposition microbienne, il n'a pas été possible de mettre en évidence une relation de ce type. En effet, la relation semble être positive et monotone (voir une tendance à la saturation en réponse aux concentrations en phosphates les plus élevées). Les conséquences d'un excès en nutriments, pouvant potentiellement entraîner une diminution de l'abondance des invertébrés déchetiqueurs à l'origine de la réduction de la décomposition par [Woodward et al. \(2012\)](#) ainsi que par [Baldy et al. \(2007\)](#), ne sont donc probablement pas si simplement applicables au cas des microorganismes. Les concentrations susceptibles d'inhiber l'activité des microorganismes semblent donc ne pas avoir été atteintes dans notre expérience, mettant en évidence une forte résistance du processus de décomposition microbienne face à l'augmentation des nutriments dans les eaux. Ce résultat est d'autant plus intéressant que bien souvent, dans les cours d'eau agricoles, les concentrations en nitrates et en pesticides sont souvent corrélées (par exemple, [Puckett & Hughes, 2005](#)). Malgré l'absence de mesures de pesticides dans les eaux dans le cadre de notre étude, nous pourrions penser que les concentrations en pesticides aient été plus élevées pour les plus hautes concentrations en  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{PO}_4^{3-}$ , en lien avec le gradient d'occupation du sol agricole mais surtout suivant les types de cultures en présence. L'absence de diminution de la décomposition microbienne le long des gradients de nutriments pourrait nous laisser penser à un effet moindre ou une absence d'effet de ces composés xénobiotiques sur les microorganismes décomposant les litières (comme observé par [Brosed et al., 2016](#)), toutefois l'effet des pesticides et l'impact sur la décomposition des litières dans ce contexte restent bien évidemment à être observés, testés et confirmés ou infirmés par des études plus spécifiques. Ce résultat corroborerait les résultats antérieurs montrant que les microorganismes décomposeurs de litière, se développant à l'intérieur d'une matrice pouvant les protéger de l'action directe de composés toxiques, sont relativement tolérants à des expositions conséquentes en composés toxiques par rapport à des microorganismes se développant à l'extérieur de la matrice foliaire ([Arce-Funck et al., 2013 a](#)).

Les résultats de notre expérience montrent de très bonnes relations entre les concentrations en nutriments dans les eaux et le taux de décomposition d'une part, et entre ces concentrations en nutriments et les activités enzymatiques dirigées vers la dégradation des composés carbonés (BG et CBH) d'autre part. D'après les résultats non différents concernant les pourcentages de C dans les litières, cette augmentation d'activité ne semble pas être issue d'une carence que les organismes cherchent à pallier en augmentant leur activité enzymatique. Il

semblerait donc que la stimulation de la décomposition par les concentrations en  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  découle de l'augmentation des activités enzymatiques liée à l'augmentation de ces mêmes nutriments et augmentant les activités récupératrices de C. De ce résultat, il nous semble que la mesure d'activités enzymatiques pourrait constituer un bon proxy comme indicateur de l'équilibre entre la disponibilité en C, N, et P des cours d'eau ainsi que de l'activité microbienne dans les litières végétales. Par ailleurs, il est intéressant de noter que dans notre étude, cette stimulation des activités enzymatiques dirigées vers la dégradation des composés carbonés (BG et CBH) est peu corrélée à l'augmentation des activités enzymatiques dirigées vers la récupération des composés azotés (NAG) ou phosphorés (AP). Dans la littérature, cette corrélation entre la production des différentes enzymes a pourtant été avancée comme étant assez générale dans les systèmes terrestres et sédimentaires (voir [Sinsabaugh, Hill & Follstad Shah, 2009](#)). Des entorses à cette relation avaient déjà été observées dans le cas de limitations en nutriments N et P. En particulier, [Clivot \*et al.\* \(2013\)](#), avaient pu mettre en évidence le blocage du cycle du phosphore dans des cours d'eau acidifiés à l'aide des mesures d'activités écoenzymatiques (Phénoloxidase, BG, NAG et AP), proposant ainsi l'utilisation des activités écoenzymatiques comme un outil de compréhension des limitations nutritives dans les ruisseaux. Dans notre étude, nous pouvons ainsi nous attendre à une diminution de l'activité phosphatase acide avec l'augmentation du  $\text{PO}_4^{3-}$  dans l'eau. Cette hypothèse est à rejeter, une corrélation positive (bien que faible) entre les deux paramètres ayant même été mise en évidence. De la même manière, une activité plus élevée de la NAG aurait pu indiquer des cas de déficit en azote pour les microorganismes. Néanmoins, l'immobilisation microbienne de nutriments a dû être assez efficace pour ne pas avoir à sur-exprimer l'activité d'exoenzyme nécessaire à la récupération du N malgré le fait que certains sites présentent de très faibles concentrations en  $\text{NO}_3^-$ . L'utilisation des activités écoenzymatiques comme outil de diagnostic de la nature et de l'intensité des limitations minérales du processus de décomposition n'est donc peut être qu'à appliquer aux cas extrêmes de limitation.

A noter que les suivis d'activités enzymatiques ont été réalisés, dans le cadre de notre étude, sur des disques de litière, donc au plus près de la source de matière détritique à décomposer, exprimant à un instant  $t$  les activités des microorganismes associés aux litières. Des mesures d'activités enzymatiques réalisées directement sur des prélèvements d'eau des ruisseaux, si elles s'avéraient être suffisamment intenses pour être mesurables, pourraient être envisagées pour mieux comprendre les processus en jeu dans le cours d'eau, et ce, de manière plus intégrative que sur un disque de litière d'une essence donnée. En effet, la libération d'exoenzymes permet aux décomposeurs d'augmenter la récupération et la minéralisation d'éléments essentiels à partir de la matière détritique de manière très localisée (à l'échelle de la zone d'accumulation de matières détritiques). Toutefois il a été démontré, plus particulièrement

pour la BG et l'AP, que cette forte activité des exoenzymes pouvait être conservée malgré une délocalisation bien en aval de son site de production (Chappell & Goulder, 1994). L'analyse d'un pool d'enzymes à l'échelle d'un cours d'eau pourrait peut-être se révéler être un bon indicateur fonctionnel dans le cadre de suivi de cours d'eau soumis à diverses altérations.

Nous avons pu observer au cours de notre étude une forte corrélation uniquement entre le gradient en  $\text{PO}_4^{3-}$  et les proportions de N et P retrouvés dans les litières à la fin de l'expérimentation. Bien que les deux gradients de  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  impactent positivement les taux de décomposition des litières (principalement par une augmentation de l'activité des exoenzymes dirigées vers la dégradation des composés carbonés de la litière), seule la concentration en  $\text{PO}_4^{3-}$  semble être impliquée dans l'immobilisation microbienne du N et du P. Les microorganismes décomposeurs, et les hyphomycètes aquatiques en particulier, sont capables d'immobiliser dans leur biomasse des quantités importantes d'éléments inorganiques, en particulier de phosphore (Danger & Chauvet, 2013 ; Danger, Gessner & Bärlocher, 2016). L'accumulation de phosphore et d'azote observée dans les détritits le long du gradient de  $\text{PO}_4^{3-}$  valide bien ce phénomène *in natura*. L'absence de réponse au gradient d'azote pourrait potentiellement s'interpréter comme une capacité moindre pour les microorganismes à stocker des éléments azotés, ces éléments azotés étant notamment fortement relargués à l'extérieur de la biomasse microbienne notamment sous forme d'exoenzymes. Cette utilisation directe du N immobilisé dans des exoenzymes divers potentiellement relargués rapidement dans l'environnement pourrait expliquer l'absence de corrélations avec les concentrations en  $\text{NO}_3^-$ . Là encore, des analyses et des expériences plus spécifiquement dédiées à tester ce questionnement seront nécessaires. Dans tous les cas, l'augmentation observée de la qualité élémentaire des détritits le long du gradient de phosphore pourrait avoir des conséquences très marquées sur les consommateurs de détritits, leurs traits d'histoire de vie étant directement reliés au niveau de nutriments présents dans ces détritits (par exemple, Danger *et al.*, 2013), et pourrait même avoir des conséquences sur l'ensemble de la production secondaire des cours d'eau (Cross *et al.*, 2003). Il est toutefois envisageable que là encore, une relation unimodale se mette en place, avec une disparition progressive des invertébrés déchetiers lorsque les niveaux de nutriments deviennent trop élevés (exemple avec l'observation d'une absence de déchetiers dans des cours d'eau de haut niveau trophique mis en évidence par Baldy *et al.*, 2007), et ce pour diverses raisons écologiques: diminution de la concentration d' $\text{O}_2$  dissout, apports croissants de pesticides, effet létal de l'augmentation des concentrations en N sous différentes formes (exemple avec les effets de l'ammoniaque sur la survie et la consommation chez les invertébrés benthiques observé par Baldy *et al.*, 2007), etc.

Nos résultats ont permis de mettre en évidence que contrairement au processus de décomposition assuré par les macroinvertébrés, la décomposition des litières assurée par les

microorganismes décomposeurs ne suivait pas une relation unimodale avec l'augmentation des taux de nutriments, mais semblait augmenter le long de ce gradient. Cette stimulation de la décomposition peut s'expliquer par l'accroissement des activités enzymatiques permettant la dégradation des composés carbonés. Ces augmentations se font conjointement avec une augmentation des taux d'azote et de phosphore dans les détritux, et ce du fait de l'immobilisation microbienne. Par ailleurs, contrairement à notre hypothèse, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'impact négatif de la disponibilité en nutriments sur les activités enzymatiques dirigées vers la récupération de l'azote et du phosphore. Dans notre contexte d'étude, les activités enzymatiques ne semblent pas montrer de stress nutritifs subis par les microorganismes. Néanmoins, des études supplémentaires seront nécessaires pour vérifier ce point dans le cas où les concentrations en nutriments sont beaucoup plus faibles.

## CHAPITRE III :

Les Acides Gras Essentiels comme élément limitant dans les cours d'eau de tête de bassin versant Vosgiens.



## Partie 1. Présence et réponse des producteurs primaires le long d'un gradient d'acidification (Nord-est, Vosges)

### I. Introduction

Bien que la présence de producteurs primaires dans les cours d'eau de tête de bassin versant n'ait jamais été remise en cause, leur rôle, notamment au niveau des flux de carbone dans les réseaux trophiques, a souvent été négligé. Pourtant, des auteurs tel que [Minshall \(1978\)](#), pensaient déjà que la dépendance générale des cours d'eau à la matière organique détritique était surestimée et que l'autotrophie des systèmes jouait sûrement un rôle beaucoup plus important que ce que l'on ne pensait. Il a été démontré que dans les cours d'eau de tête de bassin versant, la production primaire dépendait principalement des facteurs locaux tel que les températures de l'air et de l'eau, mais aussi et peut être surtout de la luminosité et de la limitation en nutriments ([Hill, Ryon & Schilling, 1995](#) ; [Pastor et al., 2017](#)). L'un des principaux enjeux des producteurs primaires dans les eaux courantes est l'acquisition du carbone inorganique par transformation du CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O en composés carbonés via l'utilisation d'énergie lumineuse ([Falkowski & Raven, 2007](#)), carbone qui sera ensuite récupéré par les hétérotrophes sous forme organique. En milieu aquatique ouvert, la production primaire joue notamment un rôle essentiel dans l'oxygénation du milieu et le métabolisme des écosystèmes ([Odum, 1956](#) ; [Mulholland et al., 2001](#)), avec des effets qui se répercutent fortement à l'aval. Dans les cours d'eau de tête de bassin versant non dégradés, une partie de l'oxygénation se fait également par le brassage des eaux courantes. [Sabater et al. \(2002\)](#) ont étudié la réponse de biofilms phototrophes à divers facteurs, physiques (lumière, température, force du courant), chimiques (disponibilité en nutriments, effets toxiques) et biologiques (composition des communautés : algales, bactériennes et fongiques ; structure du biofilm : arrangement des couches et accumulation de biomasse). Ils ont démontré que ces biofilms étaient des éléments clés dans les processus d'auto-purification des cours d'eaux, les producteurs primaires apparaissent donc comme des facteurs essentiels de contrôle de la qualité des eaux de surfaces.

Dans les cours d'eau de tête de bassin versant, la production primaire peut être assurée par des bryophytes, des macrophytes ou encore des biofilms phototrophes. La suite de ce chapitre sera dédiée à ce dernier compartiment, notamment aux biofilms épilithiques (c'est-à-dire, se développant à la surface des blocs rocheux tapissant le fond des cours d'eau). En effet, [Pastor et al. \(2017\)](#) ont confirmé que la présence de substrats grossiers facilitait l'implantation et le développement de producteurs primaires, plus particulièrement de biofilms autotrophes et que la présence de rochers et de zones sableuses favorisait la production primaire algale. Vu la nature des divers substrats dans les ruisseaux vosgiens, nous nous sommes donc focalisés sur la recherche de biofilms phototrophes pour évaluer la production primaire dans ces systèmes.

Quel que soit l'écosystème considéré, la diversité de producteurs primaires ainsi que leur qualité en tant que ressource joue un rôle crucial dans le développement des espèces herbivores (Knops *et al.*, 1999; Marzetz *et al.*, 2017). Dans des ruisseaux forestiers Vosgiens, Dangles (2002) a mis en évidence que les espèces qualifiées de « détritivores déchetteurs » étaient finalement assez peu spécialisées dans un type de ressource et plus encore, ces espèces classées parmi le groupe fonctionnel des déchetteurs, définis comme des consommateurs de matière organique morte (litières de feuilles principalement) présentaient régulièrement des algues benthiques et/ou des bryophytes dans leur tractus digestif (44% des taxons étudiés se sont avérés contenir des restes d'algues benthiques et de bryophytes). Cette étude a ainsi permis d'observer que les producteurs primaires pouvaient être une ressource alternative pour une grande diversité de déchetteurs dans les cours d'eau de tête de bassin versant. Par ailleurs, plus récemment, Crenier *et al.* (2017) ont pu démontrer l'importance de l'ingestion de ressources algales (diatomées) sur les traits d'histoire de vie de crustacés amphipodes (*Gammarus fossarum*) de cours d'eau de tête de bassin versant, les acides gras essentiels apportés par ces ressources conférant une meilleure survie et une croissance plus importante aux organismes qui en consomment.

Concernant l'acidification, Hall *et al.* (1980) ont observé une diminution des densités d'hyphomycètes aquatiques sur le lit des cours d'eau ainsi que sur des litières d'érable et de bouleau, et plus généralement de la diversité des espèces de macroinvertébrés et de la complexité des réseaux trophiques dans un contexte d'acidification expérimentale. Dans sa review, Stokes (1986) a également mis en évidence que malgré un maintien des biomasses et de la productivité, l'acidification entraîne une constante diminution de la richesse spécifique et de profonds changements dans la composition des espèces des producteurs primaires. Thiébaud, Guérol & Muller (1995) ont observé que dans des systèmes acidifiés faiblement minéralisés vosgiens, malgré des concentrations en aluminium élevées, les macrophytes présentes, dont certaines bryophytes, semblaient avoir les capacités de se développer dans ces conditions d'acidité. En se focalisant sur ces bryophytes le long d'un gradient d'acidification vosgien, Thiébaud *et al.* (1998) ont mis en avant que les espèces acidophiles (tel que, *Marsupella emarginata*) présentaient une sensibilité aux fortes concentrations en cations alors que les neutrophiles (tel que, *Rhynchostegium riparioides*) présentaient une sensibilité à la toxicité des protons (le pH étant une relation logarithmique inverse à la concentration en protons) et de l'aluminium qu'à une limitation en cations. Des études supplémentaires ont permis de mettre en évidence les enchainements des communautés macrophytiques de l'amont à l'aval comme un indicateur d'eutrophisation et d'acidification dans les cours d'eau oligotrophe des Vosges (Thiébaud & Muller, 1999). Dans un contexte de récupération d'acidification (1998-2003) dans les îles Britanniques, Monteith *et al.* (2005) ont observé une tendance au retour d'espèces acido-

sensibles (diatomées épilithiques et assemblages de macroinvertébrés), une augmentation proportionnelle des prédateurs ainsi qu'une augmentation des observations d'espèces de macrophytes acido-sensibles et le retour de juvéniles de poissons dans les eaux les plus acidifiées. Les données sur les algues se développant au sein des biofilms phototrophes restent beaucoup plus parcellaires, mais certains auteurs ont suggéré que l'acidification pouvait entraîner une augmentation de la part d'herbivorie par les invertébrés dits déchiqueteurs ([Ledger & Hildrew, 2000](#)).

Les changements de composition spécifique des communautés de producteurs primaires dans les ruisseaux acidifiés pourraient entraîner d'importantes modifications dans la qualité biochimique et/ou stœchiométrique de la biomasse végétale, notamment au niveau de la biomasse produite par les biofilms phototrophes. En particulier, dans les cours d'eau soumis à l'acidification, les concentrations élevées en Al perturbent le cycle du P ([Clivot \*et al.\*, 2014 a](#)), entraînant probablement une augmentation de la limitation en P, réduisant ainsi le développement de certains organismes autotrophes, couplé à une réduction du contenu en P de ces organismes. Par ailleurs, il a été démontré lors d'expérimentations menées sur des biofilms phototrophes en laboratoire que les niveaux de disponibilité en P provoquaient des changements de communautés algales, des biofilms dominés par les diatomées pouvant se révéler dominés par des chlorophycées dès lors que les niveaux de P étaient accrus (3 niveaux: 20, 100 et 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ; [Leflaive \*et al.\*, 2015](#)). Dans le cas de l'acidification, certains travaux ont pu montrer que l'acidification des eaux en milieu lacustre pouvait favoriser le développement d'algues vertes filamenteuses au dépend de diatomées benthiques ([Turner \*et al.\*, 1987](#)). De même, dans des cours d'eau de tête de bassin versant, des pertes taxonomiques importantes au sein des communautés d'invertébrés ont pu être observées ([Guérol \*et al.\*, 2000](#)), pouvant expliquer le développement de producteurs primaires en l'absence de son consommateur (relation mise en évidence expérimentalement par exemple dans les travaux de [Steinman \*et al.\*, 1987](#)). Plus localement, l'étude de [Pierre \(1996\)](#) a montré que dans les Vosges, l'acidification des ruisseaux forestiers se traduisait par une réduction de la diversité des diatomées, mais surtout par une raréfaction de ces diatomées pour les valeurs de pH les plus faibles. Les algues vertes constituant des ressources de moindre qualité pour les consommateurs par rapport aux diatomées en ce qui concerne leurs teneurs en AGPI ([Masclaux \*et al.\*, 2009](#)), l'acidification pourrait ainsi engendrer des variations fortes de la qualité biochimique des biofilms épilithiques. Il est également envisageable que le stress induit par de faibles valeurs de pH conjuguées à des concentrations élevées en aluminium induisent des modifications physiologiques de la synthèse des acides gras par certains taxons en présence (par exemple, chez l'algue brune *Fucus serratus* et une contamination au cuivre observé par [Smith, Bryan & Harwood, 1985](#)). Néanmoins, à ce jour, les

impacts de l'acidification des cours d'eau sur la qualité des biofilms épilithiques restent peu connus.

La question principale de cette partie de mon travail est la suivante : « Comment la quantité et la qualité des biofilms seront affectés par la pression d'acidification ? ». Les objectifs de cette étude seront donc de :

- i) quantifier *in situ* la production primaire dans les cours d'eau de tête de bassin versant forestiers le long d'un gradient d'acidification dans les Vosges,
- ii) observer si l'acidification influence le développement des producteurs primaires dans ces systèmes,
- iii) évaluer l'influence de divers paramètres physicochimiques associés à l'acidification (pH et concentrations en Al) sur la qualité stœchiométrique et biochimique des biofilms autotrophes retrouvés dans nos systèmes.

## II. Méthode

### II.1. Sites d'études et dispositifs

Les sites d'études sont situés dans les Vosges (Nord-Est de la France). Le **Tableau 10** donne l'identité des cours d'eau, leurs principales caractéristiques et la localisation des stations. 15 cours d'eau ont été sélectionnés selon un gradient d'acidité sur les deux types de substrat majoritaire dans les Vosges (grès et granite).

Dans l'objectif de pouvoir observer et mesurer un développement de biofilm dans ces sites, nous avons mis en place sur chaque site, à partir du 17 mars 2015, quatre répliques de quatre plaquettes de polyéthylène haute densité d'une surface de 75 cm<sup>2</sup> (5 x 15 cm) et de 8 mm d'épaisseur. Percées aux deux-tiers dans le sens de la largeur, les plaquettes étaient maintenues sur une tige en inox à quelques centimètres au-dessus du lit du cours d'eau, deux à deux et de part et d'autre d'un piquet en acier pour permettre aux plaquettes de rester fixes par rapport au lit du cours d'eau, parallèlement au sens du courant. Le léger décollement du fond des plaquettes permet de limiter le dépôt de sédiment et l'ensablement des dispositifs, qui pourraient fausser l'estimation de la production primaire.

Les plaquettes ont été prélevées par Alice Gossiaux et Philippe Wagner après 2 mois d'immersion dans les cours d'eau. Deux sites (CE et MR) n'ont pas pu être prélevés et analysés en raison d'une perte des dispositifs. Les plaquettes ont ensuite été placées dans des sacs zip-lock (avec seulement un fond d'eau du site pour préserver l'humidité des biofilms et empêcher l'assèchement) au frais avant d'être ramenées au laboratoire. Nous avons également prélevé et

formolé des échantillons (Falcon, 50ml à 2% effectué par Alice Gossiaux) du biofilm présent sur les blocs rocheux au fond des cours d'eau pour identification et comptage des espèces de diatomées en présence (analyse réalisée par R. Le Cohu, Toulouse).

## **II.2. Chimie de l'eau**

Les paramètres chimiques ont été mesurés mensuellement de Décembre 2014 à Juin 2015 (**Tableau 11**) (en parallèle de l'expérimentation présentée dans le Chapitre 2, Partie 1). Pour rappel, des échantillons d'eau ont été prélevés dans des bouteilles de 500ml en polyéthylène. Le pH a été mesuré en laboratoire (pH-mètre microprocesseur : pH 3000, WTW). L'ANC a été déterminée par titration de Gran ([Gran, 1952](#)). Les concentrations en  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ont été mesurées par spectrophotométrie d'absorption atomique (AAS) en flamme, les concentrations en aluminium total en AAS au four graphite après acidification au  $\text{HNO}_3$  (AAAnalyst 100 ; Perkin Elmer and SpectrAA 300 ; Varian) et les concentrations en  $\text{SO}_4^{2-}$  et  $\text{NO}_3^-$  ont été mesurées par chromatographie ionique (Dionex 4500i, colonne AS4ASC ; Sunnyvale, USA).

## **II.3. Mesure des concentrations en chlorophylle a par sonde fluorométrique**

La concentration en chlorophylle a (Chla) du biofilm développé sur les plaquettes a été mesurée aussitôt après prélèvement par Alice Gossiaux à l'aide d'une sonde fluorométrique (BenthosTorch © ; bbe moldaenke GmbH, Schwentinental, Allemagne). L'appareil excite les pigments photosynthétiques des algues benthiques à différentes longueurs d'ondes et capte les réémissions lumineuses après excitation des pigments. Cette technique de fluorimétrie immergeable permet donc de déterminer les concentrations en chlorophylle a totale, et Chla des cyanobactéries, des diatomées, des algues vertes, et la BenthosTorch exprime ces valeurs par unité de surface ( $\mu\text{g Chla.cm}^{-2}$ ). Trois mesures ont été effectuées pour chaque réplica sur la face supérieure des plaquettes. Ces valeurs étant calibrées sur des espèces de laboratoire, les résultats de composition taxonomique des communautés doivent être pris avec précaution et nous donnent une idée certainement imprécise de la composition réelle des communautés composant le biofilm. Cependant, la somme des valeurs mesurées par la BenthosTorch représente un proxy fiable de la biomasse totale en Chla au sein des biofilms, et donc de la biomasse de ces biofilms ([Kahlert & McKie, 2014](#)).

**Tableau 10 :** Caractéristiques géomorphologique des sites d'études.

Site	Code	Coordonnées WGS84 (degrés minutes)	Sous-sol géologique	Ordre	Altitude (m)	Distance à la source (m)	Largeur du chenal (m)	Pente du chenal (%)
Bas-Rupts	BR	6°52'54"E 48°02'17"N	Granite	1	845	900	1.4	20.0
Gentil Sapin	GS	7°05'23"E 48°02'17"N	Grès	1	510	3100	2.3	10.0
Hauts-Rupts	HR	6°53'37"E 48°02'41"N	Granite	2	855	2550	3.3	13.9
La Maix 1	LM1	7°05'40"E 48°29'03"N	Grès	1	516	2200	2.0	8.0
La Maix 3	LM3	7°03'36"E 48°29'34"N	Grès	1	514	30	1.3	3.0
Madeleine	MD	7°07'50"E 48°27'26"N	Grès	1	510	2400	1.9	16.0
Plaine	PL	7°08'24"E 48°31'39"N	Grès	2	490	4900	4.9	3.3
Ravines	RA	6°57'08"E 48°25'47"N	Grès	1	410	3300	2.5	6.0
Rabodeau	RB	7°03'21"E 48°27'35"N	Grès	2	520	5000	4.9	16.0
Rouge-Rupt	RR	6°53'19"E 47°58'28"N	Granite	2	675	4700	5.5	8.4
Tihay	TI	6°52'32"E 47°58'50"N	Granite	1	660	1250	1.8	20.0
Ventron	VE	6°55'22"E 47°58'18"N	Granite	1	820	2500	1.5	10.0
Wassongoute	WA	6°53'22"E 47°58'40"N	Granite	1	690	2600	2.0	13.8

## **II.4. Mesure des biomasses**

Après avoir été ramené au laboratoire, le biofilm a été collecté en raclant les plaquettes à l'aide d'une lame de verre et introduit dans des tubes à centrifuger. Après centrifugation à 8000g pendant 3 minutes, le surnageant est éliminé et le culot est lyophilisé (2 x 48h) puis pesé sur une balance de précision. La masse (mg) obtenue sur nos plaquettes (75 cm<sup>2</sup>) durant 2 mois nous permet d'obtenir une biomasse de biofilm en g MS.m<sup>-2</sup>.an<sup>-1</sup>. En nous rapportant aux pourcentages moyens de C mesurés dans les biofilms durant ces 2 mois de printemps, nous pouvons également calculer une extrapolation annuelle de la biomasse en g de C.m<sup>-2</sup>.an<sup>-1</sup>.

## **II.5. Dosage CNP**

Les contenus en carbone, azote et phosphore (CNP) des biofilms ont été obtenus après homogénéisation par broyage des biofilms lyophilisés. Le contenu en C et N a été déterminé avec un analyseur élémentaire CHN et le contenu en P a été déterminé en utilisant une méthode colorimétrique après oxydation au persulfate de sodium ([Ormaza-González & Statham, 1996](#) ; [Danger et al., 2013 a](#)). Ils sont exprimés en pourcentage de masse sèche (% MS).

## **II.6. Dosage et identification des acides gras**

Le dosage et la détermination des acides gras ont été dosés par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS). Brièvement, l'extraction des lipides a été effectuée en utilisant une solution de chloroforme/méthanol, selon le protocole proposé par [Folch, Lees & Stanley \(1957\)](#). Une fois extrait, les acides gras sont convertis en esters méthyliques d'acides gras (FAME) par transesterification catalysée par un acide et analysés sur un chromatographe en phase gazeuse (Agilent technologies™ 6850). Les FAME ont été identifiés en comparant les temps de rétention avec ceux obtenus à partir de standards Supelco® et de laboratoire, et quantifiés par rapport aux standards internes (13 : 0). Une fois identifiés, les acides gras ont été validés par un spectromètre de masse à chromatographie en phase gazeuse (GC MS Agilent Technologies 6850™ GC 5975B VL MSD) ([Arce-Funck et al., 2015](#)).

## **II.7. Analyse des données**

Pour étudier la relation entre les pH moyens et les moyennes de concentration en aluminium, nous avons effectué des tests de corrélation de Spearman. Concernant les liens entre les différents paramètres de qualité potentielle des biofilms et certains paramètres chimiques de l'eau (pH et concentration en Al), nous avons testé l'application d'un modèle de régression

linéaire. Les données obtenues par benthotorche devant être considérées avec prudence, nous n'avons pas testé statistiquement ces données mais les avons considérés comme des indications à confirmer par les comptages d'algues filamenteuses à venir.

Toutes les analyses ont été effectuées sur le logiciel R Studio (v 0.98.1091) ([R Development Core Team, 2015](#)).

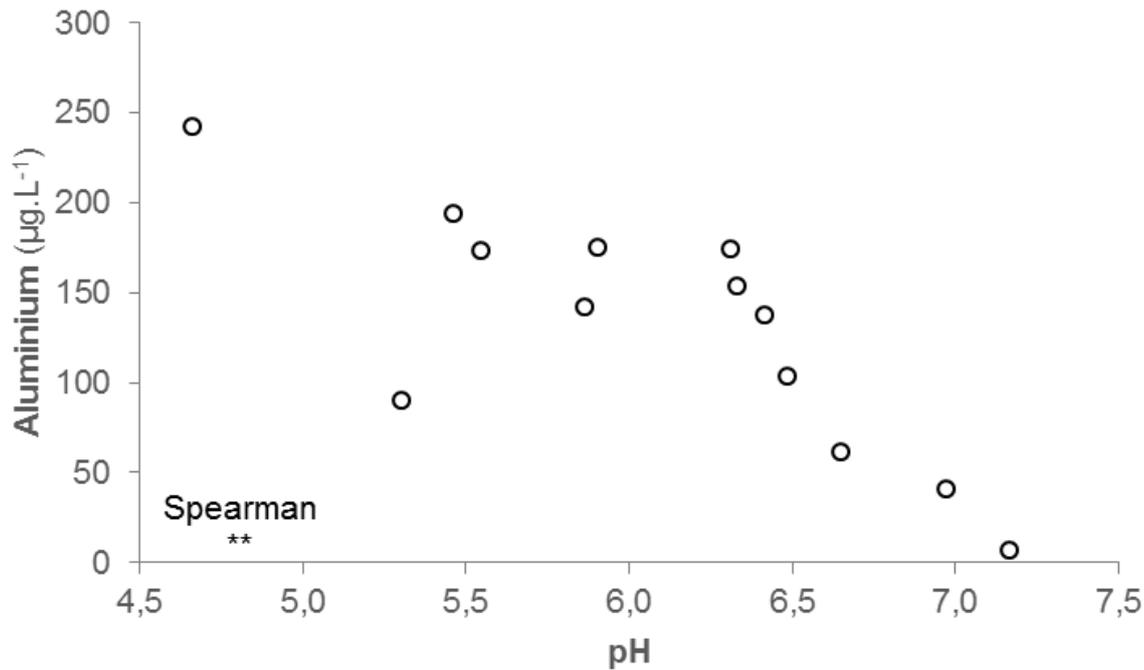
### III. Résultats

#### III.1. Caractéristiques physico-chimiques des cours d'eau

Le gradient de pH variait de 4,66 à 7,17 unités pH avec des concentrations moyennes faibles en  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{SO}_4^{2-}$  (**Tableau 11**) (respectivement  $1,66 \pm 0,99$  et  $3,76 \pm 2,08 \text{ mg.L}^{-1}$ ) en comparaison aux concentrations observées précédemment sur ces sites (Confer, Chapitre 2, Partie 1). Cette diminution par rapport à un précédent suivi en 1998 était également observé pour les concentrations en Al ( $106,26 \pm 80,40 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ ). Nous avons pu observer une corrélation négative entre les valeurs moyennes de pH et les concentrations moyennes en aluminium total au sein de nos sites (Spearman,  $p\text{-value} < 0,01$  ; **Figure 26**).

Tableau 11 : Paramètres chimiques des sites d'études.

Site	pH		Alcalinité ( $\mu\text{eq.L}^{-1}$ )		$\text{Ca}^{2+}$		$\text{Mg}^{2+}$ ( $\text{mg.L}^{-1}$ )		$\text{NO}_3^-$ ( $\text{mg.L}^{-1}$ )		$\text{SO}_4^{3-}$		Al ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	
	Moy. $\pm$ Et.		Moy. $\pm$ Et.		Moy. $\pm$ Et.		Moy. $\pm$ Et.		Moy. $\pm$ Et.		Moy. $\pm$ Et.		Moy. $\pm$ Et.	
BR	5,46 $\pm$ 0,35		19,77 $\pm$ 12,48		0,70 $\pm$ 0,10		0,37 $\pm$ 0,05		0,90 $\pm$ 0,56		1,71 $\pm$ 0,26		194 $\pm$ 58	
GS	4,66 $\pm$ 0,36		-6,43 $\pm$ 10,81		1,00 $\pm$ 0,23		0,41 $\pm$ 0,08		2,57 $\pm$ 0,39		3,79 $\pm$ 0,34		242 $\pm$ 131	
HR	6,49 $\pm$ 0,26		110,36 $\pm$ 42,30		1,58 $\pm$ 0,44		0,84 $\pm$ 0,20		0,72 $\pm$ 0,20		1,75 $\pm$ 0,26		104 $\pm$ 30	
LM1	6,42 $\pm$ 0,60		169,27 $\pm$ 120,71		3,01 $\pm$ 1,35		1,37 $\pm$ 0,63		2,35 $\pm$ 0,38		3,69 $\pm$ 0,23		138 $\pm$ 110	
LM3	7,17 $\pm$ 0,19		533,71 $\pm$ 74,56		7,16 $\pm$ 1,25		3,33 $\pm$ 0,15		2,76 $\pm$ 0,20		5,27 $\pm$ 0,62		7 $\pm$ 12	
MD	5,90 $\pm$ 0,87		53,74 $\pm$ 50,83		1,70 $\pm$ 0,60		0,60 $\pm$ 0,17		2,90 $\pm$ 0,49		3,36 $\pm$ 0,40		176 $\pm$ 129	
PL	6,97 $\pm$ 0,14		272,26 $\pm$ 69,19		4,84 $\pm$ 0,82		2,20 $\pm$ 0,34		3,35 $\pm$ 0,71		5,22 $\pm$ 0,50		41 $\pm$ 20	
RA	5,30 $\pm$ 0,41		10,36 $\pm$ 9,73		1,71 $\pm$ 0,18		0,68 $\pm$ 0,02		2,22 $\pm$ 0,28		6,28 $\pm$ 0,41		90 $\pm$ 47	
RB	6,31 $\pm$ 0,84		97,95 $\pm$ 86,02		2,30 $\pm$ 1,20		0,73 $\pm$ 0,20		2,16 $\pm$ 0,26		4,31 $\pm$ 0,29		175 $\pm$ 103	
RR	5,55 $\pm$ 0,30		19,80 $\pm$ 10,59		0,55 $\pm$ 0,08		0,18 $\pm$ 0,02		0,44 $\pm$ 0,26		1,59 $\pm$ 0,18		174 $\pm$ 37	
TI	6,65 $\pm$ 0,23		148,29 $\pm$ 68,14		2,73 $\pm$ 0,51		1,20 $\pm$ 0,21		2,67 $\pm$ 1,40		1,99 $\pm$ 0,18		62 $\pm$ 32	
VE	6,33 $\pm$ 0,79		101,89 $\pm$ 100,71		1,85 $\pm$ 1,45		0,21 $\pm$ 0,04		0,57 $\pm$ 0,26		1,65 $\pm$ 0,38		154 $\pm$ 25	
WA	5,86 $\pm$ 0,40		30,76 $\pm$ 24,33		0,73 $\pm$ 0,58		0,15 $\pm$ 0,01		0,35 $\pm$ 0,19		1,98 $\pm$ 0,25		142 $\pm$ 12	



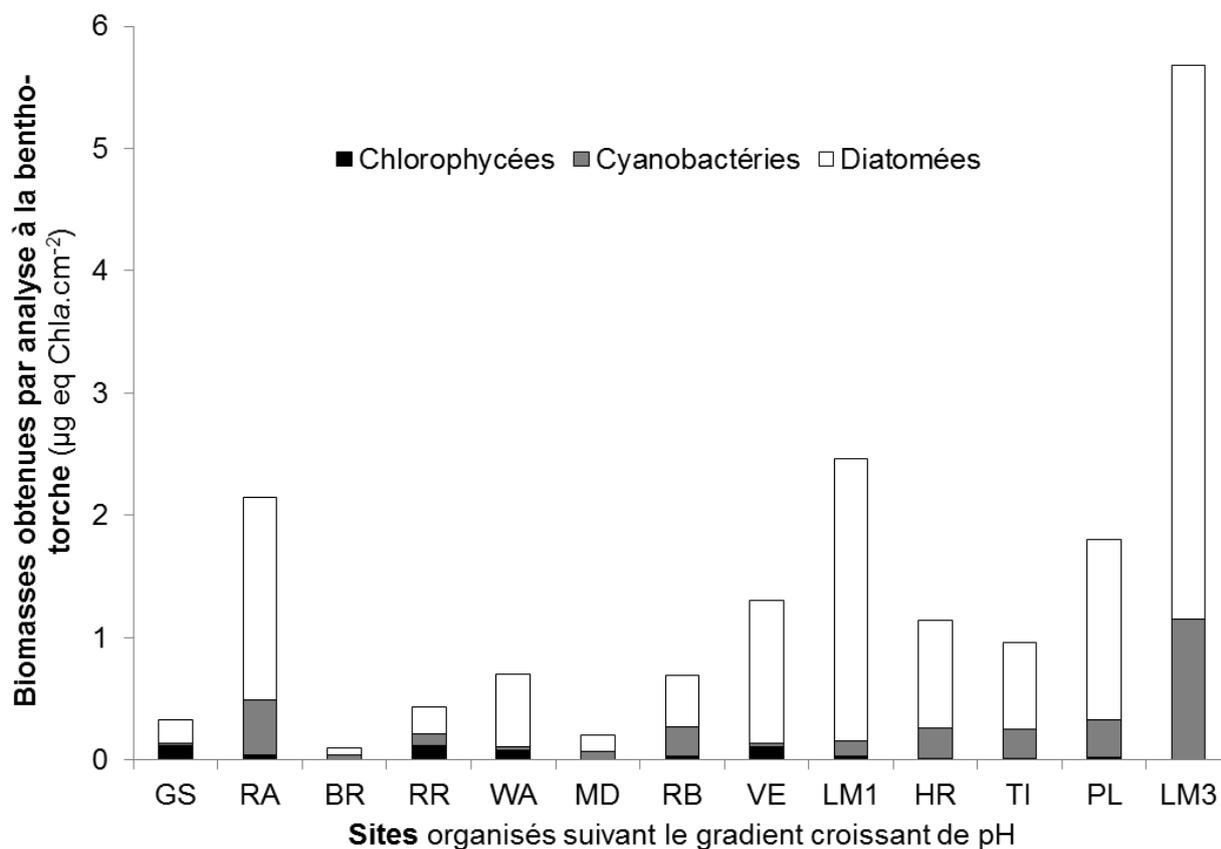
**Figure 26** : Corrélation de Spearman entre le pH et les concentrations en aluminium. Significativité :  $p < 0,05 = *$  ;  $p < 0,01 = **$  ;  $p < 0,001 = ***$ .

### III.2. Chlorophylle a et biomasse

Grâce aux mesures effectuées avec la sonde fluorométrique, nous avons pu obtenir une estimation des quantités de biomasse de chlorophycées, cyanobactéries et diatomées (en  $\mu\text{g Chla.cm}^{-2}$ ). On observe dans la plupart des sites une abondance Diatomées > Cyanobactéries > Chlorophycées (avec des moyennes de Chla respectivement de  $1,202 \pm 1,967$  ;  $0,255 \pm 0,477$  et  $0,04 \pm 0,09 \mu\text{g Chla.cm}^{-2}$ ). On observe également un maximum de biomasse en Chla de  $5,68 \pm 3,07 \mu\text{g Chla.cm}^{-2}$  sur le site LM3 qui présente un pH neutre (7,17 unités pH). Ces mesures nous permettent d'observer que les trois classes mesurées par la sonde fluorométrique sont toutes retrouvées dans tous les sites. Il apparaît également une tendance à retrouver une majorité de biofilms phototrophes dominés par les diatomées dans ces cours d'eau et que la biomasse de diatomées dans ces biofilms semble suivre positivement l'augmentation du pH (**Figure 27**). La biomasse de biofilm (**Tableau 12**), n'est corrélée ni avec le pH ni avec l'Al.

**Tableau 12 :** Moyenne  $\pm$  écart-type des données mesurées ainsi que des pesées de la biomasse (mg MS cm<sup>-2</sup>) obtenue sur les plaquettes après 2 mois *in situ* (n=104)

Sites	pH	Chlorophycées	Cyanobactéries	Diatomées	Somme totale	Biomasse totale
		(µg Chla .cm <sup>-2</sup> )			(µg Chla.cm <sup>-2</sup> )	(mg.cm <sup>-2</sup> )
GS	4,66	0,119 $\pm$ 0,149	0,019 $\pm$ 0,016	0,191 $\pm$ 0,203	0,33 $\pm$ 0,16	0,72 $\pm$ 0,24
RA	5,30	0,036 $\pm$ 0,128	0,458 $\pm$ 0,331	1,652 $\pm$ 0,858	2,15 $\pm$ 0,87	1,18 $\pm$ 0,75
BR	5,46	0,003 $\pm$ 0,005	0,032 $\pm$ 0,008	0,063 $\pm$ 0,056	0,10 $\pm$ 0,04	1,34 $\pm$ 0,49
RR	5,55	0,114 $\pm$ 0,132	0,097 $\pm$ 0,118	0,222 $\pm$ 0,228	0,43 $\pm$ 0,17	1,56 $\pm$ 0,45
WA	5,86	0,078 $\pm$ 0,089	0,031 $\pm$ 0,032	0,593 $\pm$ 0,704	0,70 $\pm$ 0,47	0,95 $\pm$ 0,77
MD	5,90	0,002 $\pm$ 0,005	0,071 $\pm$ 0,083	0,131 $\pm$ 0,127	0,20 $\pm$ 0,10	1,36 $\pm$ 0,05
RB	6,31	0,029 $\pm$ 0,081	0,236 $\pm$ 0,218	0,424 $\pm$ 0,236	0,69 $\pm$ 0,25	1,00 $\pm$ 0,46
VE	6,33	0,106 $\pm$ 0,144	0,034 $\pm$ 0,045	1,169 $\pm$ 1,076	1,31 $\pm$ 0,81	0,42 $\pm$ 0,34
LM1	6,42	0,026 $\pm$ 0,047	0,127 $\pm$ 0,134	2,308 $\pm$ 2,650	2,46 $\pm$ 1,84	1,22 $\pm$ 0,70
HR	6,49	0,009 $\pm$ 0,022	0,248 $\pm$ 0,264	0,888 $\pm$ 0,712	1,15 $\pm$ 0,57	1,65 $\pm$ 1,28
TI	6,65	0,008 $\pm$ 0,019	0,244 $\pm$ 0,308	0,708 $\pm$ 0,726	0,96 $\pm$ 0,53	0,52 $\pm$ 0,22
PL	6,97	0,017 $\pm$ 0,068	0,308 $\pm$ 0,346	1,474 $\pm$ 1,242	1,80 $\pm$ 0,97	0,62 $\pm$ 0,18
LM3	7,17	0,000 $\pm$ 0,000	1,147 $\pm$ 1,049	4,529 $\pm$ 4,069	5,68 $\pm$ 3,07	1,41 $\pm$ 0,38



**Figure 27 :** Somme des résultats mesurés à la sonde fluorométrique le long du gradient décroissant d'acidité.

### III.3. CNP

Pour évaluer la qualité élémentaire des biofilms phototrophes, les pourcentages en C, N et P (avec des moyennes respectives de  $27,28 \pm 6,66$  ;  $3,77 \pm 1,88$  et  $0,32 \pm 0,18$  %), ainsi que les ratios massiques C/N, C/P et N/P (avec des moyennes respectives de 8,78 ; 106,97 et 12,82) ont été déterminés (**Tableau 13**). Les ratios C/P semblent être les plus variables (variant de 49,46 à 177,98) pouvant s'expliquer par les variations des pourcentages en N et P des biofilms. Les modèles de régression linéaire entre les compositions élémentaires et les concentrations en Al et le pH (**Tableau 14**) ont pu montrer que le pH des cours d'eau semble fortement expliquer l'augmentation du P dans les biofilms (Régression linéaire :  $R^2=0,67$  ;  $p\text{-value}<0,001$ ), ainsi que la diminution des ratios C/P et N/P (respectivement, Régression linéaire :  $R^2=0,40$  ;  $p\text{-value}<0,01$  et  $R^2=0,60$  ;  $p\text{-value}<0,01$ ) (**Figure 28**). Ces résultats semblent indiquer que la qualité stœchiométrique potentielle des biofilms s'accroît dès lors que le pH augmente.

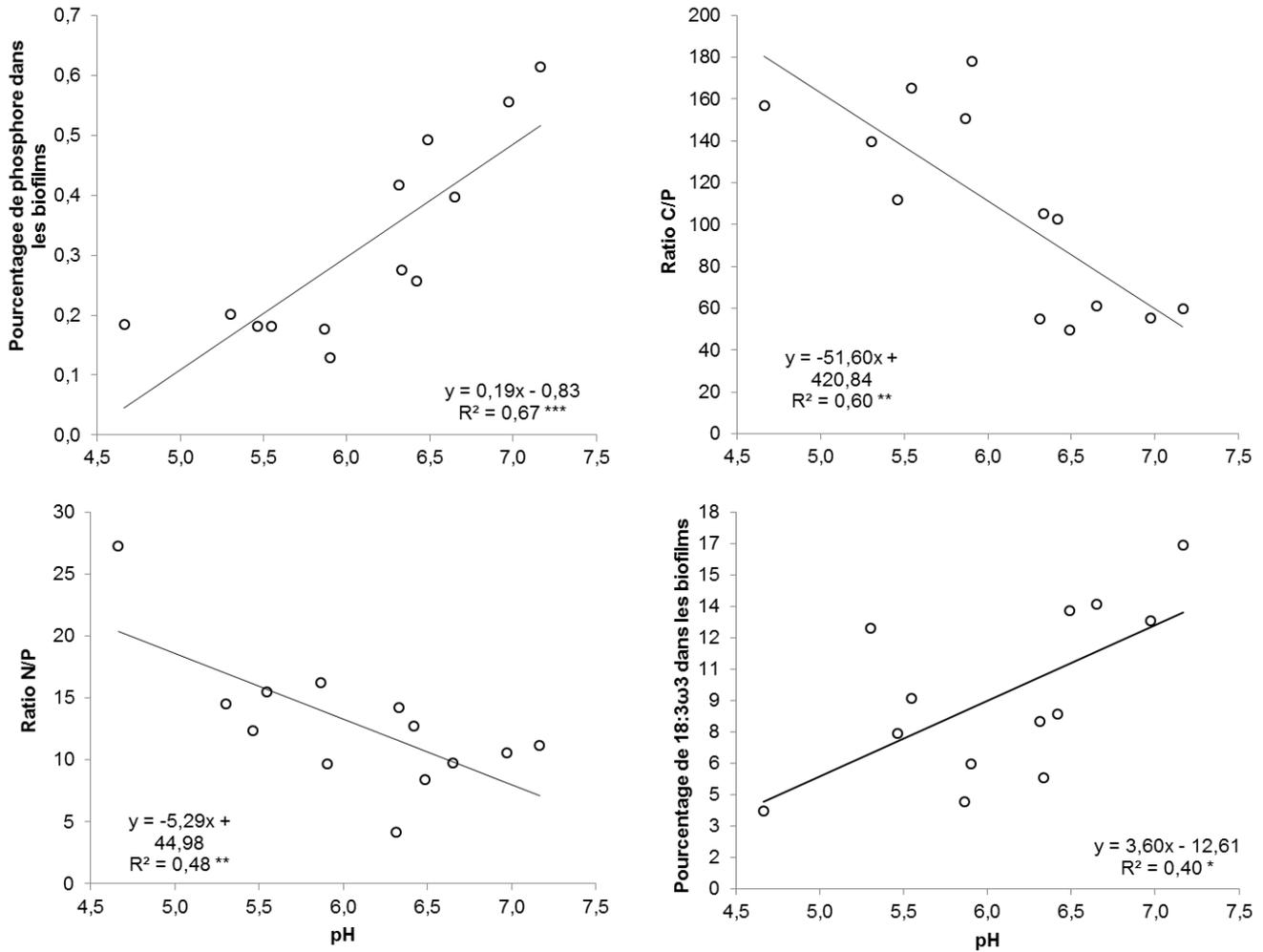
**Tableau 13** : Composition élémentaire (pourcentage de CNP) des biofilms phototrophes et ratios massiques.

Sites	pH	Carbone		Azote (% masse sèche)		Phosphore		C/N	C/P	N/P
		Moy.	± Et.	Moy.	± Et.	Moy.	± Et.			
		GS	4,66	28,91	± 2,89	5,02	± 0,94			
RA	5,30	28,21	± 8,64	2,94	± 0,95	0,20	± 0,05	9,59	139,49	14,54
BR	5,46	20,36	± 4,75	2,25	± 0,57	0,18	± 0,07	9,06	111,93	12,35
RR	5,55	29,95	± 1,00	2,81	± 0,39	0,18	± 0,01	10,68	165,23	15,48
WA	5,86	26,59	± 6,00	2,86	± 0,35	0,18	± 0,03	9,30	150,58	16,20
MD	5,90	23,00	± 3,60	1,25	± 0,25	0,13	± 0,00	18,43	177,98	9,66
RB	6,31	22,89	± 6,98	1,74	± 0,57	0,42	± 0,01	13,15	54,86	4,17
VE	6,33	28,90	± 1,64	3,92	± 0,68	0,28	± 0,11	7,37	105,01	14,24
LM1	6,42	26,33	± 1,37	3,27	± 0,23	0,26	± 0,07	8,04	102,69	12,77
HR	6,49	24,45	± 11,56	4,14	± 2,00	0,49	± 0,16	5,91	49,56	8,38
TI	6,65	24,23	± 2,08	3,87	± 0,54	0,40	± 0,01	6,26	61,11	9,76
PL	6,97	30,73	± 8,43	5,89	± 2,20	0,56	± 0,17	5,21	55,30	10,61
LM3	7,17	36,81	± 1,99	6,87	± 0,60	0,61	± 0,04	5,36	59,91	11,18
<b>Moy.</b>	6,08	27,28	± 6,66	3,77	± 1,88	0,32	± 0,18	8,78	106,97	12,82

Concernant la concentration en Al, celle-ci semble expliquer correctement la diminution des teneurs en N et P des biofilms (respectivement, Régression linéaire :  $R^2=0,36$  ;  $p\text{-value}<0,05$  et  $R^2=0,58$  ;  $p\text{-value}<0,01$ ), ainsi que l'augmentation du ratio C/P (Régression linéaire :  $R^2=0,39$  ;  $p\text{-value}<0,05$ ) (**Figure 29**). Ces résultats semblent ainsi indiquer une diminution de la qualité élémentaire potentielle des biofilms le long du gradient d'Al.

**Tableau 14 :** Coefficients des régressions linéaires significatives préliminaires entre la composition élémentaire et lipidique des biofilms phototrophes et les valeurs de pH et concentrations en Aluminium. Significativité :  $p < 0,05 = *$  ;  $p < 0,01 = **$  ;  $p < 0,001 = ***$ .

Régression linéaire $Y = \alpha X + \beta$	pH	Aluminium
	p-value	p-value
<u>Composition élémentaire :</u>		
% C	n.s.	n.s.
% N	n.s.	*
% P	***	**
Ratio C/N	n.s.	n.s.
Ratio C/P	**	*
Ratio N/P	**	n.s.
<u>Composition lipidique :</u>		
20:5 $\omega$ 3	n.s.	n.s.
18:3 $\omega$ 3	*	***
PUFA	n.s.	**
MUFA	n.s.	n.s.
SAFA	n.s.	*



**Figure 28 :** Régressions linéaires significatives entre la composition élémentaire et lipidique des biofilms phototrophes et le pH. Significativité :  $p < 0,05 = *$  ;  $p < 0,01 = **$  ;  $p < 0,001 = ***$ .

### III.4. Dosage Acides gras

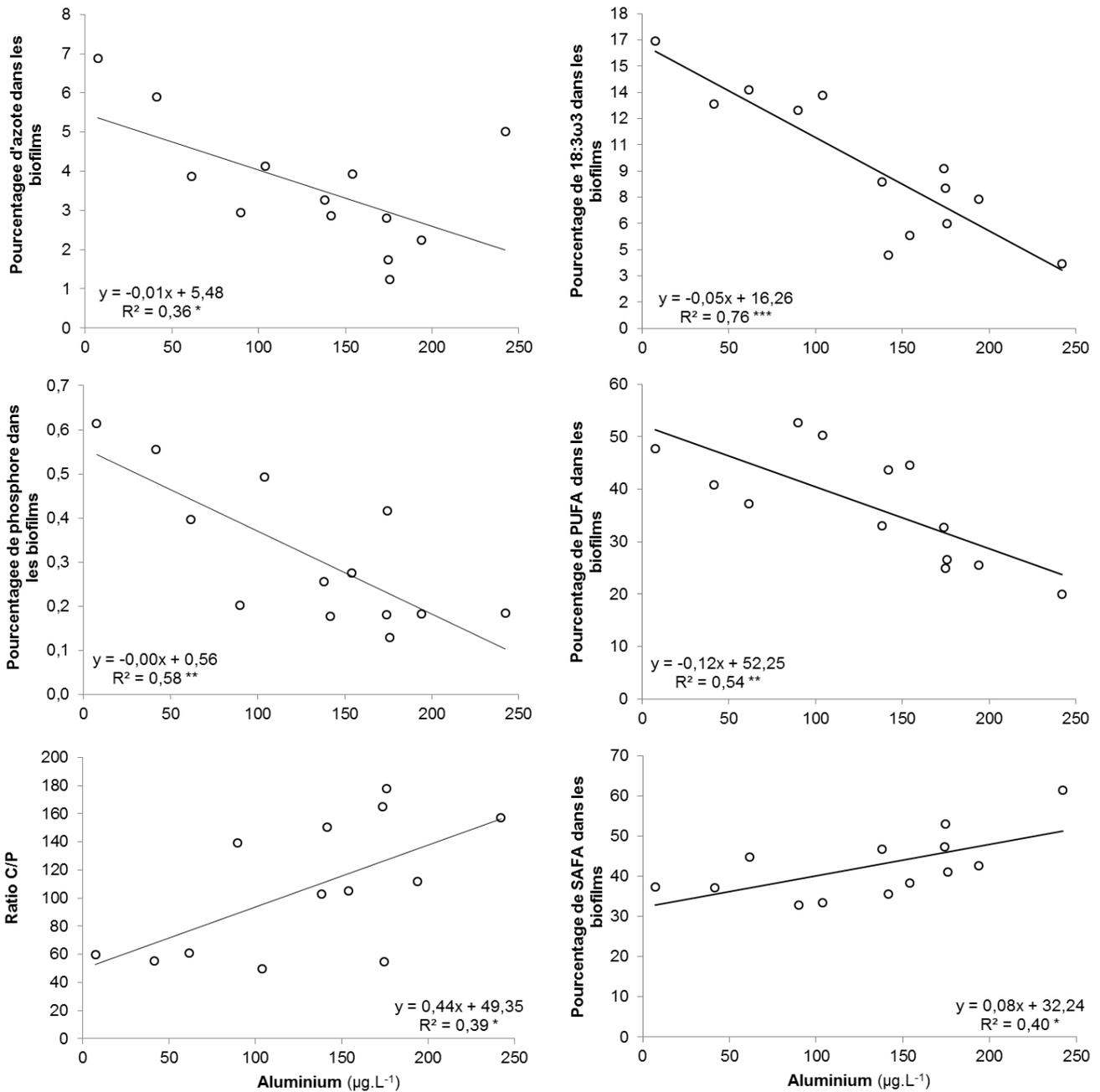
Les analyses des profils d'acides gras des biofilms phototrophes, exprimés en pourcentage de poids sec par site, ont permis de mettre en évidence la présence de nombreux acides gras (dont toutes les classes SAFAs, MUFAs, PUFAs et AG ramifiés) le long des gradients de pH et d'Al, dont des AGPI (**Tableau 14**). La majeure partie des AG dosés a pu être identifiée (pourcentages de non-identifiés toujours inférieurs à 1,5 % parmi tous les sites).

Nous observons tout d'abord un effet clair de l'augmentation du pH sur l'augmentation des pourcentages de 18 : 3ω3 (Régression linéaire :  $R^2 = 0,40$  ;  $p\text{-value} < 0,05$ ) (**Tableau 15** et **Figure 28**), ces relations étant non significatives pour les SAFAs, MUFAs, PUFAs et le 20 : 5ω3. Ces résultats pourraient suggérer une augmentation partielle de la qualité biochimique de la ressource biofilm le long du gradient de pH.

**Tableau 15 :** Composition lipidique des différents biofilms phototrophes (% de masse sèche). (SAFA, MUFA et PUFA correspondent aux sommes respectives des pourcentages d'acides gras saturés, mono-saturés et polyinsaturés.

Pourcentage moyen dans la biomasse	GS*	RA	BR	RR	WA*	MD	RB	VE	LM1	HR	TI	PL	LM3
	4,66	5,30	5,46	5,55	5,86	5,90	6,31	6,33	6,42	6,49	6,65	6,97	7,17
12:0	1,27	0,13 ± 0,03	0,87 ± 0,50	0,27 ± 0,08	0,48	0,71 ± 0,54	11,20 ± 0,72	0,41 ± 0,19	0,39 ± 0,13	0,60 ± 0,50	0,67 ± 0,43	0,72 ± 0,25	0,34 ± 0,09
14:0	3,38	14,88 ± 2,19	5,86 ± 3,70	9,25 ± 3,26	10,25	8,86 ± 0,73	11,20 ± 0,72	11,37 ± 4,21	14,99 ± 3,12	7,86 ± 1,85	5,07 ± 1,63	4,77 ± 1,58	10,56 ± 1,64
15:0	0,70	0,15 ± 0,06	0,64 ± 0,11	0,37 ± 0,02	0,38	0,58 ± 0,17	1,69 ± 1,75	0,45 ± 0,16	0,34 ± 0,06	0,41 ± 0,02	0,52 ± 0,12	0,59 ± 0,07	0,35 ± 0,10
16:0	22,60	9,31 ± 2,00	16,53 ± 2,59	19,39 ± 0,59	14,22	10,77 ± 1,14	13,62 ± 4,40	13,06 ± 3,93	11,59 ± 0,73	15,13 ± 1,81	16,88 ± 1,79	15,58 ± 0,45	14,47 ± 1,36
17:0	-	0,09 ± 0,01	0,44 ± 0,20	0,19 ± 0,01	0,13	0,25 ± 0,06	5,69 ± 7,73	0,26 ± 0,15	0,16 ± 0,01	0,20 ± 0,10	0,14 ± 0,12	0,53 ± 0,26	0,27 ± 0,08
18:0	17,55	3,69 ± 0,75	7,03 ± 3,73	8,11 ± 2,36	2,47	4,39 ± 0,40	6,91 ± 4,70	4,67 ± 2,14	3,63 ± 0,30	3,00 ± 0,39	6,51 ± 4,40	4,16 ± 0,62	2,56 ± 0,73
20:0	0,89	0,19 ± 0,02	0,86 ± 0,21	0,95 ± 0,15	0,65	0,60 ± 0,09	0,52 ± 0,10	0,71 ± 0,35	0,65 ± 0,14	0,70 ± 0,12	0,68 ± 0,21	0,63 ± 0,14	0,70 ± 0,09
22:0	-	0,24 ± 0,03	1,08 ± 0,22	1,14 ± 0,20	0,51	1,07 ± 0,17	2,30 ± 1,73	0,57 ± 0,23	0,95 ± 0,15	0,64 ± 0,11	0,93 ± 0,20	0,79 ± 0,09	0,72 ± 0,24
24:0	-	0,31 ± 0,05	1,03 ± 0,43	1,29 ± 0,29	0,82	0,63 ± 0,11	0,77 ± 0,05	0,50 ± 0,03	0,69 ± 0,11	0,69 ± 0,16	1,45 ± 1,20	0,62 ± 0,08	0,57 ± 0,06
26:0	-	-	-	0,51 ± 0,32	0,69	-	0,14 ± 0,20	0,25 ± 0,25	-	0,06 ± 0,10	1,14 ± 1,66	-	-
28:0	-	0,06 ± 0,11	-	0,36 ± 0,51	0,00	-	0,13 ± 0,19	-	-	0,09 ± 0,15	1,07 ± 1,84	-	-
<b>SAFA</b>	<b>46,39</b>	<b>29,06 ± 1,10</b>	<b>34,34 ± 3,28</b>	<b>41,83 ± 1,89</b>	<b>30,59</b>	<b>27,85 ± 1,03</b>	<b>43,46 ± 19,41</b>	<b>32,25 ± 2,73</b>	<b>33,29 ± 3,08</b>	<b>29,38 ± 0,81</b>	<b>35,06 ± 1,54</b>	<b>28,38 ± 1,63</b>	<b>30,53 ± 1,21</b>
16:1ω9	1,38	0,44 ± 0,15	1,98 ± 0,92	1,75 ± 0,07	0,94	1,49 ± 0,41	0,88 ± 1,25	1,06 ± 0,38	1,40 ± 0,09	0,76 ± 0,07	1,39 ± 0,20	1,26 ± 0,14	1,04 ± 0,30
16:1ω7	6,78	6,46 ± 5,21	9,46 ± 5,17	8,57 ± 0,81	15,50	3,08 ± 0,51	3,25 ± 1,04	7,72 ± 1,92	4,65 ± 1,06	8,93 ± 0,89	7,89 ± 2,00	6,55 ± 1,29	5,43 ± 1,23
16:1ω5	-	0,08 ± 0,03	0,37 ± 0,15	0,26 ± 0,01	0,16	0,15 ± 0,02	0,70 ± 0,74	0,11 ± 0,11	0,13 ± 0,02	0,24 ± 0,08	0,14 ± 0,13	0,52 ± 0,16	0,23 ± 0,07
18:1ω9	11,33	8,82 ± 1,35	10,16 ± 1,80	7,85 ± 2,37	4,37	15,75 ± 2,07	7,64 ± 3,10	6,82 ± 1,10	5,62 ± 1,03	2,59 ± 1,03	3,38 ± 1,46	6,43 ± 3,12	3,40 ± 0,44
18:1ω7	1,78	4,81 ± 0,73	6,60 ± 3,56	3,35 ± 1,04	2,48	3,65 ± 0,16	2,19 ± 0,52	3,65 ± 0,18	5,87 ± 0,86	2,67 ± 0,57	3,71 ± 0,51	4,18 ± 0,27	3,82 ± 0,20
20:1	-	0,07 ± 0,02	0,30 ± 0,12	0,17 ± 0,04	0,09	0,45 ± 0,06	0,16 ± 0,23	0,03 ± 0,06	0,28 ± 0,03	0,12 ± 0,04	0,55 ± 0,50	0,40 ± 0,20	0,16 ± 0,01
22:1ω9	17,29	2,66 ± 2,18	13,94 ± 7,78	5,38 ± 1,68	6,84	27,05 ± 3,94	16,86 ± 6,03	8,38 ± 5,89	21,41 ± 0,99	8,15 ± 4,93	14,35 ± 8,90	17,18 ± 7,19	13,11 ± 5,74
24:1	-	-	0,27 ± 0,27	-	0,22	0,62 ± 0,09	0,25 ± 0,35	-	0,68 ± 0,30	0,30 ± 0,05	0,66 ± 1,15	0,48 ± 0,18	0,28 ± 0,24
<b>MUFA</b>	<b>38,56</b>	<b>23,35 ± 3,13</b>	<b>43,10 ± 1,56</b>	<b>27,34 ± 2,56</b>	<b>30,60</b>	<b>52,23 ± 1,46</b>	<b>31,93 ± 11,79</b>	<b>27,77 ± 6,69</b>	<b>40,06 ± 2,57</b>	<b>23,86 ± 5,37</b>	<b>32,08 ± 7,77</b>	<b>36,98 ± 4,61</b>	<b>27,47 ± 5,69</b>
18:2ω6	6,25	7,78 ± 0,83	4,17 ± 0,14	5,31 ± 0,49	3,40	3,86 ± 0,84	2,19 ± 2,39	5,94 ± 1,94	5,85 ± 1,48	2,98 ± 0,91	4,98 ± 1,63	4,84 ± 2,14	4,00 ± 0,53
16:2ω6	0,96	1,10 ± 0,81	0,33 ± 0,12	0,64 ± 0,03	3,39	0,10 ± 0,03	0,23 ± 0,34	0,73 ± 0,14	0,31 ± 0,14	0,24 ± 0,06	0,51 ± 0,47	0,11 ± 0,10	0,09 ± 0,08
16:2ω4	1,45	0,15 ± 0,06	0,43 ± 0,34	1,18 ± 0,32	3,40	0,21 ± 0,03	0,10 ± 0,14	2,46 ± 0,76	0,36 ± 0,10	2,60 ± 1,06	1,76 ± 0,44	1,06 ± 0,45	1,13 ± 0,60
20:2ω6	0,78	0,07 ± 0,02	0,51 ± 0,37	0,34 ± 0,10	0,13	0,20 ± 0,02	2,89 ± 3,79	0,20 ± 0,23	0,22 ± 0,04	0,11 ± 0,02	-	0,21 ± 0,07	0,09 ± 0,03
22:2	-	0,07 ± 0,12	0,37 ± 0,22	0,18 ± 0,09	0,18	0,56 ± 0,17	0,26 ± 0,37	0,20 ± 0,23	0,71 ± 0,03	0,24 ± 0,16	0,16 ± 0,15	0,46 ± 0,20	0,39 ± 0,18
16:3ω4	-	0,16 ± 0,12	0,23 ± 0,13	0,94 ± 0,03	5,41	-	0,23 ± 0,11	3,66 ± 1,21	0,13 ± 0,05	3,65 ± 1,17	1,38 ± 0,67	1,31 ± 0,70	1,28 ± 0,36
16:3ω3	-	1,25 ± 0,22	0,95 ± 1,21	2,28 ± 0,69	0,89	0,85 ± 0,08	1,21 ± 1,71	0,48 ± 0,12	1,37 ± 0,68	2,54 ± 0,29	3,84 ± 1,60	2,01 ± 0,47	3,09 ± 0,48
18:3ω6	-	0,67 ± 0,13	0,19 ± 0,06	0,43 ± 0,08	0,60	0,20 ± 0,02	0,14 ± 0,20	0,33 ± 0,31	0,32 ± 0,06	0,22 ± 0,01	-	0,00 ± 0,00	0,26 ± 0,11
18:3ω3	2,80	11,03 ± 1,52	5,65 ± 3,98	8,05 ± 1,60	3,59	4,06 ± 0,16	5,94 ± 7,42	4,52 ± 0,73	5,99 ± 2,58	11,63 ± 1,78	10,82 ± 2,62	9,78 ± 0,50	13,42 ± 0,45
20:3ω6	-	0,14 ± 0,02	-	0,08 ± 0,00	0,09	-	-	0,04 ± 0,08	-	0,19 ± 0,05	0,24 ± 0,21	0,13 ± 0,16	0,24 ± 0,08
20:3ω3	-	0,13 ± 0,03	0,14 ± 0,12	0,23 ± 0,03	0,00	-	0,09 ± 0,13	-	-	0,25 ± 0,03	0,00	0,09 ± 0,08	0,23 ± 0,01
16:4ω3	-	0,80 ± 0,41	0,60 ± 0,20	0,50 ± 0,13	0,24	0,49 ± 0,09	0,43 ± 0,61	0,04 ± 0,07	0,34 ± 0,16	0,65 ± 0,22	0,29 ± 0,25	0,39 ± 0,16	0,22 ± 0,02
16:4ω1	-	-	-	0,26 ± 0,25	0,12	-	0,87 ± 1,22	0,15 ± 0,13	-	3,17 ± 2,05	0,27 ± 0,23	0,57 ± 0,27	0,51 ± 0,49
18:4ω3	1,13	14,00 ± 1,43	1,88 ± 1,35	2,62 ± 0,64	4,43	3,49 ± 0,65	1,64 ± 2,31	7,84 ± 5,14	3,33 ± 0,95	3,08 ± 0,72	0,79 ± 0,04	1,65 ± 1,15	4,88 ± 1,59
20:4ω6	-	0,36 ± 0,08	0,54 ± 0,23	0,68 ± 0,06	1,22	0,19 ± 0,02	1,10 ± 1,14	0,95 ± 0,23	0,32 ± 0,04	1,29 ± 0,36	0,83 ± 0,71	1,17 ± 0,21	0,78 ± 0,34
20:4ω3	-	0,32 ± 0,02	-	0,14 ± 0,04	0,39	-	0,04 ± 0,06	0,08 ± 0,14	-	0,35 ± 0,33	-	-	0,20 ± 0,09
22:4ω6	-	0,15 ± 0,01	-	-	0,00	-	-	0,07 ± 0,12	-	0,00	-	-	1,04 ± 0,30
18:5ω3	-	3,76 ± 1,10	0,47 ± 0,41	0,59 ± 0,20	1,56	1,69 ± 0,45	0,36 ± 0,52	4,47 ± 2,61	1,19 ± 0,19	0,62 ± 0,63	-	0,44 ± 0,76	1,93 ± 0,67
20:5ω3	1,69	2,14 ± 0,88	1,01 ± 0,32	2,66 ± 1,22	5,51	0,63 ± 0,06	0,41 ± 0,58	3,75 ± 0,71	1,16 ± 0,21	9,05 ± 3,25	2,95 ± 0,55	6,15 ± 1,46	3,74 ± 1,48
22:5ω6	-	1,14 ± 0,20	0,66 ± 0,28	0,23 ± 0,07	0,65	0,41 ± 0,14	0,17 ± 0,24	0,86 ± 0,90	1,18 ± 0,29	0,20 ± 0,17	-	-	0,98 ± 0,26
22:5ω3	-	0,21 ± 0,02	0,83 ± 0,27	0,97 ± 0,55	1,46	-	0,35 ± 0,49	0,29 ± 0,26	0,39 ± 0,16	0,32 ± 0,46	-	-	0,25 ± 0,07
22:6ω3	-	0,90 ± 0,14	0,20 ± 0,18	0,32 ± 0,14	0,59	0,52 ± 0,10	0,21 ± 0,30	0,50 ± 0,56	-	0,53 ± 0,05	-	-	0,20 ± 0,04
<b>PUFA</b>	<b>15,05</b>	<b>46,45 ± 3,05</b>	<b>20,07 ± 4,38</b>	<b>28,87 ± 4,42</b>	<b>37,50</b>	<b>18,02 ± 1,71</b>	<b>19,12 ± 11,81</b>	<b>37,95 ± 9,86</b>	<b>23,61 ± 5,38</b>	<b>44,34 ± 4,86</b>	<b>29,64 ± 9,08</b>	<b>31,28 ± 3,19</b>	<b>39,27 ± 6,37</b>
<b>∑ ω3</b>	<b>5,62</b>	<b>34,56 ± 3,01</b>	<b>11,72 ± 5,48</b>	<b>18,35 ± 4,07</b>	<b>19,67</b>	<b>11,74 ± 1,16</b>	<b>10,70 ± 14,14</b>	<b>21,97 ± 8,63</b>	<b>13,77 ± 4,45</b>	<b>29,03 ± 2,55</b>	<b>18,70 ± 4,96</b>	<b>20,51 ± 2,78</b>	<b>29,01 ± 3,39</b>
<b>∑ ω6</b>	<b>7,98</b>	<b>11,40 ± 0,08</b>	<b>6,40 ± 0,75</b>	<b>7,70 ± 0,35</b>	<b>9,46</b>	<b>4,96 ± 0,74</b>	<b>6,72 ± 1,79</b>	<b>9,04 ± 3,22</b>	<b>8,20 ± 1,71</b>	<b>5,23 ± 0,64</b>	<b>6,55 ± 2,93</b>	<b>6,46 ± 2,32</b>	<b>6,44 ± 1,26</b>
iso 15:0	-	0,46 ± 0,08	0,92 ± 0,16	0,78 ± 0,03	0,62	0,49 ± 0,08	0,64 ± 0,08	0,94 ± 0,15	1,08 ± 0,07	1,21 ± 0,06	1,59 ± 0,20	1,24 ± 0,17	1,28 ± 0,02
anteiso 15:0	-	0,06 ± 0,02	0,40 ± 0,16	0,22 ± 0,00	0,17	0,17 ± 0,04	3,14 ± 4,22	0,20 ± 0,08	0,22 ± 0,05	0,21 ± 0,07	0,73 ± 0,14	0,38 ± 0,08	0,22 ± 0,06
iso 16:0	-	0,09 ± 0,03	-	0,22 ± 0,02	0,00	-	0,43 ± 0,38	0,04 ± 0,07	0,25 ± 0,17	0,15 ± 0,01	-	0,24 ± 0,04	0,16 ± 0,09
iso 17:0	-	0,24 ± 0,05	0,42 ± 0,17	0,27 ± 0,01	0,22	0,11 ± 0,04	0,39 ± 0,06	0,46 ± 0,06	0,60 ± 0,16	0,71 ± 0,14	0,36 ± 0,31	0,69 ± 0,11	0,71 ± 0,12
anteiso 17:0	-	0,27 ± 0,01	-	0,46 ± 0,06	0,00	0,10 ± 0,03	0,15 ± 0,21	0,06 ± 0,11	-	0,22 ± 0,06	-	0,34 ± 0,05	0,37 ± 0,06
<b>∑ Branched FA</b>	<b>-</b>	<b>1,13 ± 0,18</b>	<b>1,74 ± 0,18</b>	<b>1,96 ± 0,03</b>	<b>1,01</b>	<b>0,87 ± 0,11</b>	<b>4,74 ± 3,86</b>	<b>1,70 ± 0,12</b>	<b>2,15 ± 0,19</b>	<b>2,51 ± 0,07</b>	<b>2,69 ± 0,53</b>	<b>2,89 ± 0,36</b>	<b>2,74 ± 0,16</b>
<b>∑ NI</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>0,75 ± 0,46</b>	<b>-</b>	<b>0,31</b>	<b>1,02 ± 0,45</b>	<b>0,75 ± 0,33</b>	<b>0,34 ± 0,58</b>	<b>0,89 ± 0,39</b>	<b>0,12 ± 0,20</b>	<b>0,54 ± 0,48</b>	<b>0,47 ± 0,28</b>	<b>-</b>

Malgré sa forte corrélation avec le pH, l'Al explique plus de variations des compositions en acides gras des biofilms. En particulier, l'augmentation des concentrations en Al est fortement reliée à la diminution des pourcentages de 18 : 3 $\omega$ 3 et des PUFA (AGPI) dans les biofilms (respectivement, Régression linéaire :  $R^2=0,76$  ;  $p$ -value<0,001 et  $R^2=0,54$  ;  $p$ -value<0,01), ainsi qu'à l'augmentation des SAFAs (Régression linéaire :  $R^2=0,40$  ;  $p$ -value<0,05) (**Figure 29**). Ces résultats vont plutôt dans le sens d'une réduction de la qualité biochimique potentielle de la ressource le long du gradient d'Al.



**Figure 29 :** Régressions linéaires significatives entre la composition élémentaire, lipidique des biofilms phototrophes et l'aluminium ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). Significativité :  $p < 0,05 = *$  ;  $p < 0,01 = **$  ;  $p < 0,001 = ***$ .

## IV. Discussion

Ces résultats et leur analyse préliminaire nous ont permis de quantifier une production primaire de biofilm moyenne de  $64,44 \text{ g MS.m}^{-2}.\text{an}^{-1}$ , correspondant à  $17,58 \text{ g de C.m}^{-2}.\text{an}^{-1}$  dans les cours d'eau étudiés. [Wallace et al. \(1999\)](#) avaient estimé un apport de litières de feuilles mortes (par des chutes directes ou issues de transports latéraux) représentant entre 631 et 859 g MSSC  $\text{m}^{-2}.\text{an}^{-1}$  dans des cours d'eau de tête de bassin versant aux états unis. En estimant que la litière est de manière générale composée de 50% de C, cela correspondrait à un apport de C par la matière allochtone d'approximativement de 215,5 à 429,5 g de C. $\text{m}^{-2}.\text{an}^{-1}$ . En considérant des apports de matière détritique allochtone identiques à ceux mesurés dans l'étude de [Wallace et al. \(1999\)](#), et en excluant les apports de carbone organique dissous provenant des sols environnants, la production primaire moyenne des cours d'eau forestiers vosgiens représenterait moins de 5% des apports de C. Il est toutefois important de garder à l'esprit que notre extrapolation est basée sur une quantité de biofilm produit sur une courte période de 2 mois, au printemps, où les concentrations en chlorophylle a de biofilms dominés par les diatomées sont les plus élevées ([Olapade & Leff, 2005](#)). Ceci pourrait ainsi signifier une surestimation de la production annuelle de biofilm épilithiques dans cours d'eau. Il apparaît néanmoins que, dans tous les cas, le carbone organique allochtone est largement minoritaire, conformément aux conclusions des travaux pionniers de [Fisher & Likens \(1973\)](#) et de [Vannote et al. \(1980\)](#). Bien que minoritaires, ces apports pourraient néanmoins s'avérer extrêmement importants pour le fonctionnement de ces écosystèmes. D'une part, ces apports pourraient se faire à des périodes où les apports de matière détritique particulaire sont rares (printemps, été), et soutenir les réseaux trophiques en place à cette période. Par ailleurs, les exsudats algaux ont été montrés comme des stimulateurs de la décomposition microbienne des litières, accélérant ainsi le transfert de la matière organique détritique vers les niveaux trophiques supérieurs ([Danger et al., 2013 b](#)). Finalement, même si ces ressources contribuent peu au flux de carbone en terme quantitatif, la consommation de ces ressources peut s'avérer avoir des effets particulièrement importants pour soutenir la production secondaire dans ces milieux détritiques, notamment en apportant aux consommateurs des composés essentiels, tels des acides gras polyinsaturés à longue chaîne carbonée ([Crenier et al., 2017](#)).

Nos résultats montrent également, conformément à nos hypothèses de départ, des effets négatifs de l'acidification (baisse de pH et augmentation des concentrations en Al) sur les paramètres de qualité élémentaire et biochimique des biofilms. En particulier, les concentrations en Al semblent augmenter les pourcentages en N et P, tout en réduisant les ratios N/P et C/P des biofilms. Le pH croissant n'explique que la diminution du ratio N/P et l'augmentation du P dans les biofilms. Comme l'avait observé [Clivot et al. \(2013\)](#), l'Al présent dans les cours d'eau interagit sur le cycle du P dans l'eau notamment en se complexant avec les orthophosphates, les

rendant ainsi moins disponibles. On observe donc logiquement une plus grande disponibilité du  $\text{PO}_4^{3-}$  dans les cours d'eau présentant un pH élevé et des concentrations en Al moindres. Les fortes concentrations en Al ont un effet négatif sur l'activité de récupération du phosphore organique (phosphatase acide, [Clivot \*et al.\*, 2013, 2014 a](#)), mais comme nous l'avons observé précédemment (*Confer*, Chapitre 1, Partie 2), dès que les disponibilités en  $\text{PO}_4^{3-}$  sont suffisantes dans la colonne d'eau, il est probable que l'intégration du  $\text{PO}_4^{3-}$  par immobilisation soit suffisante pour satisfaire les besoins des communautés microbiennes (autant fongiques que bactériennes ou algales).

Dans le même temps, nous observons une augmentation des pourcentages en AGPI (18 : 3 $\omega$ 3 et PUFAs plus globalement) ainsi qu'une diminution des SAFAs dans les biofilms en réponse à un pH croissant et à une diminution des concentrations en Al. Des travaux précédents avaient noté la diminution de l'abondance de certaines espèces de diatomées avec l'acidification ([Pierre, 1996](#)) au profit d'une augmentation des densités de chlorophycées filamenteuses ([Turner \*et al.\*, 1987](#)). Ces chlorophycées étant de moindre qualité biochimique par rapport aux diatomées, nous avons émis l'hypothèse d'une augmentation de la qualité biochimique des biofilms avec l'augmentation des pH des eaux. Bien que les communautés algales n'aient pas encore été totalement analysées, les analyses de Chla semblent confirmer que les diatomées soient majoritaires au sein des biofilms étudiés, la densité de diatomées semblant augmenter avec le pH. Tous ces facteurs semblent nous indiquer que des pH faibles et de fortes concentrations en Al aboutissent à une diminution de la qualité biochimique de la ressource. Dans le contexte de la récupération progressive des systèmes vosgiens à l'acidification et de l'augmentation des pH, l'amélioration attendue des qualités stœchiométriques et biochimique des biofilms, malgré l'absence d'augmentation des biomasses de ces biofilms, devrait se traduire par des effets positifs sur la production secondaire (comme observé lors d'études en laboratoire utilisant les diatomées comme ressource de bonne qualité : [Bec \*et al.\*, 2003](#) ; [Masclaux \*et al.\*, 2009](#) ; [Crenier \*et al.\* 2017](#)) tel qu'une augmentation des taux de consommation, de croissance, des réserves en AGPI, etc.

De manière générale, étant donné la forte corrélation entre pH et Al, nous nous attendions à observer des effets similaires entre baisse de pH et augmentation de l'Al sur les paramètres biochimiques et élémentaires de qualité des biofilms. Néanmoins, il apparaît que l'Al semble être plus à même d'expliquer les variations de qualité que le pH. Il est probable que la toxicité induite par les concentrations en aluminium (mise en évidence par exemple chez les hyphomycètes aquatiques par [Baudoin \*et al.\*, 2008](#)) induise un stress plus marqué sur les organismes que le pH en lui-même. Bien que nous n'ayons pas trouvé de données à ce sujet, il est fortement envisageable que le stress causé par l'Al puisse jouer sur le contenu algal en acides gras, comme cela a été montré pour du cuivre sur d'autres espèces algales ([Smith \*et al.\*, 1985](#)), entraînant

ainsi des changements de qualité biochimique des biofilms sans pour autant causer des remplacements significatifs dans les taxons algaux en présence.



## Partie 2) Impact des ressources mineures dans la production secondaire d'écosystèmes basés sur les détrit.

Comme abordé dans le premier chapitre de cette thèse, même si la présence de producteurs primaires dans les cours d'eau de têtes de bassins versants n'a jamais été remise en question, leur rôle sur le métabolisme et le fonctionnement général de ces écosystèmes a longtemps été considéré comme négligeable. Dans le présent chapitre, nous souhaitons tester l'hypothèse qu'une consommation, même en faible quantité, de diatomées benthiques (représentant une ressource de haute qualité par rapport à la ressource détritique) jouait un rôle fondamental sur les traits d'histoire de vie de macroinvertébrés déchiquteurs, notamment grâce à un apport non négligeable d'acides gras polyinsaturés, acides gras souvent essentiels pour les métazoaires. Pour tester cette hypothèse, nous avons mis en place une expérimentation sur des crustacés amphipodes, *Gammarus fossarum*, basée sur la manipulation de diverses ressources alimentaires au laboratoire. Cette étude en microcosme s'est déroulée en plusieurs étapes, en utilisant trois types de ressources, utilisées seules ou en mélange :

- L : des litières d'aulne (*Alnus glutinosa*) collectées à l'abscission dans la zone riparienne d'un ruisseau forestier
- H : un mélange de mycélium d'hyphomycètes aquatiques (*Alatospora acuminata*, *Neonectria lugdunensis* et *Tricladium chaetocladium*), cultivés en erlenmeyer, en culture liquide, au laboratoire (Arce-Funck et al., 2015),
- D : une souche axénique de diatomée benthique commune (*Nitzschia palea*, CPCC 160), cultivée au laboratoire en milieu COMBO (Kilham et al., 1998).

Dans un second temps, ces différentes ressources ont été mélangées à de l'agarose (A) à basse température de gélification (Sigma A9414), matériau utilisé comme matrice neutre pour obtenir, sous forme de pastilles, différentes qualités de ressources en fonction des mélanges incorporés. Nous avons ainsi obtenu six types de ressources : A (agarose seul), AL (agarose + litière d'aulne), AH (agarose + mycélium d'hyphomycètes aquatiques), AD (agarose + diatomées), ALH (agarose + litière d'aulne + mycélium d'hyphomycètes aquatiques) et ALHD (agarose + litière d'aulne + mycélium d'hyphomycètes aquatiques + diatomées). Au final, l'expérimentation à proprement parler a consisté à proposer ces ressources à des juvéniles de *G. fossarum* prélevés dans un ruisseau forestier, ces gammares étant de taille calibrée (3-4mm de long). Après 7 jours d'acclimatation au laboratoire (obscurité, 12°C avec aération du milieu), les gammares ont été nourris durant 5 semaines en conditions contrôlées (organismes individualisés dans 60 ml d'eau du site, maintenus à l'obscurité et à 12°C) avec 36 répliques pour

chaque condition. A la fin de ces 35 jours d'expérimentation, nous avons mesuré les taux de consommation des pastilles de ressources, le taux de survie des individus, leur croissance en masse ainsi que la composition lipidique des ressources (autant initiales qu'en mélange) et des individus survivants.

Nous avons pu observer des taux de consommation nuls vis-à-vis de l'agarose seul (contrôle) et les plus élevés pour les pastilles de AL et ALHD. Ces deux dernières ressources ainsi que la ressource AD ont permis les taux de survie les plus élevés alors que la partie de l'expérimentation concernant les individus nourris avec A et AH a dû être stoppée après 15 jours, et au bout de 23 jours pour ceux nourris avec du ALH, afin de préserver un nombre suffisant d'individus pour les analyses de croissance en masse et de profils lipidiques. Les individus nourris avec des pastilles d'agarose seul (A) ont montré une perte de masse significative. Ceux nourris avec des pastilles AH, AL et ALH ont montré des valeurs de croissance en masse intermédiaires, non significativement différentes de zéro. Finalement, seules les ressources contenant des diatomées (AD et ALHD) ont permis d'observer une croissance en masse positive, significativement différente de zéro. L'acide palmitique (16 : 0), l'acide oléique (18 : 1 $\omega$ 9), l'acide linoléique (18 : 2 $\omega$ 6) et l'acide  $\alpha$ -linoléique (18 : 3 $\omega$ 3) ont été identifiés comme les acides gras dominants dans les litières de feuilles d'aulne et dans les hyphomycètes aquatiques, alors que les AGPI à longue chaîne ( $\geq 20$  carbones) étaient totalement absents de ces ressources. Chez les diatomées, nous avons observé une majorité d'acide palmitique (16 : 0), d'acide palmitoléique (16 : 1 $\omega$ 7) et d'acide eicosapentaénoïque (20 : 5 $\omega$ 3), ces composés représentant 60% de la totalité des acides gras. Seule l'alimentation avec des ressources contenant des diatomées ont permis aux juvéniles de gammares de conserver leurs stocks initiaux d'acides gras polyinsaturés. Afin de compléter ces observations expérimentales, nous avons effectué une analyse des contenus digestifs de gammares collectés *in situ*. Cette analyse nous a permis d'observer de nombreuses occurrences d'items diatomiques (retrouvés chez 40 à 70% des individus) et des algues vertes (chez 24 à 40% des individus) pouvant représenter jusqu'à 3% du total des contenus stomacaux chez les individus de plus petite taille, cette proportion étant plus réduite pour les organismes de plus grande taille.

Cette étude nous a ainsi permis de mettre en évidence :

1) que les ressources algales étaient certes minoritaires pour les gammares mais présentes dans l'alimentation d'une majorité d'organismes issus d'un cours d'eau forestier de tête de bassin versant, et

2) que l'ingestion de ces ressources algales avait, même en faible quantité, un impact positif sur la croissance en masse et le maintien des réserves en AGPI à longue chaîne de *G. fossarum*, contrairement aux litières (considérées généralement comme les ressources

principales des gammars dans ces cours d'eau) qui permettraient uniquement d'observer des taux de survie élevés, sans croissance en masse significative et avec une diminution des réserves corporelles en AGPI. Nos résultats laissent donc penser que bien que minoritaires pour les flux de carbone, les algues pourraient jouer un rôle important pour la production secondaire dans les ruisseaux forestiers de tête de bassin versant.

# Minor food sources can play a major role in secondary production in detritus-based ecosystems

Clément Crenier<sup>1</sup> | Julio Arce-Funck<sup>1</sup> | Alexandre Bec<sup>2,3</sup> | Elise Billoir<sup>1</sup> |  
 Fanny Perrière<sup>2,3</sup> | Joséphine Leflaive<sup>4</sup> | François Guérol<sup>1</sup> | Vincent Felten<sup>1</sup> |  
 Michael Danger<sup>1,5,6</sup> 

<sup>1</sup>UMR 7360, LIEC Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, Université de Lorraine, Metz, France

<sup>2</sup>LMGE, BP 10448, F-63000, Clermont université, Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand, France

<sup>3</sup>UMR 6023, LMGE, F-63173, CNRS, Clermont Ferrand, France

<sup>4</sup>EcoLab, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, Toulouse, France

<sup>5</sup>UMR 7360, LIEC, CNRS, Metz, France

<sup>6</sup>LIEC, UMR 7360, LTER-"Zone Atelier Moselle", Metz, France

## Correspondence

Michael Danger, UMR 7360, LIEC Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, Université de Lorraine, Metz, France.  
 Email: michael.danger@univ-lorraine.fr

## Funding information

ICARE EC2CO; ANR Functional Stream, Grant/Award Number: ANR-14-CE01-0009-01; ANR Multistress, Grant/Award Number: ANR-13-BSV7-0004-01

## Abstract

1. In many ecosystems, detritus is the dominant source of energy and the driver of ecosystem functioning. In particular, in forested headwater streams, allochthonous detritus (e.g. leaf litter, dead wood) constitute the main energy source for detritivores and living primary producers contribute marginally to ecosystem metabolism and energy flows.
2. We hypothesised that a low consumption of benthic diatoms, a high-quality resource, could be of major importance for the growth of detritivores. In particular, these resources might represent an essential source of polyunsaturated fatty acids (PUFAs).
3. In a microcosm experiment, three food resources were manipulated: alder (*Alnus glutinosa*: Betulaceae) leaf litter, fungal mycelium and a common benthic diatom. They were offered to juveniles of *Gammarus fossarum* (Crustacea: Amphipoda) as food resources, either alone or in combination, with each resource type being enclosed in agarose pellets. Juveniles were fed for 5 weeks in controlled conditions. Survival, feeding and growth rates were monitored. The fatty acids content of food resources and gammarids were also quantified.
4. Our results showed that detritus alone permits survival, but not the significant growth of detritivores. The presence of diatoms in food resources was necessary to ensure a significantly positive mass growth of detritivores over the 5-week experiment. More importantly, detritivores that did not receive algae in their food were generally unable to maintain their PUFA levels when compared to juveniles collected in the field.
5. Gut-content analysis of field-collected *G. fossarum* showed that low amounts of benthic algae were always visible, indicating that most individuals fed at least for a small part on benthic algae. These minor, but high quality, food sources might therefore be essential for ensuring the growth and survival of detritivores. Our results clearly highlight the need to consider the functional importance of such minor food sources.

## KEYWORDS

benthic algae, Crustacea, detritivorous invertebrates, fatty acids, trophic ecology

## 1 | INTRODUCTION

Primary production and detritus decomposition are two fundamental processes driving ecosystem functioning (Lindeman, 1942; Odum, 1956). Based on metabolic estimates using energy and nutrient budgets, ecologists have long distinguished between primary producer- (green) and detritus-based (brown) systems, where primary production or detritus decomposition, respectively, are thought to be the dominant source of energy and the main driver of ecosystem functioning (Moore et al., 2004). Because the majority of primary production is never consumed by herbivores and is ultimately returned to the system as dead organic matter (Crawley, 1997; Field, Behrenfeld, Randerson, & Falkowski, 1998; Polis & Strong, 1996), detritus-based ecosystems are widely distributed, both in aquatic or terrestrial settings.

Detritus is mainly composed of senescent plant tissue but also includes animal waste products and dead animals. Most consumers have long been selected to optimally retain their limiting elements (such as nitrogen [N] and phosphorous [P]) before senescence or excretion/egestion of wastes (Martinson et al., 2008). Thus, detritus is generally considered to be a low-quality resource for consumers, that is, the detritivores. Despite these nutritional constraints, detritus-based ecosystems are biologically diverse. For example, in a temperate climate forest dominated by beech trees, Schaefer (1991) reported that roughly 20% of species (about 400 species) were detritivores and were closely related to litter decomposition. Similarly, Meyer et al. (2007) underscored the high biological diversity inhabiting the upstream zones of headwater streams.

Forested headwater streams are typical detritus-based ecosystems, which have long been considered to be fuelled mainly by allochthonous organic matter (Vannote, Minshall, Cummins, Sedell, & Cushing, 1980). A large part of this organic matter is composed of leaf litter and dead wood (Fisher & Likens, 1973). It is unclear how these systems can maintain their biological diversity and secondary production considering the extremely low quality of their dominant detritus resources. It is well-known that microbial conditioning of leaf litter, particularly by aquatic hyphomycetes, renders detritus more palatable and more nutritious to detritivores (Bärlocher & Sridhar, 2014). Detritivores generally tend to have higher nitrogen (N) and phosphorus (P) requirements than is available in their resources (Frost et al., 2006; Martinson et al., 2008). For example, Danger, Arce Funck, Devin, Heberle, & Felten (2013) showed that the stoichiometric quality of a resource can control key life-history traits (growth and survival) of a detritivorous invertebrate. To meet their elemental requirements, detritivores must eat more detritus through compensatory feeding, (Flores, Larrañaga, & Elosegi, 2014) or be highly selective for the highest quality parts of resources (Lauridsen et al., 2014). Nevertheless, the elemental quality of the basal resources might not be the only limiting factor that controls the life-history traits of detritivores. In other metazoans, the growth and survival of detritivores might also be controlled by key molecules such as polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (Brett & Müller-Navarra, 1997). These PUFAs are mainly synthesised by autotrophic

organisms and cannot be synthesised *de novo* by most metazoans that rely on dietary fatty acids to meet their physiological requirements (Arts, Brett, & Kainz, 2009). PUFAs (especially long chain PUFAs, LC-PUFAs) such as 20:5 $\omega$ 3 and 22:6 $\omega$ 3 are essential molecules conferring fluidity, flexibility and selective permeability to cell membranes (Wallis, Watts, & Browse, 2002) enabling invertebrates to tolerate low temperatures (Masclaux et al., 2009; Schleichriem, Arts, & Zellmer, 2006). They are also intimately associated with invertebrate growth, reproduction and survival (Bec, Martin-Creuzburg, & von Elert, 2006; Müller-Navarra, 1995), and can greatly influence ecosystem secondary production (Müller-Navarra, Brett, Liston, & Goldman, 2000). For example, in lacustrine systems, algae containing large amounts of LC-PUFAs, such as diatoms, are considered to be a high-quality food in contrast to cyanobacteria, which lack such compounds (Brett & Müller-Navarra, 1997).

In contrast to ecosystems that rely on living primary producers as the main energy source and where biochemical limitations of herbivore growth have been regularly observed (Arts et al., 2009; Martin-Creuzburg & von Elert, 2009), information on the importance of PUFAs in detritus-based systems is comparatively scarce. In terrestrial ecosystems, the use of fatty acids to study trophic interactions has shown that invertebrates can acquire their carbon (C) from different pathways (microbial or fungal) and that fatty acid profiles can vary with season, species and development state (Ferlian, Scheu, & Pollierer, 2012). Nevertheless, the origin of PUFAs in terrestrial invertebrates exploiting detritus remains quite unclear (but see: Chamberlain & Black, 2005). The few studies conducted in aquatic detritus-based systems have shown that detritus (leaf litter colonised by microorganisms) contains no or extremely low amounts of PUFAs (Torres-Ruiz & Wehr, 2010). While some terrestrial fungal species have been shown to produce long-chain PUFAs, or are able to convert short-chain PUFAs into long-chain PUFAs (Salunke, Mangalekar, Kuvalekar, & Harsulkar, 2014; Van Dyk, Kock, & Botha, 1994), data are far scarcer in aquatic ecosystems. In headwater streams, detritus decomposition is mainly driven by aquatic hyphomycetes (Krauss et al., 2011). Other fungal taxa have also been found on leaf litter, including some generally found in terrestrial ecosystems. However, recent studies have shown that the highest leaf litter decomposition rates were observed when aquatic hyphomycetes were dominating the microbial decomposer communities (Clivot et al., 2014). Focusing on this dominant fungal group in detritus-based headwater streams, Arce-Funck, Bec, Perrière, Felten, and Danger (2015) showed that these fungal decomposers might be a source of short-chain PUFAs (SC-PUFAs) (i.e. 18:2 $\omega$ 6 and 18:3 $\omega$ 3), but lack LC-PUFAs such as 20:5 $\omega$ 3 and 22:6 $\omega$ 3. However, invertebrates living in these systems may have large amounts of LC-PUFAs in their biomass (Torres-Ruiz, Wehr, & Perrone, 2007, 2010; see also Guo, Kainz, Sheldon, & Bunn, 2016 for a review). Invertebrates inhabiting detritus-based ecosystems might thus depend, at least in part, on resources other than detritus and their decomposing microorganisms.

The aim of this study was to investigate the role of a minor food source, that is, diatoms, on the life-history traits of a common detritivore crustacean from forested headwater streams, *Gammarus*

*fossarum* (Gammaridae). We hypothesised that despite the minor contribution of autochthonous primary production to ecosystem metabolism and energy flows, living algae might play a major role in secondary production. To test this hypothesis, we measured experimentally the capabilities of *G. fossarum* to acquire PUFAs from different food sources (leaf litter, aquatic hyphomycetes and diatoms), offered either alone or in combination, and evaluated the effects of these food resources on *G. fossarum* survival and growth.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Experimental design

To evaluate the transfer of essential fatty acids from the resource to consumers, and to evaluate the effect of the food source on the growth and survival of *G. fossarum*, several resource treatments were developed using three basic resources (leaf litter, mycelium of aquatic hyphomycetes, and diatoms), given alone or in different combinations. Resources were given to gammarids in agarose pellets, leading to six treatments: agarose pellet as control (A); agarose and leaf litter (AL); agarose and aquatic hyphomycetes (AH); agarose and diatoms (AD); agarose, leaf litter and aquatic hyphomycetes (ALH); agarose, leaf litter, aquatic hyphomycetes and diatoms (ALHD). All treatments were replicated 36 times (Figure 1). Gammarids were individually placed in polyethylene microcosms (125 ml) with 60 ml of stream water, kept at 12°C in the dark, and fed ad libitum with the corresponding pellets for 5 weeks. Pellets and water were renewed weekly.

### 2.2 | *Gammarus fossarum* collection

Gammarids were collected using a hand net in La Maix stream (Latitude N 48°29'02.1", longitude E 007°04'008.5"), an unpolluted second-order forested stream located in the Vosges Mountains (north-eastern France). They were quickly transported to the laboratory in plastic coolers. During the 7 days of acclimation to laboratory conditions (12°C in the dark in aerated water), animals were fed alder (*Alnus glutinosa*: Betulaceae) leaf litter collected in the stream.

After acclimation, 258 gammarids of 3–4 mm in length were sorted. The juveniles were individually measured based on the length between the base of the first antenna and the base of the telson using SigmaScan Image Analysis Version 5.000 (SPSS Inc, Chicago, IL, U.S.A), as described in Danger et al. (2013). For the experiment, 216 juveniles were used (36 per resource treatment) and 42 individuals were used to establish the initial relationship between length of *G. fossarum* in the curved state and body weight. The average length of the 216 individuals used in the experiment was  $3.92 \pm 0.62$  mm (mean  $\pm$  SD), and no significant differences were observed between the treatments (ANOVA:  $F_{5,210} = 1$ ,  $p = .42$ ).

### 2.3 | Analysis of *G. fossarum* gut contents

The diet composition of *G. fossarum* was determined by gut-content analyses using a technique previously described by Felten, Tixier,

Guérol, De Crespín, and Dangles (2008). Thirty individuals of each size class (2, 4, 6 and 8 mm,  $\pm 0.25$  mm) were selected. Foregut contents were placed into a drop of water on a microscope slide. Particular care was taken to homogenise the gut contents well and to only slightly press the slide to avoid bias due to thickness. Ten fields were chosen randomly at 100 $\times$  magnification, and were then viewed at different magnifications from 100 $\times$  to 400 $\times$ . Seven food items were identified: (1) animal matter, (2) fine amorphous detritus, (3) diatoms, (4) filamentous algae, (5) coarse leaf detritus-woody debris, (6) particles derived from bryophytes, and (7) mineral particles. Fine amorphous detritus was distinguished from other items by its lack of well-defined cellular structure. Coarse leaf detritus was identified by the presence of brownish cells and palisade cell layers. Previous studies of the gut contents of several gammarids fed leaves, bryophytes, animals and fine particles of organic matter (FPOM < 1,000  $\mu$ m) under laboratory conditions helped identify each kind of food material. The relative abundance of diverse items in guts was estimated by the relative surface area occupied by the seven items in each of the randomly chosen fields of the slide for each individual.

### 2.4 | Water analysis

Water used for the experiment was collected at the sampling site from La Maix stream, and kept at 4°C in the dark until use. Its physicochemical characteristics were: pH = 7.2, conductivity = 54.3  $\mu$ S/cm,  $[\text{NO}_3^-] = 2.35$  mg/L, and  $[\text{PO}_4^{3-}] < 0.02$  mg/L. Before being used in the experiment, water was aerated and transferred in a 12°C chamber for 48 hr, that is, the temperature used in the experiment.

### 2.5 | Leaf litter collection

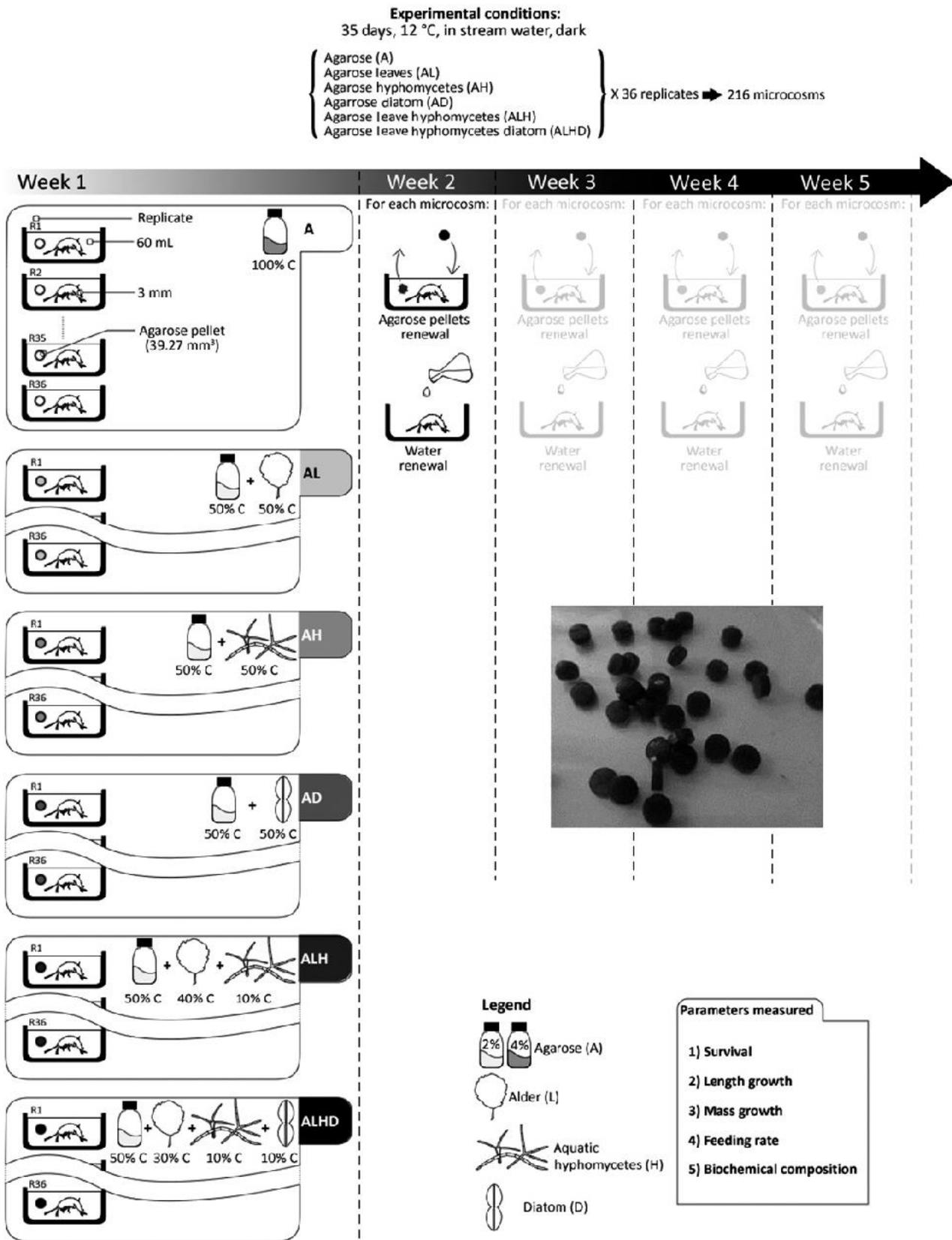
Alder leaf litter was collected in the riparian zone of the La Maix stream at abscission using nets attached 1 m above ground, then dried and stored at room temperature.

### 2.6 | Diatom production

An axenic strain of the diatom *Nitzschia palea* (reference CPCC 160) was grown in four 5-L Erlenmeyer flasks filled with 4 L of Combo medium (Kilham, Kreeger, Lynn, Goulden, & Herrera, 1998) in a temperature-controlled chamber at 18°C (50  $\mu$ E, light/dark 16:8) under continuous shaking (150 rpm). After 2.5 weeks of culture, at the end of the exponential growth phase, the cells were harvested by centrifugation (4,000 g, 10 min). The cell pellet was then freeze-dried and stored at  $-20^\circ\text{C}$  until use.

### 2.7 | Aquatic hyphomycetes mycelium production

To generalise the results, three aquatic hyphomycetes species were used. All species were able to synthesise  $\alpha$ -linolenic acid (18:3 $\omega$ 3) (Arce-Funck et al., 2015). *Alatospora acuminata*, *Neonectria*



**FIGURE 1** Experimental design used to assess the effects of different food resources on *Gammarus fossarum* juveniles and a picture of the agarose pellets (agarose and leaf litter treatment is shown). The total amount of carbon given to gammarids in agarose pellets was similar for all treatments

*lugdunensis* and *Tricladium chaetocladium* were grown in 500-mL Erlenmeyer sterilised flasks containing 300 ml of a mineral salt solution (Arce-Funck et al., 2015) with glucose as a C source (400 µg P/L, Glucose 5 g/L). A mycelium homogenate (150 µl) of each fungal species was inoculated aseptically and monospecifically in each flask, all cultures being replicated five times. After 27 days of growth, to determine fungal biomass, the aquatic hyphomycetes were filtered individually on previously weighted glass microfiber filters (GF/F, 0.7 µm, Whatman, Maidstone, England), freeze-dried and weighed to the nearest 0.001 mg using a microbalance (Perkin Elmer AD6 Autobalance, Perkin Elmer Corp., Waltham, MA, U.S.A).

## 2.8 | Elemental composition of resources

Resources were freeze-dried, ground and weighed to the nearest 0.001 mg using a microbalance (Perkin Elmer AD6 Autobalance). The C and N content was quantified using a CHN elementary analyser (Carlo Erba NA2100, Thermo Quest CE International, Milan, Italy). The P content was quantified after persulfate digestion and spectrophotometry, as described in Danger, Cornut, Elger, and Chauvet (2012). Results were expressed as the mass percentage of the element in different resources. Alder leaf litter contained 47.7%, 1.0% and 0.1% of C, N and P respectively. Aquatic hyphomycetes contained 41.4%, 9.5% and 1.4% of C, N and P respectively. Finally, diatoms contained 34.5%, 3.9% and 0.5% of C, N and P respectively.

## 2.9 | Manipulation of the biochemical quality of the resource in agarose pellets

Low-gelling temperature agarose (Sigma A9414) was used as a nutrient-free matrix to prepare food source pellets. The low-gelling point limited the deterioration of fatty acids due to excessive temperature. The whole protocol is summarised in Figure S1. Briefly, alder leaves and aquatic hyphomycetes were ground using a ball mill. The same amount of fungal biomass per species was weighed and ground to obtain a plurispecific homogenate. Lyophilised diatoms were reduced to powder using a steel pestle to gently break up the cell aggregates. The three resources were then kept separately at  $-20^{\circ}\text{C}$  in plastic flasks until use.

To prepare the agarose pellets, a Plexiglas<sup>®</sup> mould composed of 40 holes, 5-mm wide and 2-mm high (39.27 mm<sup>3</sup>) was constructed. Two agarose concentrations were used, 4% and 2%. The former was used for control pellets (100% of C coming from agarose), and the second was used to coat the resources (50% of C coming from agarose, the remaining 50% of C coming from selected resources). In both cases, agarose was dissolved in glass bottles with demineralised water and heated in a microwave. The bottles were then placed in an agitated water bath at 38°C (pre-heated for at least 1 hr to reach the desired working temperature). After reaching this temperature, 1.6 ml of agarose solution was introduced to a 2 ml Eppendorf<sup>®</sup> tube and mixed with each resource (leaf litter, aquatic hyphomycetes and diatoms). The mass of resources added in each pellet was selected based on resource C content in order to offer the

consumers 50% of the C derived from the resources. This mixture was homogenised using a vortexer and placed in a thermostatic bath until use to avoid agarose gelling. The pellets were finally obtained by injecting the homogenate in the holes of the Plexiglas<sup>®</sup> mould. After a few minutes, the pellets were unmoulded and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  in Petri dishes until use.

## 2.10 | Endpoints

### 2.10.1 | Agar pellet consumption by *G. fossarum*

At each water renewal, the remaining parts of the pellets were collected to estimate the consumption throughout the experiment. All pellets from microcosms where detritivores survived at the end of the experiment were freeze-dried and weighed to the nearest 0.001 mg using a microbalance (Perkin Elmer AD6 Autobalance, Perkin Elmer Corp.). The initial average mass of one pellet was estimated by weighing 9–12 pellets per treatment. Consumption rates corresponded to the total mass of pellets in milligrams consumed per milligram of consumer per day.

### 2.10.2 | Survival

Survival was monitored at water renewal for the first week and then daily. To ensure that there was sufficient material for the analysis of the fatty acid composition of animals, some treatments were not carried to term and were stopped earlier, that is, after 15 days for the A and AH treatments, and after 23 days for the ALH treatment.

### 2.10.3 | *Gammarus fossarum* mass growth

At the end of the experiment all survivors were photographed and the body length was measured as described in Danger et al. (2013). The equation of the relationship between body length and weight was evaluated with 42 individuals used to calculate the mass growth of survivors ( $y = 0.063x^2 - 0.376x + 0.506$ ,  $R^2 = .90$ , where  $y$  corresponds to the initial body weight [mg] and  $x$  to the initial body length [mm]). The mass growth rates were expressed as mass gain or loss per initial mass of gammarid per day (mg mg gammarid<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>).

### 2.10.4 | Fatty acid analysis

Fatty acid analyses were performed on resources (leaf, diatoms and hyphomycetes), field-collected juveniles and individuals used in experiments. For the resources, fatty acid analyses were conducted on batched material. To avoid any confounding effects, test animals were allowed to empty their gut contents for 48 hr before the fatty acid analyses. To ensure sufficient material for accurate measurements, fatty acid analyses were performed on batches of eight individuals in triplicates, except for the A and AH treatments where only one measurement was possible due to the high mortality rate. Lipids were extracted two times using a chloroform/methanol solution according to the method proposed by Folch, Lees, and Stanley

(1957). Once extracted, fatty acids were converted into fatty acid methyl-esters (FAME) by acid-catalysed transesterification and analysed on an Agilent technologies™ 6850 gas chromatograph. FAME were identified by comparing retention times with those obtained from Supelco® and laboratory standards, and were quantified against internal standards (13:0).

### 2.11 | Statistical analyses

All statistical analyses were performed using STATISTICA (SAS institute), except for the survival analyses, Correspondence analysis (CA) and canonical correspondence analysis (CCA) that were conducted using the statistical software R (R Development Core Team, 2015). In all cases a  $p$ -value of  $p \leq .05$  was considered to be significant. The differences in pellet consumption by gammarids was tested using a non-parametric approach (Kruskal–Wallis test) because the homogeneity of variances was not met (Levene's test), followed by post hoc comparisons (Tukey test). Survival data were analysed by Kaplan–Meier survival curves and log-rank tests to compare curves. By accounting for censored data, this approach enabled an investigation of the effects of resource treatments throughout the experiment, even though the duration of the experiment differed between treatments. After calculating if there were differences between all the resource treatments, pairwise comparisons were conducted between treatments, with a Bonferroni adjustment for multiple testing. The mass growth rates were analysed with an ANOVA followed by a Tukey post hoc test. To verify if growth rates were significantly different from zero, comparisons of means to zero were conducted using t-tests on each treatment. Finally, to understand further the effect of diatoms on *G. fossarum* growth, a two-way ANOVA was carried out on A, ALH, AD and ALHD treatments, testing the single and interactive effects of the presence/absence of leaf litter and hyphomycetes resources (LH) and of the presence/absence of diatoms (D).

The relative abundance of diatoms and filamentous algae in the foregut of gammarids were analysed using ArcSin root square transformed data followed by Tukey post hoc tests. Finally, the proportions of the main fatty acids of gammarids were analysed using ANOVAs on ArcSin square root transformed data, with a Bonferroni adjustment for multiple testing followed by Tukey post hoc tests.

The main trends of the fatty acid data (in percentages) in resources and gammarids were first observed through an ANOVA analysis focusing on those that were the most apparent for resource types (Leaf: 13.8% of 18:1 $\omega$ 9, 6.5% of 18:3 $\omega$ 3; Hyphomycete: 36% of 18:1 $\omega$ 9, 20% of 18:2 $\omega$ 6, 6.8% of 18:3 $\omega$ 3; Diatoms: 21% of 16:1 $\omega$ 7, 20:5 $\omega$ 3 and 22:6 $\omega$ 3 only found in diatoms [16.9% and 2.2% respectively]). To visualise the relationship between resources and gammarid fatty acids profiles, fatty acid data were analysed through a CA. The effect of diet treatment on gammarid fatty acid composition was then statistically tested through a CCA. This enabled the testing of the statistical significance of the relationship between gammarid content and diet ( $p$ -values assessed using permutation tests). CA and CCA were performed using the ade4 and vegan R-packages (Dray & Dufour, 2007; Oksanen et al., 2013).

## 3 | RESULTS

### 3.1 | *Gammarus fossarum* consumption rates

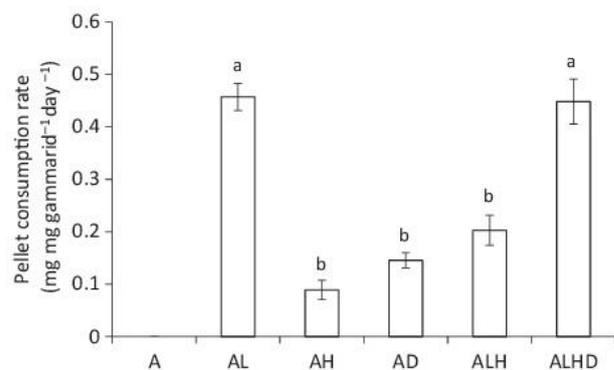
The consumption rate of animals fed control agarose pellets (A) was zero: that is, they did not eat the agarose on its own (Figure 2). The highest consumption rate was reported for animals fed AL and ALHD pellets. The consumption rate of animals fed AH, AD and ALH pellets was significantly lower (Kruskal–Wallis:  $H_{4,111} = 58.3$ ,  $p < .001$ ), with the animals consuming 81%, 68% and 56% less respectively.

### 3.2 | Survival rates

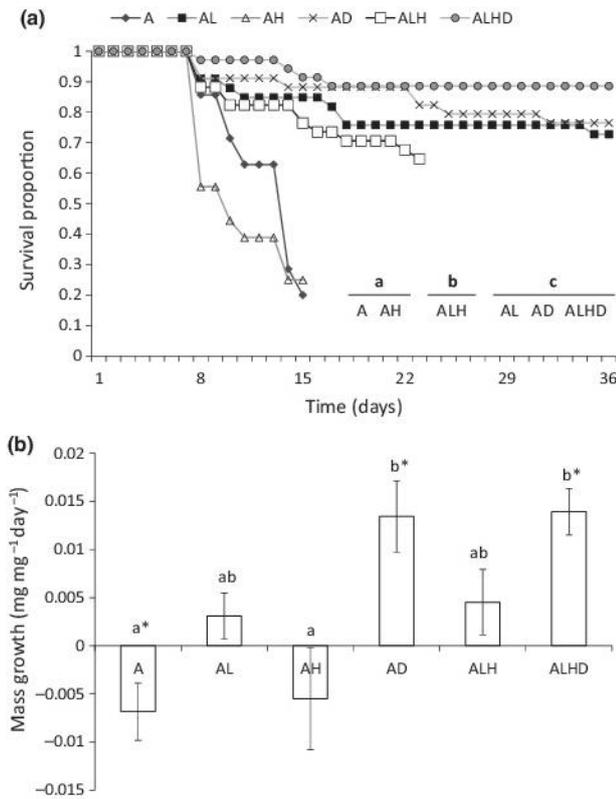
To ensure that there was sufficient biological material for FA composition analyses, the experiments with animals fed A, AH and ALH pellets had to be stopped earlier than initially designed. The experiments with animals fed A and AH were stopped after 15 days, and for those fed ALH, after 23 days. The survival of animals in the different treatments was significantly affected by the type of resources ( $\chi^2 = 98.6$ ,  $p < .001$ ; Figure 3a). Compared to the agarose control (A), the survival of animals fed AH pellets was not significantly different (A-AH:  $\chi^2 = 1.6$ ,  $p > .05$ ); however, the survival of gammarids fed AL, AD, ALH and ALHD was significantly higher (A-AL:  $\chi^2 = 24.2$ ,  $p < .001$ , A-AD:  $\chi^2 = 29.52$ ,  $p < .001$ , A-ALH:  $\chi^2 = 20.4$ ,  $p < .001$ , A-ALHD:  $\chi^2 = 37.1$ ,  $p < .001$ ; Figure 3a). The results for AL, AD and ALHD did not significantly differ from each other.

### 3.3 | *Gammarus fossarum* mass growth

The mass growth of gammarids was significantly affected by the food source (ANOVA:  $F_{5,112} = 5.41$ ,  $p < .001$ ; Figure 3b). Animals fed



**FIGURE 2** Consumption rates of the different food resources by gammarids. A = agarose pellets alone (control), AL = agarose and leaf litter, AH = agarose and aquatic hyphomycetes, AD = agarose and diatoms, ALH = agarose, leaf litter and aquatic hyphomycetes, ALHD = agarose, leaf litter, aquatic hyphomycetes and diatoms. No consumption was detected for agarose pellets alone. Error bars represent standard deviations. Different letters indicate significant differences after post hoc Tukey tests



**FIGURE 3** Survival proportion (a) and mass growth rates (b) of gammarids fed different food items throughout the experiment. A = agarose pellets alone (control), AL = agarose and leaf litter, AH = agarose and aquatic hyphomycetes, AD = agarose and diatoms, ALH = agarose, leaf litter and aquatic hyphomycetes, ALHD = agarose, leaf litter, aquatic hyphomycetes and diatoms. Due to the high mortality rates, and to ensure a batch of at least eight individuals for growth rates and fatty acid measurements, treatments A and AH were stopped after 15 days. In the same way, the ALH treatment was stopped after 23 days, enabling three batches of eight individuals to be saved for fatty acid measurements. On (a) different letters indicates significantly different survival curves after pairwise comparisons with a Bonferroni adjustment for multiple testing. On (b), error bars represent standard deviations and asterisks show results significantly different from zero after t test

agarose pellets alone (A) exhibited significantly negative mass growth rates (mass growth rate:  $-0.0078 \pm 0.0078 \text{ mg mg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ , comparison to zero test:  $t_{1,7} = -2.63$ ,  $df = 7$ ,  $p = .038$ ). AH, AL and ALH resources led to intermediate values of gammarids mass growth rates that did not significantly differ from zero ( $-0.0057 \pm 0.0145$ ,  $0.0031 \pm 0.0117$  and  $0.0043 \pm 0.0154 \text{ mg mg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ , for the AH, AL and ALH treatments respectively; comparison to zero tests:  $t_{1,7} = -1.12$ ,  $p = .30$ ;  $t_{1,23} = 1.30$ ,  $p = .21$ ;  $t_{1,21} = 1.29$ ,  $p = .21$ , for the AH, AL and ALH treatments respectively). AD and ALHD pellets were the only resources that led to significantly positive mass growth rates ( $0.0132 \pm 0.0188$  and  $0.0140 \pm 0.0122 \text{ mg mg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ , for the AD and ALHD treatments, respectively, comparison to zero tests:  $t_{1,25} = 3.57$ ,  $p = .002$ ;  $t_{1,30} = 6.36$ ,  $p < .001$ , for the AD and ALHD

treatments respectively). The two-way ANOVA investigating the effects of the presence/absence of leaf litter and hyphomycetes resources (LH) and of the presence/absence of diatoms (D) revealed no significant effect of LH ( $F_{1,82} = 2.79$ ,  $p = .10$ ) and no significant interactive effect of LH and D ( $F_{1,82} = 2.15$ ,  $p = .15$ ) on the growth rates of gammarids, but a highly significant and positive effect of the presence of diatoms in resources on the mass growth rate of gammarids ( $F_{1,82} = 16.0$ ,  $p < .001$ ).

### 3.4 | Fatty acid transfer from resources to *G. fossarum*

The dominant fatty acids in leaf litter and aquatic hyphomycetes were palmitic acid (16:0), oleic acid (18:1 $\omega$ 9), linoleic acid (18:2 $\omega$ 6) and  $\alpha$ -linolenic acid (18:3 $\omega$ 3, Table 1). In contrast, LC-PUFAs (number of C  $\geq$  20) were totally lacking from these resources. In diatoms, the major fatty acids were palmitic acid (16:0), palmitoleic acid (16:1 $\omega$ 7) and eicosapentaenoic acid (20:5 $\omega$ 3). These compounds accounted for more than 60% of the total fatty acids.

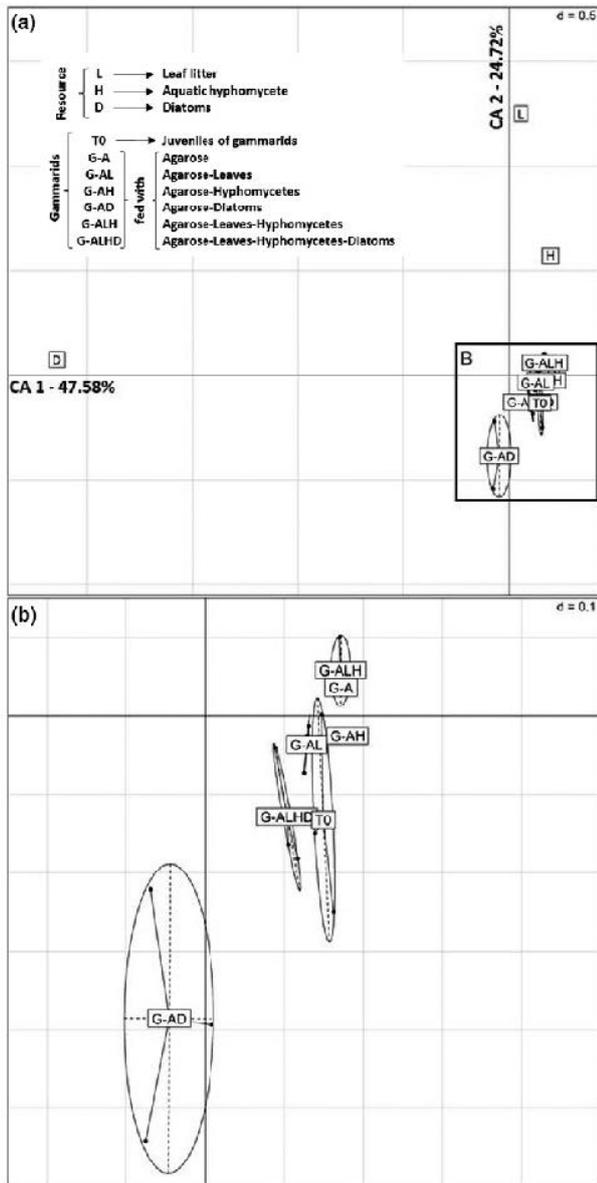
Field-collected juveniles (T0 Juveniles) were characterised by large amounts of PUFAs ( $37.3 \pm 7.3\%$  of total fatty acids). LC-PUFAs were mainly represented by 20:5 $\omega$ 3, 20:4 $\omega$ 6 and 22:6 $\omega$ 3 (representing  $11.4 \pm 2.2\%$ ,  $7.7 \pm 1.1\%$  and  $4.5 \pm 2.3\%$  of total fatty acids respectively). Branched fatty acids, mainly represented by anteiso 15:0 and anteiso 17:0, contributed less than 1% to the total fatty acid profiles.

In experimentally-fed individuals, the proportions of saturated fatty acids (SAFAs) were similar between animals in the different treatments, and ranged from  $21.6 \pm 7.1\%$  in animals fed AD, to  $31.3\%$  in animals fed A. Monounsaturated fatty acid (MUFA) compositions were also quite similar for each treatment, even though animals fed AD pellets exhibited higher proportions of 16:1 $\omega$ 7 than animals in the other treatments. Strong differences in fatty acid profiles among treatments were due to PUFAs. PUFAs varied from 28.1% in animals fed A pellets, to  $38.8 \pm 4.4\%$  in those fed ALHD pellets. Animals fed resources, including diatoms in their composition, exhibited the highest proportions of  $\omega$ 3 series PUFAs, with 20:5 $\omega$ 3 and 22:6 $\omega$ 3 levels being nearly two to three times higher than in the other treatments. When compared to field-collected juveniles, experimentally-fed animals given a diet without diatoms (A, AH, AL and ALH) showed a tendency to decrease their 20:5 $\omega$ 3 content (reductions of 28%, 17%, 26% and 35% for the A, AH, AL and ALH treatments, respectively, only significant for ALH). In contrast, individuals that were fed diatoms (AD and ALHD) significantly increased (AD) or maintained (ALHD) their PUFA levels close to those of field-collected juveniles (increases of 43% and 9% in the AD and ALHD treatments respectively). CA and a significant CCA analysis ( $p < .0001$ ) (Figure 4) confirmed that fatty acids in resources greatly influenced the fatty acid profiles of gammarids. Gammarids from the ALHD treatment had the closest fatty acid profiles to those of field-collected juveniles. In contrast, individuals fed A, ALH and AD pellets exhibited fatty acid profiles clearly diverging from those of field-collected juveniles.

**TABLE 1** Fatty acid composition (wt.%) of the three resource types, field-collected juveniles of gammarids (T0 Juveniles), and the same gammarids fed up to 5 weeks with the different food items (A and AH groups exhibiting low survival rates were stopped and preserved for composition analyses): agarose pellets as control (A); agarose and leaf litter (AL); agarose and aquatic hyphomycetes (AH); agarose and diatoms (AD); agarose, leaf litter and aquatic hyphomycetes (ALH); agarose, leaf litter, aquatic hyphomycetes and diatoms (ALHD). Saturated fatty acid (SAFA), MUFA and polyunsaturated fatty acid (PUFA) corresponds to the sum of the percentage of saturated, monounsaturated and PUFAs, respectively. The most representative fatty acids were compared by ANOVAs and the different letters indicate significant differences after Tukey post hoc tests

	Resources			T0 Juveniles	Gammarus fossarum fed for 5 weeks					
	Leaf (L)	Hyphomycetes (H)	Diatoms (D)		A*	AL	AH*	AD	ALH	ALHD
12:0	1.7	0.2	0.3	1.2 ± 0.2	1	0.8 ± 0.1	0.6	0.5 ± 0.1	1.2 ± 0.2	0.4
14:0	6.2	0.7	4.7	3.4 ± 0.5	4.4	4 ± 0.5	2.1	2.8 ± 0.9	3.3 ± 0.4	1.7 ± 0.2
15:0	2.1	0.3	1	1.6 ± 0.1	1.9	2.6 ± 0.4	1	1.4 ± 0.6	1.8 ± 0.2	1 ± 0.1
16:0	25.9	21.2	28.2	10.9 ± 3.4	14.5	13.4 ± 1	14.5	10.8 ± 3.6	12.8 ± 2.3	14.7 ± 0.7
17:0	1.6	0.2	0.4	1.6 ± 0.3	2.1	1.9 ± 0.3	1	1.1 ± 0.3	1.3 ± 0.2	0.8
18:0	6.9	8.3	0.9	2.7 ± 0.9	3.7	3.3 ± 0.3	3.7	2.6 ± 1.1	3.2 ± 0.7	3.9 ± 0.3
20:0	8.9	1.3	—	3 ± 0.8	3.7	2.7 ± 0.1	1.7	1.8 ± 0.6	2.1 ± 0.3	1.1 ± 0.1
22:0	8	—	—	0.8	—	1.1 ± 0.4	0.6	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.6	0.6 ± 0.1
23:0	1.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—
24:0	2.5	0.6	0.5	—	—	—	—	—	—	—
SAFA	65	32.7	36	25.3 ± 6.3 <sup>a</sup>	31.3	29.7 ± 2.3 <sup>a</sup>	25.1	21.6 ± 7.1 <sup>a</sup>	26.4 ± 3.9 <sup>a</sup>	24.3 ± 0.9 <sup>a</sup>
16:1 $\omega$ 9	—	0.2	—	2 ± 0.4	2	4.5 ± 1.1	1.2	2.3 ± 1.5	2.8 ± 0.7	1.2 ± 0.3
16:1 $\omega$ 7	2.3	1.2	21	2.1 ± 0.3 <sup>a</sup>	1.5	2.8 ± 0.2 <sup>a</sup>	1	7.7 ± 1.9 <sup>b</sup>	2.4 ± 0.6 <sup>a</sup>	2.6 ± 1.6 <sup>a</sup>
18:1 $\omega$ 9	13.8	36.1	2.7	24.8 ± 1.6 <sup>ab</sup>	31.1	22.5 ± 1.1 <sup>ab</sup>	27.4	19.8 ± 1.3 <sup>a</sup>	28.3 ± 3.6 <sup>b</sup>	25.5 ± 3.6 <sup>ab</sup>
18:1 $\omega$ 7	1.4	0.7	0.3	3.8 ± 0.2	3.8	5.7 ± 0.4	2.5	5.4 ± 0.3	3.3 ± 0.5	2.6 ± 0.3
20:1 $\omega$ 9	—	0.2	—	1.1 ± 0.1	1.3	1 ± 0.2	1.2	1.1 ± 0.2	1 ± 0.2	1.7 ± 0.3
MUFA	17.4	38.4	23.9	33.8 ± 1 <sup>a</sup>	39.7	36.6 ± 2 <sup>a</sup>	33.4	36.4 ± 2.8 <sup>a</sup>	37.8 ± 3.8 <sup>a</sup>	33.7 ± 5.3 <sup>a</sup>
16:2 $\omega$ 4	—	—	6.9	—	—	—	—	—	—	—
16:3 $\omega$ 4	—	—	4	—	—	—	—	—	—	—
16:4 $\omega$ 1	—	—	2.9	—	—	—	—	—	—	—
18:2 $\omega$ 6	8.7	20	0.6	7.1 ± 0.3 <sup>ab</sup>	8	6.7 ± 1 <sup>a</sup>	11.5	3.1 ± 0.1 <sup>c</sup>	11.7 ± 1 <sup>d</sup>	9 ± 1.1 <sup>b</sup>
18:3 $\omega$ 6	—	—	0.3	—	—	—	—	—	—	—
18:3 $\omega$ 3	6.5	8	1.2	1.9 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.4	2.5 ± 0.5 <sup>a</sup>	2.9	0.6 ± 0.1 <sup>b</sup>	3.8 ± 0.6 <sup>c</sup>	2.4 ± 0.4 <sup>a</sup>
20:2 $\omega$ 6	—	—	—	3.1 ± 0.3	2.7	1.4 ± 0.5	2.1	1.6 ± 0.1	2.1 ± 0.7	2 ± 0.2
20:4 $\omega$ 6	—	—	1	7.7 ± 1.1	7.8	6.4 ± 1.1	7.6	6.4 ± 1.4	6.1 ± 0.6	5.5 ± 0.9
20:3 $\omega$ 3	—	—	—	0.8 ± 0.2	—	0.4 ± 0.4	0.8	0.2 ± 0.2	—	0.5 ± 0.1
20:5 $\omega$ 3	—	—	16.9	11.4 ± 2.2 <sup>ab</sup>	8.2	8.4 ± 1.9 <sup>ac</sup>	9.4	16.4 ± 3.7 <sup>d</sup>	7.4 ± 0.6 <sup>c</sup>	12.4 ± 1.8 <sup>bd</sup>
22:5 $\omega$ 3	—	—	—	0.7 ± 0.6	—	—	0.6	1.2 ± 0.7	—	0.8 ± 0.3
22:6 $\omega$ 3	—	—	2.2	4.5 ± 2.3 <sup>a</sup>	—	3.8 ± 0.8 <sup>a</sup>	3.6	8.1 ± 2.8 <sup>a</sup>	2.6 ± 2.3	6.4 ± 2.6 <sup>a</sup>
PUFA	15.2	28	35.8	37.3 ± 7.3 <sup>a</sup>	28.1	29.7 ± 4.9 <sup>a</sup>	38.4	37.5 ± 8.9 <sup>a</sup>	33.7 ± 1 <sup>a</sup>	38.8 ± 4.4 <sup>a</sup>
∑ $\omega$ 3	6.5	8	20.2	19.3 ± 5.6 <sup>a</sup>	9.6	15.2 ± 3 <sup>a</sup>	17.2	26.4 ± 7.6 <sup>a</sup>	13.9 ± 2.5 <sup>a</sup>	22.4 ± 4.4 <sup>a</sup>
∑ $\omega$ 6	8.7	20	1.8	17.9 ± 1.8 <sup>ab</sup>	18.5	14.5 ± 2.1 <sup>ac</sup>	21.2	11.1 ± 1.5 <sup>c</sup>	19.8 ± 1.5 <sup>b</sup>	16.4 ± 0.1 <sup>ab</sup>
iso 15:0	—	—	—	—	0.5	0.2 ± 0.2	—	0.4 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.1
anteiso 15:0	—	—	—	0.2 ± 0.2	0.4	0.4 ± 0.1	—	0.2 ± 0.1	0.3	0.1 ± 0.1
iso 17:0	—	—	—	—	—	—	—	0.7	—	0.5 ± 0.2
anteiso 17:0	—	—	—	0.4 ± 0.4	—	—	0.6	0.4 ± 0.1	—	0.3
∑ Branched FA	—	—	—	0.6 ± 0.5	0.9	0.6 ± 0.3	0.6	1.8 ± 0.2	0.5 ± 0.2	1 ± 0.2
∑ NI	2.3	0.9	4.2	3.1 ± 0.5	—	3.3 ± 0.7	2.5	2.8 ± 0.9	1.6 ± 1.4	2.2 ± 0.5

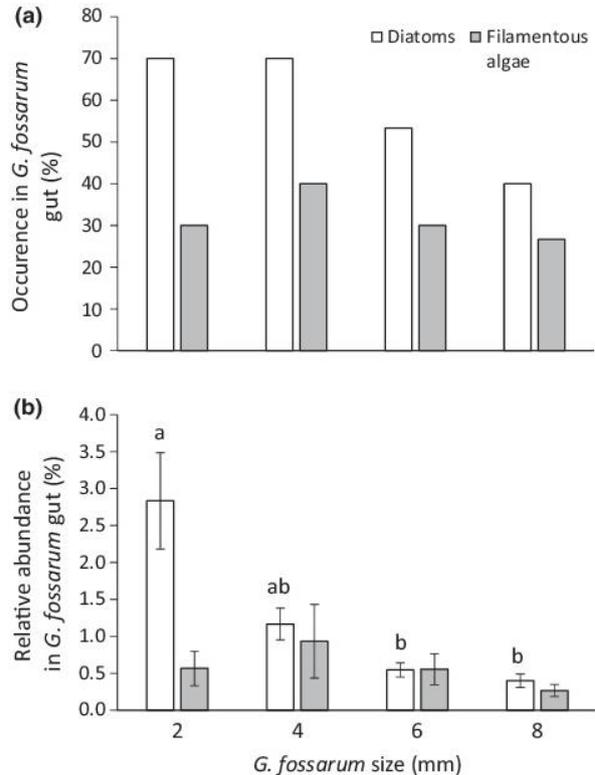
\*These conditions were prematurely stopped due to high mortality rates.



**FIGURE 4** Results of the correspondence analysis (a) conducted on the fatty acid profiles (in percentages) of resources (L = leaf litter, H = mycelium of aquatic hyphomycetes, and D = diatoms) and gammarids. (b) focus on gammarids profiles. G-A = fed agarose pellets alone (control), G-AL = fed agarose and leaf litter, G-AH = fed agarose and aquatic hyphomycetes, G-AD = fed agarose and diatoms, G-ALH = fed agarose, leaf litter and aquatic hyphomycetes, G-ALHD = fed agarose, leaf litter, aquatic hyphomycetes and diatoms. Ellipses permit to visualise the dispersion of the three replicate values

### 3.5 | Field-collected *G. fossarum* gut content analyses

Diatoms were present in the gut of 40%–70% (Figure 5) of field-collected gammarids collected in the forested headwater stream, while



**FIGURE 5** Importance of algal items in field-collected gammarids foregut contents as a function of their size ( $n = 30$ ). (a) Percentage occurrence of diatoms and filamentous algae in the foregut contents. (b) Relative abundance of diatoms and filamentous algae in the foregut contents. Relative abundance was estimated by the relative surface of the seven items in each field of the slide for each individual ( $n = 30$ ). Error bars represent standard deviations. Different letters indicate significant differences after post hoc Tukey tests

filamentous algae were found in 27%–40% of analysed animals. Both the occurrence and the relative abundance of diatoms in the foregut of field-collected gammarids were higher for small individuals (2.83% for 2-mm individuals, with a decrease from 1.14% to 0.4% for 4–8-mm individuals), whereas this trend was not observed for filamentous algae (ranging from 0.27% for 8-mm individuals to 0.93% for 4-mm individuals). For comparison, the relative abundance of coarse and fine particulate detritus represent from 81% in 2-mm individuals to 61.9% in 8-mm individuals (for detailed results of gut contents, see Figure S2).

## 4 | DISCUSSION

In forested headwater streams, it has long been recognised that most of the energy available is derived from allochthonous detritus such as leaf litter and dead wood (Cummins, Coffman, & Roff, 1966; Fisher & Likens, 1973; Wallace, Eggert, Meyer, & Webster, 1999). This fundamental characteristic also represents a central tenet of the

River Continuum Concept (Vannote et al., 1980). As a food resource detritus is of low quality, it is rendered more nutritious and palatable by microbial decomposers (Bärlocher, 1985; Bärlocher & Sridhar, 2014). A number of studies have suggested that autochthonous primary production might not be negligible in the functioning of detritus-based streams (e.g. Danger et al., 2013; Hayden, McWilliam-Hughes, & Cunjak, 2016; Smits, Schindler, & Brett, 2015). In our study, both leaf litter- and diatom-containing diets ensured high gammarid survival rates, while only the presence of diatoms, even in low amounts, permitted juveniles to maintain positive growth rates after the 5-week experiment. This result directly underlines the importance of such minor food resources.

While leaf litter is undoubtedly one of the most abundant resources in forested headwater stream food webs (Wallace et al., 1999), its suitability as a complete food source has long been questioned. Freshly fallen leaves of some tree species may permit the survival and sometimes growth of leaf-eating invertebrates, but they always contain large amounts of structural compounds (lignin and cellulose, which are almost indigestible to stream invertebrates, Bärlocher, 1985). Most studies have shown a better survival and higher growth of detritivorous invertebrates fed on microbially conditioned leaf litter (especially by aquatic hyphomycetes) than those fed on unconditioned leaves (Bärlocher, 1985; Bärlocher & Sridhar, 2014; Danger et al., 2013). However, not all studies have demonstrated this, with several detritivores being partly able to tolerate unconditioned, low-quality leaf litter due to changes in respiration rates (Graça, Maltby, & Calow, 1993b). In our study, gammarids were offered unconditioned alder leaves, which are among the softest and most nutrient-rich species occurring in the riparian zone of streams (Bärlocher & Sridhar, 2014). This food source was sufficient to ensure high survival, but led to null growth rates. Interestingly, regardless of the resource items associated with the leaf litter, the presence of alder in resource pellets systematically led to the highest consumption rates, suggesting that leaf litter might deliver attractive compounds for detritivores. This result is likely to have been very different with other more refractory leaf litter species.

When offering mycelium pellets, either alone or in combination with alder leaves only, gammarids displayed strongly reduced survival rates. However, the mycelia of aquatic hyphomycetes are generally considered by stream ecologists to be a high-quality and easy assimilated resource. For example, Bärlocher and Kendrick (1975) showed that the effective nutritional value per unit of microbial cell weight was 4–10 times higher than that of freshly fallen leaves. However, when offered to detritivorous invertebrates as a single resource, fungal mycelium often produced contradictory results. The consumption of some fungal species led to higher invertebrate growth rates than the consumption of leaf litter, while the consumption of some other fungal species led to similar or even lower growth rates than the consumption of leaf litter, suggesting the presence of toxic compounds (Bärlocher & Kendrick, 1973; Cargill, Cummins, Hanson, & Lowry, 1985). Similarly, some fungal species have been shown to be attractive for detritivores and some have been shown to be repellent (Bärlocher & Kendrick, 1973; Graça, Maltby, & Calow, 1993a), with

this result being partly dependent upon culture conditions (see Bärlocher & Sridhar, 2014 for a review). In our study, in order to make our results more general, the mycelium of three aquatic hyphomycete species were provided in the food mixture, among which at least one species was recognised as being highly palatable to *Gammarus* sp. (*A. acuminata*) and another one intermediately palatable (*N. lugdunensis*, Arsuffi & Suberkropp, 1989). The very low survival rates of mycelium fed gammarids, despite the non-null consumption rates, is more likely to suggest a mycelium indigestibility or a toxicity than a low attractiveness of the resource. Interestingly, the addition of leaf litter to fungal mycelium (ALH) did not lead to significantly higher consumption rates, but significantly improved survival rates. This survival rate was still lower than that of individuals fed solely on leaf litter (AL), which suggests a mycelium toxicity, although further testing is required to confirm this hypothesis.

In our study, we did not test for the effect of microbially conditioned leaf litter. Fungi convert some of the litter they colonise into fungal biomass, which can represent more than 15% of the total litter mass (Gessner & Chauvet, 1994). Fungal activity is able to decompose plant polymers into smaller units that can readily be digested by detritivores (Bärlocher, 1982; Canhoto & Graça, 2008). It could, therefore, be expected that rather than just leaf litter or fungi, the highest quality resource for detritivores consists of a mixture of decomposing material and fungal mycelium. In another experiment, investigating the role of the elemental quality of resources on life-history traits of gammarids, Danger et al. (2013) found no effect of leaf litter conditioned by aquatic hyphomycetes on *G. fossarum* growth and survival. However, this detritivore exhibited significantly higher growth rates and survival when nutrients (phosphorus) were added to the microbially conditioned detritus, suggesting that only the combination of mycelium, decomposing detritus and nutrients could positively influence detritivore life-history traits. In the present study, the nutrient (N and P) concentrations in mycelium were high (higher than in the highest quality treatment of Danger et al., 2013). Despite this, growth rates in the ALH treatment remained low (i.e. not significantly different from zero), suggesting that high nutrient levels alone were not sufficient to alleviate the low digestibility/toxicity of fungal mycelium.

One of the most interesting results of this study concerns the positive effect of the presence of diatoms in the diet on *G. fossarum* growth. Even when receiving only 10% of C from diatoms (ALHD treatment), gammarids exhibited significantly positive growth rates. This treatment led to similar observations than the treatment with just diatoms (AD). In the latter treatment, gammarids consumed food at half the rate of the ALHD treatment, indicating that consumption of diatoms alone led to a higher resource use efficiency than feeding with the ALHD mixture. The initial explanation for this result relies on the fact that diatoms are easier to assimilate than detritus. Digesting highly refractory detritus requires specific biological attributes that can be found more or less developed in detritivores (e.g. gut size and morphological complexity, presence and density of specialised microorganisms, and digestive enzymes; Cummins & Klug,

1979; Bärlocher, 1982). The presence of easy to assimilate resources such as benthic algae might therefore permit detritivores to improve their growth. Another aspect of diatom quality concerns its nutrient content. Detritivores can be limited by the nutrient content of food resources (e.g. Danger et al., 2013; Fuller, Evans-White, & Entekin, 2015). In our experiment, there was a large N and P content in diatoms compared to leaf litter. This nutrient content could have stimulated both the growth and survival of the test animals. Additionally, among the three tested resources, diatom-pellets were the only resource with large amounts of LC-PUFAs (i.e. 20:5 $\omega$ 3 and 22:6 $\omega$ 3). Even, if little is known about the fatty acid requirements for gammarids, *Gammarus* spp., like other invertebrates, have PUFA requirements that must be met through their diet, because no evidence for their *de novo* synthesis has been found (Nelson, 2011). Moreover, studies which have investigated gammarids in the wild have reported that their lipid composition is characterised by large amounts of LC-PUFAs, making gammarids a suitable food for fish (Kolanowski, Stolyhwo, & Grabowski, 2007; Makhutova, Kalachova, & Gladyshev, 2003). Similarly, in our study, juveniles originating from a forested stream contained high levels of LC-PUFAs, although their presumed diet (leaf litter and aquatic hyphomycetes) lacked such compounds. This contrast between the lipid composition of field-collected gammarids and of their most available food sources reinforces the physiological importance of LC-PUFAs for gammarids. Aquatic hyphomycetes contain high amounts of  $\alpha$ -linolenic acid (18:3 $\omega$ 3), which could serve as precursor of LC-PUFAs for detritivores (Arce-Funck et al., 2015). Although invertebrates and freshwater fish have been shown to be able to bioconvert dietary 18:3 $\omega$ 3 into 20:5 $\omega$ 3, such bioconversion capacities are likely to be too weak to fully compensate for a PUFA limitation (Bec, Desvillettes, Véra, Fontvieille, & Bourdier, 2003; Guo et al., 2016; Torres-Ruiz et al., 2010). Little is known about the bioconversion capacities of gammarids, but our results clearly indicate that they are probably limited because the LC-PUFA levels of experimental animals feeding on diets lacking such compounds decreased in contrast to gammarids fed diatoms. This result also suggest that previous laboratory studies that showed that microbially conditioned leaf litter alone might ensure detritivorous invertebrates growth (Reviewed in Bärlocher & Sridhar, 2014) could be context dependent, this effect being potentially transitory, until the consumers have totally depleted their PUFA stocks.

It is also quite important to note that even when diatoms were offered in low proportions (10% of the diet), gammarids could maintain high levels of LC-PUFAs, suggesting that a low contribution of high-quality food to the diet allows them to overcome PUFA limitations. Interestingly, the majority of field-collected *G. fossarum* sampled in the same forested headwater stream contained small amounts of diatoms in their gut contents (<3% of all items found in gammarids foreguts). The relative abundance of diatoms was systematically higher in small individuals, but these algae were still present in the gut of adults. All these results strongly suggest the likely important role of benthic algae for detritivores.

In lacustrine systems, (McMeans, Koussoroplis, Arts, & Kainz, 2015) demonstrated that allochthonous matter supported the

growth and reproduction of the cladoceran *Daphnia magna* when algae were not sufficiently abundant in comparison with herbivore requirements. This also means that a low proportion of a high-quality food (in this case, algae) permits a metazoan consumer to develop even in a system where the most available food (in this case, allochthonous leaf litter) is of a low quality. Thus, we suggest that minor food sources of high quality, such as benthic diatoms in detritus-based food webs, may play a far more important role for secondary production than generally expected.

## 5 | CONCLUSION

Without considering the generally poor quality of detritus, most studies dealing with the functioning of detritus-based headwater streams have focused on the fate of leaf litter, that is, the main energy source. Allochthonous material in the form of autumn-shed leaves constitute, by far, the largest C source for forested headwater stream food webs (Vannote et al., 1980). Despite the much reduced autochthonous primary production in forested headwater streams, with 99% of the total energy flow coming from allochthonous sources, according to Fisher and Likens (1973), benthic algae might still represent a minor, but essential resource, ensuring, or at least greatly improving, secondary production in these ecosystems. Similar consideration should be given to other ecosystems, where attention has been mainly directed towards the dominant energy sources. Stable isotope mixing models have been widely used to highlight the main C sources in diets, but such models often neglect minor food sources. This could be a particularly relevant issue since Koussoroplis et al. (2010) showed that minor food sources of high quality could remain undetected by bulk isotope analyses. We, therefore, conclude that a better understanding of the role of minor food sources is clearly needed.

## ACKNOWLEDGMENTS

This project was partly funded by the ICARE EC2CO program to MD, the ANR Functional Stream (ANR-14-CE01-0009-01) and the ANR Multistress (ANR-13-BSV7-0004-01). We greatly thank International Science Editing for improving the English language, Johan Bauer, Evelyne Arce for their technical support and two anonymous reviewers for their constructive comments that greatly improved the accuracy and the clarity of the manuscript.

## REFERENCES

- Arce-Funck, J., Bec, A., Perrière, F., Felten, V., & Danger, M. (2015). Aquatic hyphomycetes: A potential source of polyunsaturated fatty acids in detritus-based stream food webs. *Fungal Ecology*, 13, 205–210.
- Aruffi, T. L., & Suberkropp, K. (1989). Selective feeding by shredders on leaf-colonizing stream fungi: Comparison of macroinvertebrate taxa. *Oecologia*, 79, 30–37.
- Arts, M. T., Brett, M. T., & Kainz, M. J. eds. (2009). *Lipids in aquatic ecosystems*. New York, NY: Springer New York.

- Bärlocher, F. (1982). The contribution of fungal enzymes to the digestion of leaves by *Gammarus fossarum* Koch (Amphipoda). *Oecologia*, 52, 1–4.
- Bärlocher, F. (1985). The role of fungi in the nutrition of stream invertebrates. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 91, 83–94.
- Bärlocher, F., & Kendrick, B. (1973). Fungi in the diet of *Gammarus pseudolimnaeus*. *Oikos*, 24, 295–300.
- Bärlocher, F., & Kendrick, B. (1975). Assimilation efficiency of *Gammarus pseudolimnaeus* (Amphipoda) feeding on fungal mycelium or autumn-shed leaves. *Oikos*, 26, 55.
- Bärlocher, F. & Sridhar K. R. (2014) Ch.19-Association of animals and fungi in leaf decomposition. In E. B. G. Jones, K. D. Hyde & K.-L. Pang (Eds.), *Freshwater fungi and fungus-like organisms*, National Taiwan Ocean University (pp. 413–441. Keelung, Taiwan (R.O.C.): De Gruyter.
- Bec, A., Desvillettes, C., Véra, A., Fontvieille, D., & Bourdier, G. (2003). Nutritional value of different food sources for the benthic Daphnidae *Semicepaganus vetulus*: Role of fatty acids. *Archiv für Hydrobiologie*, 156, 145–163.
- Bec, A., Martin-Creuzburg, D., & von Elert, E. (2006). Trophic upgrading of autotrophic picoplankton by the heterotrophic nanoflagellate *Paraphysomonas* sp. *Limnology and Oceanography*, 51, 1699–1797.
- Brett, M. T., & Müller-Navarra, D. C. (1997). The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic foodweb processes. *Freshwater Biology*, 38, 483–499.
- Canhoto, C., & Graça, M. A. S. (2008). Interactions between fungi and stream invertebrates: Back to the future. In K. R. Sridhar, F. Bärlocher, & K. D. Hyde (Eds.), *Novel techniques and ideas in mycology, fungal diversity research series, fungal diversity press* (pp. 305–325). Yunnan, China: Kunming University of Science and Technology.
- Cargill, A. S. II, Cummins, K. W., Hanson, B. J., & Lowry, R. R. (1985). The role of lipids, fungi, and temperature in the nutrition of a shredder caddisfly, *Clistoronia magnifica*. *Freshwater Invertebrate Biology*, 4, 64–78.
- Chamberlain, P. M., & Black, H. I. J. (2005). Fatty acid compositions of Collembola: Unusually high proportions of C20 polyunsaturated fatty acids in a terrestrial invertebrate. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 140, 299–307.
- Clivot, H., Cornut, J., Chauvet, E., Elger, A., Poupin, P., Guérol, F. A., & Pagnout, C. (2014). Leaf-associated fungal diversity in acidified streams: Insights from combining traditional and molecular approaches. *Environmental Microbiology*, 16, 2145–2156.
- Crawley, M. J. (1997) Plant-herbivore dynamics. In M. J. Crawley (Ed.), *Plant ecology* (pp. 401–474). Oxford, UK: Blackwell.
- Cummins, K. W., Coffman, W. P., & Roff, P. A. (1966). Trophic relations in a small woodland stream. *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, 16, 627–638.
- Cummins, K. W., & Klug, M. J. (1979). Feeding ecology of stream invertebrates. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 10, 147–172.
- Danger, M., Arce Funck, J., Devin, S., Heberle, J., & Felten, V. (2013). Phosphorus content in detritus controls life-history traits of a detritivore. *Functional Ecology*, 27, 807–815.
- Danger, M., Cornut, J., Elger, A., & Chauvet, E. (2012). Effects of burial on leaf litter quality, microbial conditioning and palatability to three shredder taxa. *Freshwater Biology*, 57, 1017–1030.
- Dray, S., & Dufour, A.-B. (2007). The ade4 package: Implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software*, 22, 1–20.
- Felten, V., Tixier, G., Guérol, F. A., De Crespin, D. B., & Dangles, O. J. (2008). Quantification of diet variability in a stream amphipod: Implications for ecosystem functioning. *Fundamental and Applied Limnology/Archiv für Hydrobiologie*, 170, 303–313.
- Ferlian, O., Scheu, S., & Pollierer, M. M. (2012). Trophic interactions in centipedes (Chilopoda, Myriapoda) as indicated by fatty acid patterns: Variations with life stage, forest age and season. *Soil Biology and Biochemistry*, 52, 33–42.
- Field, C. B., Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T., & Falkowski, P. (1998). Primary production of the biosphere: Integrating terrestrial and oceanic components. *Science*, 281, 237–240.
- Fisher, S. G., & Likens, G. E. (1973). Energy flow in Bear Brook, New Hampshire: An integrative approach to stream ecosystem metabolism. *Ecological Monographs*, 43, 421–439.
- Flores, L., Larrañaga, S., & Elosegi, A. (2014). Compensatory feeding of a stream detritivore alleviates the effects of poor food quality when enough food supplied. *Freshwater Science*, 33, 134–141.
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, H. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497–509.
- Frost, P. C., Benstead, J. P., Cross, W. F., Hillebrand, H., Larson, J. H., Xenopoulos, M. A., & Yoshida, T. (2006). Threshold elemental ratios of carbon and phosphorus in aquatic consumers. *Ecology Letters*, 9, 774–779.
- Fuller, C. L., Evans-White, M. A., & Entrekin, S. A. (2015). Growth and stoichiometry of a common aquatic detritivore respond to changes in resource stoichiometry. *Oecologia*, 177, 837–848.
- Gessner, M. O., & Chauvet, E. (1994). Importance of stream microfungi in controlling breakdown rates of leaf litter. *Ecology*, 75, 1807–1817.
- Graça, M. A. S., Maltby, L., & Calow, P. (1993a). Importance of fungi in the diet of *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus*. I: Feeding strategies. *Oecologia*, 93, 139–144.
- Graça, M. A. S., Maltby, L., & Calow, P. (1993b). Importance of fungi in the diet of *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus*. II: Effects on growth, reproduction and physiology. *Oecologia*, 96, 304–309.
- Guo, F., Kainz, M. J., Sheldon, F., & Bunn, S. E. (2016). The importance of high-quality algal food sources in stream food webs – current status and future perspectives. *Freshwater Biology*, 61, 815–831.
- Hayden, B., McWilliam-Hughes, S. M., & Cunjak, R. A. (2016). Evidence for limited trophic transfer of allochthonous energy in temperate river food webs. *Freshwater Science*, 35, 544–558.
- Kilham, S. S., Kreeger, D. A., Lynn, S. G., Goulden, C. E., & Herrera, L. (1998). COMBO: A defined freshwater culture medium for algae and zooplankton. *Hydrobiologia*, 377, 147–159.
- Kolanowski, W., Stolyhwo, A., & Grabowski, M. (2007). Fatty acid composition of selected fresh water gammarids (Amphipoda, Crustacea): A potentially innovative source of omega-3 LC PUFA. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84, 827–833.
- Koussoroplis, A., Bec, A., Perga, M., Koutrakis, E., Desvillettes, C., & Bourdier, G. (2010). Nutritional importance of minor dietary sources for leaping grey mullet *Liza saliens* (Mugilidae) during settlement: Insights from fatty acid  $\delta^{13}C$  analysis. *Marine Ecology Progress Series*, 404, 207–217.
- Krauss, G.-J., Solé, M., Krauss, G., Schlosser, D., Wesenberg, D., & Bärlocher, F. (2011). Fungi in freshwaters: Ecology, physiology and biochemical potential. *FEMS Microbiology Reviews*, 35, 620–651.
- Lauridsen, R. B., Edwards, F. K., Cross, W. F., Woodward, G., Hildrew, A. G., & Jones, J. I. (2014). Consequences of inferring diet from feeding guilds when estimating and interpreting consumer-resource stoichiometry. *Freshwater Biology*, 59, 1497–1508.
- Lindeman, R. L. (1942). The trophic-dynamic aspect of ecology. *Ecology*, 23, 399–417.
- Makhotova, O. N., Kalachova, G. S., & Gladyshev, M. I. (2003). A comparison of the fatty acid composition of *Gammarus lacustris* and its food sources from a freshwater reservoir, Bugach, and the saline Lake Shira in Siberia, Russia. *Aquatic Ecology*, 37, 159–167.
- Martin-Creuzburg, D., & von Elert, E. (2009). Good food versus bad food: The role of sterols and polyunsaturated fatty acids in determining growth and reproduction of *Daphnia magna*. *Aquatic Ecology*, 43, 943–950.
- Martinson, H. M., Schneider, K., Gilbert, J., Hines, J. E., Hambäck, P. A., & Fagan, W. F. (2008). Detritivory: Stoichiometry of a neglected trophic level. *Ecological Research*, 23, 487–491.

- Masclaux, H., Bec, A., Kainz, M. J., Desvillettes, C., Jouve, L., & Bourdier, G. (2009). Combined effects of food quality and temperature on somatic growth and reproduction of two freshwater cladocerans. *Limnology and Oceanography*, *54*, 1323–1332.
- McMeans, B. C., Koussoroplis, A.-M., Arts, M. T., & Kainz, M. J. (2015). Terrestrial dissolved organic matter supports growth and reproduction of *Daphnia magna* when algae are limiting. *Journal of Plankton Research*, *37*, 1201–1209.
- Meyer, J. L., Strayer, D. L., Wallace, J. B., Eggert, S. L., Helfman, G. S., & Leonard, N. E. (2007). The contribution of headwater streams to biodiversity in river networks. *JAWRA Journal of the American Water Resources Association*, *43*, 86–103.
- Moore, J. C., Berlow, E. L., Coleman, D. C., Ruiter, P. C., Dong, Q., Hastings, A., ... Wall, D. H. (2004). Detritus, trophic dynamics and biodiversity: Detritus, trophic dynamics and biodiversity. *Ecology Letters*, *7*, 584–600.
- Müller-Navarra, D. C. (1995). Biochemical versus mineral limitation in *Daphnia*. *Limnology and Oceanography*, *40*, 1209–1214.
- Müller-Navarra, D. C., Brett, M. T., Liston, A. M., & Goldman, C. R. (2000). A highly unsaturated fatty acid predicts carbon transfer between primary producers and consumers. *Nature*, *403*, 74–77.
- Nelson, D. (2011). *Gammarus*-microbial interactions: A review. *International Journal of Zoology*, *2011*, 1–6.
- Odum, H. T. (1956). Primary production in flowing waters. *Limnology and Oceanography*, *1*, 102–117.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., ... & Oksanen, M. J., (2013). Package 'vegan'. Community ecology package, version, 2(9).
- Polis, G. A., & Strong, D. R. (1996). Food web complexity and community dynamics. *The American Naturalist*, *147*, 813–846.
- R Development Core Team. (2015) *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Salunke, D., Mangalekar, R., Kuvalekar, A., & Harsulkar, A. (2014). Bioconversion of alpha-linolenic acid into long chain polyunsaturated Fatty acids by oleaginous fungi. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, *5*, 27–35.
- Schaefer, M. (1991). The animal community: Diversity and resources. In E. Rohrig & B. Ulrich (Eds.), *Temperate deciduous forests. Ecosystems of the World 7* (pp. 51–120). Amsterdam: Elsevier.
- Schlechtriem, C., Arts, M. T., & Zellmer, I. D. (2006). Effect of temperature on the fatty acid composition and temporal trajectories of fatty acids in fast-ing *Daphnia pulex* (Crustacea, Cladocera). *Lipids*, *41*, 397–400.
- Smits, A. P., Schindler, D. E., & Brett, M. T. (2015). Geomorphology controls the trophic base of stream food webs in a boreal watershed. *Ecology*, *96*, 1775–1782.
- Torres-Ruiz, M., & Wehr, J. D. (2010). Changes in the nutritional quality of decaying leaf litter in a stream based on fatty acid content. *Hydrobiologia*, *651*, 265–278.
- Torres-Ruiz, M., Wehr, J. D., & Perrone, A. A. (2007). Trophic relations in a stream food web: Importance of fatty acids for macroinvertebrate consumers. *Journal of the North American Benthological Society*, *26*, 509–522.
- Torres-Ruiz, M., Wehr, J. D., & Perrone, A. A. (2010). Are net-spinning caddisflies what they eat? An investigation using controlled diets and fatty acids. *Journal of the North American Benthological Society*, *29*, 803–813.
- Van Dyk, M. S., Kock, J. L. F., & Botha, A. (1994). Hydroxy long-chain fatty acids in fungi. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *10*, 495–504.
- Vannote, R. L., Minshall, G. W., Cummins, K. W., Sedell, J. R., & Cushing, C. E. (1980). The river continuum concept. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *37*, 130–137.
- Wallace, J. B., Eggert, S. L., Meyer, J. L., & Webster, J. R. (1999). Effects of resource limitation on a detrital-based ecosystem. *Ecological Monographs*, *69*, 409–442.
- Wallis, J. G., Watts, J. L., & Browse, J. (2002). Polyunsaturated fatty acids synthesis: What will they think of next? *Trends in Biochemical Sciences*, *27*, 467–473.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

**How to cite this article:** Crenier C, Arce-Funck J, Bec A, et al. Minor food sources can play a major role in secondary production in detritus-based ecosystems. *Freshwater Biol.* 2017;00:1–13. <https://doi.org/10.1111/fwb.12933>

**CHAPITRE IV :**

Synthèse des résultats et Perspectives.



Les objectifs principaux de nos travaux étaient d'évaluer les variations de qualité des ressources basales des cours d'eau de tête de bassin versant, ainsi que leurs impacts sur les processus fonctionnels et la production secondaire. Ces travaux s'intègrent aux questionnements scientifiques relatifs à la compréhension du fonctionnement, au suivi de la qualité des masses d'eaux continentales ainsi qu'à leur conservation ([Parlement et Conseil Européen, 2000](#) ; [Millennium Ecosystem Assessment, 2005 a b](#)). La caractérisation de la qualité des ressources basales a été abordée via des mesures de la composition élémentaire des ressources ainsi qu'aux travers de quantification des biofilms phototrophes (à dominance algale) et d'analyses de leurs profils d'acides gras. Les processus ayant été suivis au cours de cette thèse concernaient la production de biomasse de biofilm, la décomposition des litières, ainsi que des mesures des taux de croissance de consommateurs invertébrés (ces derniers servants de proxy pour évaluer l'impact de la qualité des ressources sur la production secondaire). Nous aspirions ainsi à évaluer la nature des facteurs limitant les processus fonctionnels au sein des cours d'eau de tête de bassin versant. Cette évaluation pouvant nous permettre de repenser l'importance de la diversité des ressources basales dans ces écosystèmes, ayant très longtemps été considérée comme ne reposant que sur l'incorporation de matière détritique allochtone pour leur fonctionnement.

Plus précisément, ce travail s'est découpé en deux parties principales. Nous avons tout d'abord tenté d'évaluer l'importance de la disponibilité en nutriments dissous (nitrates et phosphates) sur le devenir de la matière organique détritique particulaire. Pour ce faire, nous avons étudiés *in situ*, le long d'un gradient d'utilisation agricole des sols, l'impact de la disponibilité en nutriments sur les processus de décomposition des litières allochtones, ainsi que les activités enzymatiques microbiennes associées. Le suivi du même processus de décomposition des litières a ensuite été utilisé pour évaluer l'impact d'une récupération progressive du fonctionnement de cours d'eau Vosgiens ayant été soumis à de forts dépôts acides, cette récupération de l'acidification se traduisant également par une réduction conséquente des disponibilités en nitrates. Dans la seconde partie de ce chapitre, notre intérêt s'est porté sur l'importance de la production primaire autochtone dans le fonctionnement des cours d'eau de tête de bassin versant. Pour ce faire, nous avons tout d'abord observé et quantifié *in situ* la production de biofilms phototrophes le long du gradient d'acidification cité ci-dessus, en pointant du doigt notamment les apports potentiels en acides gras essentiels que pourraient constituer ces biofilms, puis nous avons testé en laboratoire l'impact de l'ingestion de producteurs primaires sur la croissance d'un consommateur invertébré, nous permettant ainsi de réfléchir de manière plus générale à l'importance de ces biofilms sur la production secondaire des cours d'eau de tête de bassin versant.

## **I. Nutriments et qualité stœchiométrique**

Nos questionnements nous ont amené à observer les disponibilités de nutriments dans deux contextes de cours d'eau de tête de bassin versant : des ruisseaux du massif Vosgien, correspondant à des ruisseaux forestiers éloignés de la plupart des activités agricoles ou industrielles, et dont la physico-chimie a été régulièrement suivie depuis de nombreuses années, et des cours d'eau de tête de bassin versant de plaine, sélectionnés le long d'un gradient d'utilisation du sol, permettant ainsi d'observer des patrons de réponses plus généraux en sortant du contexte strictement forestier.

### **I.1. Réponses à l'acidification**

Durant notre étude diachronique (1998-99 et 2014-15) sur des cours d'eau de têtes de bassins versants forestiers Vosgiens, précédemment étudiés par [Dangles \*et al.\* \(2004\)](#), nous avons pu constater une récupération des paramètres physico-chimiques des eaux des cours d'eau ayant été soumis aux phénomènes d'acidification intenses des années 1970-1980. En particulier, une augmentation générale du pH et de l'ANC des cours d'eau (augmentations de 0,35 unités pH et de 52  $\mu\text{eq.L}^{-1}$ , respectivement). Néanmoins, les sites présentent toujours un gradient d'acidification nous indiquant que la récupération des sites acidifiés en 1998-99 est en cours, mais reste loin d'être aboutie. Cette vision est supportée par les résultats observés sur la décomposition de litières qui présente une amélioration globale à l'échelle du massif, mais n'est significative que pour les sites qui étaient déjà acides en 1998-99. Toutefois, les taux de décomposition sont toujours inférieurs à ceux observés dans les cours d'eaux non-acidifiés et l'on retrouve les mêmes corrélations entre paramètres physico-chimiques et taux de décomposition entre 1998-99 et 2014-15.

Cette augmentation du pH s'accompagne d'une diminution des concentrations en aluminium qui représente, dans les systèmes acidifiés, l'un des principaux facteurs de toxicité pour le vivant ainsi que celui responsable pour grande partie du blocage du cycle du phosphore dans le milieu aquatique ([Clivot \*et al.\*, 2014 a](#)). On observe également, en parallèle des réductions d'émission de  $\text{NO}_x$  et  $\text{SO}_2$  liées aux politiques internationales et européennes (le « Clean Air Act » et la « Convention on Long Range Transboundary Air Pollution »), une diminution des concentrations dans les eaux de surfaces du  $\text{NO}_3^-$  et du  $\text{SO}_4^{2-}$ . Ces variations de physico-chimie des eaux laissent penser que les cours d'eau devraient à terme être carencés en azote. Le déblocage progressif du cycle du phosphore lié à la diminution des concentrations en Aluminium devrait *in fine* faire diminuer drastiquement les ratios N/P dissous dans les cours d'eau vosgiens, induisant à terme des risques de limitations en N accrues. Au vu de nos résultats, il ne semble pas que l'azote soit devenu un facteur limitant de la décomposition des litières dans ces

systèmes, mais ce sont plutôt l'augmentation du pH et la diminution des concentrations en Al qui semblent stimuler les taux de décomposition dans nos cours d'eau en récupération. Des suivis à plus long terme seront néanmoins nécessaires pour observer ces phénomènes.

## **I.2. Réponses à l'occupation du sol**

Pour observer la réponse des processus fonctionnels hors contexte forestier, nous avons sélectionné une trentaine de bassins versants Lorrains, représentant un gradient d'occupation du sol (activité agricole). Ce dernier s'est avéré être fortement corrélé à un gradient de disponibilité en nitrates, et, dans une moindre mesure, en phosphate. Les deux gradients n'étant pas parfaitement corrélés, l'étude des 27 sites retenus nous ont permis d'étudier la réponse des taux de décomposition et des activités enzymatiques microbiennes à ces deux gradients de nutriments.

Les taux de décomposition ont répondu positivement et de manière significative à l'augmentation de  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{PO}_4^{3-}$ , probablement en réponse à une stimulation des activités enzymatiques récupératrices du C (BG et CBH), activités qui ont toutes deux répondu de la même manière au gradient. Cependant, seule l'activité BG s'est avérée être corrélée positivement à une augmentation des taux de décomposition de la litière, reliant directement l'augmentation des concentrations en  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  dans les eaux de surface aux activités récupératrices de C par les microorganismes.

L'activité récupératrice d'azote (NAG) s'est avérée être également positivement corrélée à une augmentation des concentrations en  $\text{PO}_4^{3-}$  dans les eaux de surfaces, ce qui pourrait partiellement expliquer la corrélation entre le gradient de  $\text{PO}_4^{3-}$  et l'augmentation du pourcentage de N dans les litières. Pour expliquer l'augmentation des pourcentages en P dans les litières sans observer une réponse de l'AP, nous pensons que les processus d'immobilisation des phosphates présents dans la colonne d'eau dans la biomasse microbienne, notamment fongique ([Danger et al., 2016](#)), ont permis aux microorganismes de satisfaire leurs besoins en P sans avoir recours à la production intensive d'enzymes dédiées à la dégradation des molécules organiques phosphorées.

Tous ces résultats nous permettent d'observer ce qu'il semblerait être une relation saturante entre le P et les processus de décomposition, moins observée avec le N. Nous observons que le  $\text{NO}_3^-$  et le  $\text{PO}_4^{3-}$  accélèrent tous deux le processus de décomposition de la litière par le biais de l'augmentation des activités enzymatiques récupératrices de C et N, avec un plus grand nombre de relation avec le P qu'avec le N. Néanmoins, même si l'on observe une

dissociation des deux gradients, il nous semble probable que le découplage observé entre les deux gradients ne soit pas assez franc et ne nous permette pas clairement de mettre en évidence la prédominance d'un paramètre sur l'autre avec le jeu de données obtenu. Une prochaine étape pour faire une distinction claire entre l'influence de ces deux gradients serait de trouver *in situ* des cours d'eau avec des gradients bien plus distincts et/ou de manipuler les gradients expérimentalement en mésocosme (voir microcosme) avec des concentrations variées en N et/ou P, obtenant ainsi des gradients N/P plus marqués.

### **I.3. Vers une meilleure compréhension des limitations minérales dans les cours d'eau.**

#### **I.3.a. Les cours d'eau de tête de bassin versant sont-ils limités par le N ou le P ?**

Depuis de nombreuses années, la question de la nature des limitations minérales dans les cours d'eau de tête de bassin versant a été posée. Des études anciennes menées sur les milieux non impactés par les activités anthropiques (écosystèmes dits « pristine ») en Amérique du Nord ont à plusieurs reprises démontré des limitations par l'azote (par exemple, [Lohman, Jones & Baysinger-Daniel, 1991](#) ; [Tank & Dodds, 2003](#)). Ces limitations apparaissent logiques dans ce genre de milieux continuellement lessivé, les apports d'azote dans les écosystèmes étant principalement de nature biogénique, l'azote étant (hors activités anthropiques) principalement fixé par les microorganismes diazotrophes et étant absent des roches mères ([Vitousek & Farrington, 1997](#)). De plus rares travaux ont pu mettre en évidence des cas de limitation par le phosphore en milieu lotique ([Klotz, 1985](#) ; [Elser \*et al.\*, 2007](#)). Dans le cas des cours d'eau ayant été soumis aux processus d'acidification et, conséquemment, à l'augmentation des concentrations en aluminium, plusieurs travaux ont démontré un blocage du cycle du phosphore, ce dernier se complexant de manière forte et difficilement réversible à l'aluminium (par exemple, [Simon \*et al.\*, 2009](#) ; [Clivot \*et al.\*, 2013, 2014 a](#)). Ces travaux ont ainsi mis en évidence à plusieurs reprises des limitations fortes en P des processus de décomposition des litières dans les cours d'eau acidifiés. Ces limitations étaient notamment visibles au travers de l'augmentation très conséquente des ratios écoenzymatiques AP/CBH pour les pH les plus faibles, ces ratios constituant des indicateurs pertinents de ce genre de limitation ([Clivot \*et al.\*, 2013](#)). Dans notre étude, malgré des réductions conséquentes en nitrates liées à l'arrêt des dépôts azotés acidifiants, l'augmentation récente de pH s'est traduite par une reprise de la décomposition des litières, ce qui laisse penser que l'azote n'est clairement pas encore devenu limitant pour ce processus fonctionnel. De la même manière, les ratios C/P mesurés sur les biofilms épilithiques le long du gradient d'acidification (C/P le plus élevé pour les valeurs de pH les plus faibles)

montrent bien que le P reste un élément peu biodisponible dans les cours d'eau les plus acidifiés. Il semble donc qu'à ce jour, la limitation des processus fonctionnels par le P dans les cours d'eau acidifiés reste de mise. Comme précisé précédemment, des changements de facteurs limitants pourraient néanmoins s'opérer si la chute de disponibilité en nitrates se poursuit.

Dans les cours d'eau de plaine, en revanche, aucune tendance claire de limitation par un seul élément n'a pu être mise en évidence. En effet, tant les disponibilités en N qu'en P semblent stimuler le processus de décomposition des litières, et ce de manière monotone (bien qu'une saturation semble apparaître pour le P à partir d'un certain seuil). Les activités écoenzymatiques, notamment les activités AP et NAG, qui semblaient être de prometteurs indicateurs de la nature des éléments limitants de la décomposition des litières, se sont avérés très peu impactés par les gradients de N et P disponibles dans les eaux. L'explication la plus probable de ces différentes observations repose certainement sur le fait que les communautés microbiennes sont totalement non-homéostatiques au niveau de leur composition élémentaire. En effet, les champignons aquatiques sont extrêmement plastiques au niveau de leurs besoins en éléments chimiques (C, N et P ; [Danger & Chauvet, 2013](#) ; [Grimmett \*et al.\*, 2013](#)), et constituent même certainement le groupe le plus variable au niveau de leur composition élémentaire ([Danger \*et al.\*, 2016](#)). La variabilité de la composition élémentaire des bactéries est beaucoup plus discutée actuellement, certains auteurs décrivant des souches homéostatiques ([Danger \*et al.\*, 2008](#)), d'autres des souches beaucoup plus plastiques ([Godwin & Cotner, 2015](#)). Néanmoins, les communautés de bactéries sont sélectionnées par la disponibilité des ressources dont ils disposent, et voient leur composition élémentaire mesurée à l'échelle de la communauté se conformer à la composition des ressources à leur disposition ([Danger \*et al.\*, 2008](#) ; [Fanin \*et al.\*, 2013](#)). Il est ainsi assez envisageable que les communautés microbiennes en jeu dans la décomposition des litières ne soient limitées dans leur croissance et leurs activités par un et un seul élément que dans des cas extrêmes de carence en un élément particulier, comme le P dans le cas des cours d'eau acidifiés ou l'N dans les cours d'eau « pristine » (dont la seule source d'azote repose sur la fixation biologique). La plupart des communautés microbiennes devraient ainsi tendre à optimiser leur utilisation des ressources, faisant tendre le système vers une co-limitation systématique par N et P. Ceci est d'ailleurs corroboré par les résultats de la méta-analyse récente de ([Ferreira \*et al.\*, 2016 b](#)) qui observent, au travers de la mise en commun de nombreuses données d'enrichissement expérimental, une co-limitation par N et P de la décomposition des litières (stimulation par ajout de N et P conjointement).

Ces résultats apparaissent importants à plusieurs niveaux. Tout d'abord, les augmentations de N ou de P dans les écosystèmes, phénomènes de plus en plus courants dans les systèmes anthropisés, devraient stimuler de manière équivalente la décomposition des litières par les microorganismes. Ainsi, une pollution par l'un des deux éléments que sont l'N et le P devraient

stimuler la décomposition, le système devant toujours tendre vers une optimisation de l'utilisation des ressources à disposition. Cela va dans le sens opposé à ce que laisserait penser la simple extrapolation de la loi de Liebig (voir [Danger et al., 2008](#)), à savoir que réduire la disponibilité d'un seul élément ne permettra pas de réduire l'intensité des processus. Dans un cadre opérationnel, cela suggère que le seul moyen de réduire les impacts de l'eutrophisation dans les cours d'eau de tête de bassin versant serait de réduire à la fois le N et le P, et que cibler seulement un des deux éléments ne devrait avoir qu'un impact réduit voir aucun impact. La deuxième conclusion que l'on peut tirer de ces résultats est que l'utilisation des ratios écoenzymatiques pour évaluer la nature et l'intensité des limitations minérales semble n'être possible que dans le cas des carences extrêmes en N et/ou en P, en tous cas pour des concentrations qui sont situés en dessous des seuils minimaux de besoins en N et P des microorganismes. Ceci serait cohérent avec les résultats de ratios écoenzymatiques très variables de [Clivot et al. \(2013\)](#) dans les cas de carence extrême en P, mais aussi conciliable avec les résultats de [Sinsabaugh et al. \(2004\)](#) qui montrent à l'échelle d'une méta-analyse un couplage presque parfait (relation linéaire 1:1) entre les différentes activités des enzymes récupératrices du N et du P, ce qui apparaît alors cohérent si les communautés sont co-limitées par le N et le P.

### **I.3.b. Cas des excès de N et/ou de P**

Un autre résultat intéressant de ce chapitre de ma thèse concerne l'absence d'effet néfaste des très hautes valeurs de N et de P dans la colonne d'eau sur la décomposition microbienne des litières. Les niveaux de N et de P sont du même ordre de grandeur, voire légèrement supérieurs à ceux relevés dans l'étude de [Woodward et al. \(2012\)](#). Dans cette dernière, les auteurs ont pu mettre en évidence une relation unimodale entre les niveaux de N et de P et la décomposition des litières. Néanmoins, il s'agissait de décomposition de litières dans des sacs grosse maille, incluant donc l'activité des invertébrés. Nous pouvons donc conclure de leurs travaux et des résultats du chapitre 1 que les processus assurés par les macroinvertébrés sont beaucoup moins résistants aux pollutions anthropiques que les processus microbiens et que la réduction de la décomposition des litières dans les cours d'eau les plus riches en nutriments tient plus à une perte des invertébrés décheteteurs plutôt qu'à une réduction de la colonisation et du conditionnement microbien des litières. Ceci est d'autant plus intéressant que les apports de nutriments vont souvent de pair avec des apports de contaminants chimiques (métaux toxiques ou pesticides, par exemple : [Skei et al., 2000](#)). Bien que n'ayant malheureusement pas pu les quantifier dans notre étude, les niveaux de contaminants devaient également logiquement suivre le gradient de N et de P, d'autant plus que ces niveaux de nutriments ont pu être associés étroitement à la proportion de surface de sols occupées par des activités agricoles intensives sur les bassins versants considérés. Les relations monotones mises en évidence suggèrent

fortement que ces contaminants chimiques n'ont certainement pas eu d'impact fort sur les microorganismes et leurs activités. Ce résultat paraît assez cohérent avec les résultats de la littérature, la plupart des effets des contaminants métalliques et organiques sur les décomposeurs de litière ayant été montrés principalement *in vitro* avec des expositions peu réalistes (par exemple : [Duarte et al., 2008](#) ; [Feckler et al., 2016](#) ; [Dawoud et al., 2017](#)). Cette grande résistance des processus microbiens sur les litières a notamment été expliquée par le développement des décomposeurs à l'intérieur de la matrice foliaire, qui semble offrir une barrière efficace à l'entrée des contaminants (dont la plupart peuvent s'adsorber à la surface des litières ; [Arce-Funck et al., 2013 b](#)). Ce résultat est totalement en accord avec l'observation de [Brosed et al. \(2016\)](#) qui ont pu montrer que le processus microbien de décomposition des litières était totalement inchangé par les niveaux de pesticides mesurés dans les cours d'eau, par opposition à la décomposition des litières dans les sacs grosse maille, incluant les processus générés par les macroinvertébrés détritvovores. Ces résultats laissent donc penser que l'utilisation de la décomposition microbienne des litières comme indicateur fonctionnel est certainement moins sensible que les suivis de décomposition incluant à la fois les processus microbiens et les processus de consommations par les invertébrés détritvovores.

## **II. Acides gras essentiels et qualité biochimique**

Comme abordé dans l'introduction de ce manuscrit ([Confer](#), Chapitre I), la production primaire des écosystèmes de têtes de bassin versant a depuis longtemps été négligée, ces écosystèmes ayant été surtout considérés comme basés sur la décomposition de la matière organique allochtone pour leur fonctionnement. Il nous semblait important de passer outre ces généralités pour aller observer *in situ* à quel point cette production primaire était réellement négligeable quantitativement et surtout qualitativement pour le fonctionnement des cours d'eau. L'idée était ainsi d'évaluer l'impact qu'une telle ressource pouvait avoir sur des consommateurs considérés comme détritvovores, et donc, *in fine*, sur la production secondaire.

### **II.1. Présence dans les cours d'eau de tête de bassin versant**

Grâce au suivi de colonisation de biofilm sur des plaquettes de plastique disposées dans des cours d'eau vosgiens forestiers, nous avons pu observer *in situ*, malgré la couverture forestière dense, la présence et le développement de biofilms phototrophes. Comme abordé dans la littérature, en comparaison aux apports allochtones, la biomasse de ces biofilms reste effectivement très faible, mais néanmoins présente. Très peu de bilans de production primaire ont été effectués dans les ruisseaux forestiers. Dans la discussion de leur article, [Danger et al.](#),

(2013) ont calculé, en se basant sur les données de Rosenfeld & Roff (1991), que la production annuelle de carbone autochtone dans les ruisseaux du sud de l'Ontario, incluant l'augmentation de biomasse et l'excrétion d'exsudats algaux, représentait 7% des apports annuels de C allochtone. Nos résultats laissent penser que les proportions d'apports de C autochtone dans les cours d'eau de tête de bassin vosgiens par les biofilms phototrophes sont du même ordre de grandeur ( $\approx$  4-5%). Au niveau des compositions algales, les mesures effectuées à la benthotorche semblent indiquer une forte dominance des biofilms par les diatomées. Leur biomasse est variable d'un cours d'eau à l'autre, mais cette dernière ne semble pas dépendre directement du gradient d'acidification.

L'augmentation du pH explique une augmentation significative des pourcentages de N, P et 18 : 3 $\omega$ 3 dans les biofilms, ainsi qu'une réduction des ratios C/P et N/P. Les concentrations croissantes en Al quant à elles, expliquent une diminution significative des pourcentages en N, P, 18 : 3 $\omega$ 3 et des AGPIs ainsi qu'une augmentation du ratio C/P et des AG saturés (AGS, SAFAs dans le texte) dans les biofilms. Ces résultats peuvent s'expliquer, comme dans le cas des décomposeurs microbiens, par une augmentation de l'immobilisation de N et de P par les biofilms le long du gradient de disponibilité en nutriments. Le P étant particulièrement peu biodisponible dans les cours d'eau acidifiés, il apparaît donc logique que les ratios C/P et N/P soient maximisés par des pH bas et des taux d'Aluminium élevés.

Un autre résultat particulièrement intéressant et original concerne la quantification des acides gras polyinsaturés dans les biofilms le long du gradient d'acidification. Les résultats sont encore préliminaires, mais semblent indiquer que les teneurs en acides gras polyinsaturés augmentent avec l'augmentation de pH (et diminuent avec l'augmentation des concentrations en Al) alors que les AGS augmentent le long du gradient d'Al. Les AGPIs étant souvent impliqués dans le développement et la reproduction des invertébrés, il est imaginable que les invertébrés acido-résistants se maintenant dans les cours d'eau acidifiés soient soumis à des ressources de moindre qualité, tant au niveau des litières, peu/mal conditionnées par les microorganismes décomposeurs (Baudoin *et al.*, 2008) et de moindre qualité élémentaire (Clivot *et al.*, 2013, 2014 b), qu'au niveau des biofilms, présentant également des taux de N et P réduits ainsi que des niveaux de AGPIs très faibles (Chapitre 3, Partie 1).

Ce déficit qualitatif à la base des réseaux trophiques des cours d'eau acidifiés pourrait donc jouer un rôle amplificateur des dysfonctionnements engendrés par les baisses de pH et des hausses des concentrations en Aluminium associées à l'acidification des cours d'eau.

## **II.2. Réponse de la production secondaire**

Pour étudier l'impact de ces producteurs primaires présents et potentiellement consommés par des décheteteurs ou brouteurs, nous avons mis en place une expérimentation en laboratoire

visant à proposer à des invertébrés du genre *Gammarus*, pendant près de 5 semaines, plusieurs types de ressources (seules ou en mélange) basées sur ce à quoi les organismes pouvaient être confrontés dans nos ruisseaux : des litières de feuilles (AL), des hyphomycètes aquatiques (AH) et des diatomées (AD) (Crenier *et al.*, 2017).

Nous avons pu observer un plus grand taux de consommation pour les ressources contenant uniquement des feuilles (AL) et celles contenant un mélange des trois ressources proposées (ALHD). Les ressources ALH (feuilles et hyphomycètes aquatiques) ont permis un taux de survie inférieur à celui observé avec les ressources AL, AD et ALHD mais seules les ressources contenant des diatomées (AD, ALHD) ont abouti à une croissance en masse significativement différente de zéro et surtout à un maintien des niveaux de PUFA dans la biomasse des consommateurs tout au long de l'expérimentation.

Des analyses du contenu digestif d'individus prélevés sur sites ont mis en évidence la présence d'algues vertes et de diatomées, ces ressources étant mineures quantitativement (généralement moins de 5% du contenu digestif), mais présentes chez près de 70% des individus pour les organismes de plus petite taille.

Cette étude nous a ainsi permis de mettre en évidence un transfert des acides gras diatomiques chez les déshiqueteurs benthiques et a apporté des éléments déterminants pour affirmer que malgré de faibles quantités, cette ressource de grande qualité pourrait s'avérer essentielle au développement des macroinvertébrés benthiques. Les résultats présentés dans la littérature restent parcellaires, bien que le questionnement soit actuellement en plein essor (Guo *et al.*, 2016 b).

### **II.3. Vers une extrapolation aux transferts vers les niveaux trophiques supérieurs**

Comme abordé précédemment, les gammares sont considérés comme une ressource alimentaire non négligeable pour les prédateurs des cours d'eau de tête de bassin versant dont les poissons (Muus & Dahlstrom, 1968, dans Baudin & Garnier-Laplace, 1994 ; MacNeil, Dick & Elwood, 1999). Dans ses travaux de thèse (puis dans ses publications), Koussoroplis (2010) a mis en évidence l'importance des acides gras dans le développement des juvéniles de poisson (*Liza saliens*). L'acide docosahexaénoïque (DHA, 22 : 6 $\omega$ 3) est un composant majeur des LP de cellules rétiniennes, oculaires et nerveuses des vertébrés (Sargent *et al.*, 1999). Cela en fait donc un élément essentiel pour les larves de poissons téléostéens pour achever la formation de leur système nerveux (incomplet à l'éclosion). Une carence en DHA entraîne des malformations du système nerveux affectant la vision (Sargent *et al.*, 1999) et induisent également des défauts de pigmentations et des défaillances des comportements de prédation (aptitude à former des bancs),

compromettant ainsi la survie des larves en milieu naturel (Bell *et al.*, 1995 ; Bell & Sargent, 1996 ; Masuda & Tsukamoto, 1999 ; Copeman *et al.*, 2002). De plus, certains AG comme l'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20 : 5 $\omega$ 3) et l'acide arachidonique (ARA, 20 : 4 $\omega$ 6) constituent les précurseurs des eicosanoïdes (Prostaglandines, Thromboxanes, Leucotriènes, etc.), une famille de molécules aux fonctions analogues aux hormones (Schmitz & Ecker, 2008). Les prostaglandines dérivées de l'EPA ou de l'ARA sont des régulateurs antagonistes. Chez les vertébrés, on soupçonne le rapport EPA/ARA comme étant impliqué dans le contrôle de la vasoconstriction, la régulation hydrominérale, l'inflammation, l'immunité et le métabolisme énergétique (Olsen, 1998 ; Calder, 2009). Les proportions relatives en AGPI de la nourriture peuvent agir sur la physiologie des poissons. Il a été montré, par exemple, que même lorsqu'une alimentation est suffisamment riche en lipides, un rapport DHA:EPA:ARA inadéquat peut avoir des effets marqués sur l'immunité et la résistance aux stress (Koven *et al.*, 2003 ; Van Anholt *et al.*, 2004 ; Arts & Kohler, 2009). Les exigences précises en acides gras essentiels varient de manière quantitative et qualitative selon les familles de poissons considérées (Sargent *et al.* 1999 a). Les poissons d'eau douce possèdent les désaturases ( $\Delta$ 6 et  $\Delta$ 5) et les élongases permettant la synthèse de la totalité des AGPI des séries  $\omega$ 3 et  $\omega$ 6 à partir des précurseurs 18 : 3 $\omega$ 3 et 18 : 2 $\omega$ 6 (Henderson & Tocher, 1987 ; Sargent *et al.*, 1995). Toutefois, cette synthèse (DHA, EPA, ARA) est coûteuse sur le plan énergétique et il est préférable d'obtenir ces AGs par l'alimentation (Olsen, 1998).

De ce fait et au vu des résultats que nous avons pu observer dans le Chapitre 3, Partie 2 (Crenier *et al.*, 2017), les consommateurs déchiqueteurs et brouteurs ayant accès à une ressource potentiellement riche en AGPIs pourraient devenir une ressource de meilleure qualité, en devenant des vecteurs d'éléments carbonés de très bonne qualité pour les niveaux trophiques supérieurs. Cette potentielle amélioration biochimique de la ressource pourrait éventuellement lever une limitation de la croissance, influencer le développement et le maintien des populations de prédateurs se nourrissant de ces déchiqueteurs et/ou brouteurs benthiques, et affecter ainsi l'ensemble des processus de fonctionnement de ces cours d'eau.

### III. Interactions

Dans les travaux précédents nous avons pu mettre en évidence les influences respectives des différents paramètres de qualité des ressources investigués sur le fonctionnement des écosystèmes de tête de bassin versant. La question suivante va concerner les interactions possibles entre ces paramètres qualitatifs ainsi que l'influence potentielle de facteurs de forçage extérieurs non pris en compte dans nos précédentes études, par exemple via des contaminations métalliques dont le suivi et les études ont été abordées au sein de notre laboratoire du fait de leur

occurrence régulière dans les écosystèmes de tête de bassin versant ([Mersch et al., 1993](#) ; [Arce-Funck et al., 2013 a b](#))

### **III.1. Phosphore, Acides gras et contaminations métalliques**

Afin de tester les contributions relatives des limitations par le P et par les AGPI, nous avons effectué une expérience de croissance chez *Gammarus fossarum* ([Sanchez-Thirion et al.](#) ; Soumission prochaine prévue à Aquatic Toxicology, **Annexe 4**) en proposant divers biofilms à dominance diatomique cultivés le long de deux gradients croisés de disponibilité en P et de contamination en Ag (biofilms issu des travaux de [Leflaive et al., 2015](#)). Ce type d'étude aurait dû nous permettre de tester l'importance relative de la qualité stœchiométrique vis-à-vis de la qualité biochimique (teneurs en AGPIs) des ressources. En effet, dans cette première expérimentation ([Leflaive et al., 2015](#)), l'Ag tout comme la disponibilité en P ont entraîné des modifications significatives dans la composition des communautés des biofilms, changeant fortement les proportions de diatomées et de chlorophycées, la proportion de chlorophycées augmentant fortement suite à des expositions des biofilms aux plus hautes concentrations en P et Ag. Nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse que l'augmentation de P allait augmenter la qualité élémentaire des biofilms (réduction des ratios C/P) tout en réduisant la qualité biochimique – et donc les teneurs en AGPIs - des biofilms, par l'exclusion progressive des diatomées riches en AGPIs à longue chaîne carbonée par des chlorophycées de qualité moindre. Le gradient de P devrait ainsi être inversement relié à un gradient d'AGPI, offrant alors une opportunité de comprendre les rôles respectifs des deux paramètres qualitatifs. Nous avons récupéré les biofilms issus de cette expérience et après lyophilisation, nous les avons réduit en poudre pour les intégrer dans des pastilles d'agar (protocole : [Crenier et al., 2017](#)) en vue de les donner à consommer chaque semaine durant 42 jours à nos invertébrés.

Les concentrations en argent retrouvées dans les biofilms étaient assez élevées (jusqu'à  $350\mu\text{g.g}^{-1}$  pour une exposition à des expositions de cultures Ag150 :  $150\mu\text{g.L}^{-1}$ ) dans les biofilms ou l'exposition à l'Ag avait été la plus élevée mais le P a semblé réduire l'accumulation d'Ag. Les pourcentages en C et N des différents biofilms n'ont pas évolué, peu importe les concentrations d'exposition en Ag ou P. Tous les ratios élémentaires (C/N, C/P et N/P) des biofilms ont par contre présenté une diminution vis-à-vis des concentrations en P d'exposition contrairement à l'Ag qui n'a eu un impact que sur la diminution des ratios C/N et C/P. Aucun effet interactif entre P et Ag n'a été révélée. En ce qui concerne les AG, l'Ag et le P ont induit des modifications des profils en AG (aucune interaction n'a été révélée), mais seule l'augmentation en P (spécialement P20 et P500) s'est avéré réduire les concentrations en AG monoinsaturés des biofilms de 36% et les AGPI de 28% par rapport aux biofilms exposés aux niveaux les plus bas de P.

Les résultats principaux de cette expérience concernent les modifications de la qualité des ressources, tant biochimique qu'élémentaire, par les niveaux de P et l'exposition à l'Ag. Les effets de cette qualité ont pu être démontrés par les mesures de taux de croissance des gammares, ces derniers présentant des taux de croissance accrus lorsqu'ils étaient nourris avec les ressources présentant les ratios C/P les plus faibles. Les AGPI n'ont pas eu d'effet significatif sur la croissance dans cette expérience, mais ces niveaux en AGPI n'ont malheureusement que peu varié entre traitements (différences significatives mais faibles). Cette étude nous laisse penser néanmoins que ce genre de protocole semble adapté à l'étude des effets relatifs et interactifs des paramètres de qualité biochimique et élémentaire, et sera à reconduire en tentant d'augmenter les variations de qualité biochimique, et en intégrant d'autres paramètres d'évaluation des effets sur les consommateurs, les AGPI étant particulièrement connus pour impacter la reproduction des invertébrés (par exemple : [Masclaux et al., 2009](#)).

### **III.2. Nutriments-Xénobiotiques**

Dans une autre expérimentation ([Arce-Funck et al., 2016](#); **Annexe 5**), nous avons voulu tester l'impact de la qualité de la ressource sur l'état physiologique et, *in fine*, sur la réponse de consommateurs à une exposition à un xénobiotique. Pour cela, nous avons étudié en microcosmes la réponse de *G. fossarum* à une contamination en Ag suite à une alimentation de 15 jours avec une ressource plus ou moins riche en P. Nous avons pour cela développé 4 types de ressources :

- NC : des disques de feuilles (Aulne : *Alnus glutinosa* et Erable : *Acer pseudoplatanus*) non conditionnés,
- P0 : des disques colonisés dans du milieu COMBO (milieu de culture standardisé) sans P durant 15 jours (à l'obscurité et 15°C sur table d'agitation) par un mélange mycélien cultivé en laboratoire,
- P1 et P2 : des disques colonisés dans du milieu COMBO durant 12 jours, puis 3 jours supplémentaires avec un ajout respectif de 110 et 735µl de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (10g P.L<sup>-1</sup>).

L'expérimentation s'est déroulée en deux phases. La première de 15 jours de nourrissage *ad libitum* (12°C à l'obscurité, 15 répliques individuels pour chaque condition et essence) pour observer les effets d'un enrichissement en P de la ressource sur *G. fossarum*, suivi d'une période de 4 jours sans nourriture où nous avons rassemblé les individus survivants (4 répliques de 20 individus par essence) avec l'objectif de les exposer à trois concentrations d'Ag (0 ; 0,5 et 1,0 µg.L<sup>-1</sup>).

Durant la première phase, le protocole d'enrichissement de la ressource nous a permis d'obtenir une augmentation des pourcentages de P dans les deux essences de litière avec des taux de consommation supérieurs pour l'aulne et le conditionnement P2. Après 15 jours de nourrissage, le conditionnement des disques et l'interaction entre le conditionnement et l'essence se sont montrés avoir un impact sur les teneurs en glycogène (niveau énergétique) des individus. Aucune différence n'a été observée entre les niveaux de glycogène des individus nourris avec des disques NC, P0 mais ces niveaux augmentaient avec des ressources enrichies en P. Les teneurs en lipides quant à elles étaient influencées par le conditionnement, l'essence et leurs interactions. Les taux de survie durant la première phase ( $\approx 90,2\%$ ) n'ont montré aucune corrélation avec les essences ou l'enrichissement en P. Cependant l'activité locomotrice était augmentée significativement à la suite de la consommation d'une ressource conditionnée, riche en P et présentait une corrélation avec l'augmentation des taux de consommation.

Les principaux résultats de la deuxième phase ont mis en évidence que l'Ag présentait un impact négatif sur l'osmolarité de l'hémolymphe et entraînait une augmentation de la ventilation chez les individus exposés mais surtout des effets complexes sur la survie, l'alimentation avec les ressources de meilleure qualité semblant améliorer la survie pour les ressources de qualité intermédiaire, mais semblant ne plus avoir d'effet pour les ressources de qualité supérieure.

De manière contre-intuitive, même à des concentrations faibles d'Ag, une ressource enrichie en P n'a pas permis une meilleure résistance généralisée à la contamination, et ce même si dans le cas d'individus nourris avec de l'aulne P2 et de l'érable P1, nous avons pu observer une augmentation des réserves lipidiques (comme dans le cas des réserves de glycogènes).

### **III.3. Biofilms**

Lors de nos précédentes études, nous n'avons pas pris en compte la réponse des dynamiques de communautés au sein des biofilms. Nous nous sommes concentrés principalement sur l'impact direct des biofilms issu d'une croissance sur différents gradients (*Confer* Chapitre 4, III.1 ; **Annexe 4**). Il serait judicieux de s'intéresser maintenant plus précisément aux interactions biotiques ayant lieu au sein des biofilms. Les principales interactions biotiques avec les organismes des cours d'eau sont effectuées entre les microalgues, les bactéries et les invertébrés décheteteurs. Les hyphomycètes aquatiques sont en concurrence directe avec les autres décomposeurs pour les ressources détritiques. Certains produisent des antibiotiques inhibant la croissance bactérienne mais les interactions entre ces groupes de décomposeurs restent tout de même complexes et encore mal comprises ([Romaní et al., 2006](#)). Il est toutefois à noter que les décomposeurs sont aussi en concurrence pour les éléments dissous avec les producteurs primaires des cours d'eau. Les informations sur les interactions

entre ces deux groupes fonctionnels restent encore très peu investiguées dans les cours d'eau de tête de bassin versant (mais voir [Danger et al., 2013 b](#) ; [Allen et al., 2017](#)), alors que ce type d'interactions a été étudié de longue date en lac ou en milieu terrestre ([Cole, 1982](#) ; [Harte & Kinzig, 1993](#)). Un large champ d'investigation reste encore largement à explorer à ce sujet.

#### **IV. Perspectives**

A la fin de ces travaux, de nombreuses questions restent en suspens et de nombreuses perspectives s'ouvrent à nous afin de mieux appréhender le fonctionnement des ruisseaux de tête de bassin versant. Parmi celles-ci, j'ai choisi ici de présenter, sans ordre de priorité, les questions de recherches qui me tiendraient le plus à cœur de développer dans les prochaines années.

1) Un des objectifs de cette thèse était de comprendre la nature des facteurs limitants les processus fonctionnels au sein des cours d'eau de tête de bassin versant. Nos travaux ont pu montrer des cas de limitations en azote et/ou phosphore (avec des cas très probables de co-limitation par ces deux éléments) et d'autres cas de limitation de la croissance des invertébrés par la disponibilité en acides gras essentiels. En particulier, il aurait été intéressant de pouvoir savoir dans quel(s) contexte(s) les concentrations en éléments chimiques (disponibilité du N et / ou P) prendraient le pas sur la disponibilité en acides gras essentiels. Cette approche a été tentée en soumettant des biofilms phototrophes à dominance diatomique à des enrichissements forts en P (voir [Sanchez-Thirion et al.](#) ; Soumission prochaine prévue à *Aquatic Toxicology*, **Annexe 4**). Bien que le protocole semblait parfaitement adapté pour répondre à cette question de l'importance relative des AGPI et du P, cette expérience ne s'est pas avérée totalement satisfaisante, le gradient de P étant bien plus fort que le gradient de disponibilité en AGPI. Les résultats ont semblé montrer un effet plus fort du P sur la croissance des gammarés que la disponibilité en AGPI, mais la taille réduite du gradient d'AGPI est potentiellement à l'origine de l'impossibilité de démontrer des effets de ces composés sur la croissance. Je suspecte également, au vu de mes diverses lectures de la bibliographie, que les AGPI pourraient jouer un rôle prépondérant sur la reproduction des organismes, et le P sur leur croissance. Cette hypothèse reste à valider, mais indiquerait la nécessité de coupler plusieurs indicateurs de réponse des consommateurs à la qualité des ressources (par exemple croissance et reproduction) pour éviter des mésinterprétations quant à la nature des éléments limitants.

2) Lors de notre étude menée *in situ* visant à quantifier la production primaire et la qualité élémentaire et biochimique potentielle de ces ressources de base dans les écosystèmes de tête de bassin versant, nous ne nous sommes concentrés uniquement que sur les biofilms épilithiques phototrophes, et ce pour des raisons de simplicité. Néanmoins, il est évident que la production primaire dans ces cours d'eau peut aussi être assurée par d'autres organismes que des algues

benthiques. En particulier, dans les cours d'eau forestiers, on peut également observer des abondances variables de macrophytes et de bryophytes. Par ailleurs, dans ces cours d'eau, les bryophytes sont régulièrement retrouvées dans les tubes digestifs de certains invertébrés (Felten *et al.*, 2008). Les données sur les profils d'acides gras des bryophytes restent parcellaires, mais les rares données disponibles indiquent que certaines espèces pourraient contenir des quantités non négligeables d'acides gras d'intérêt. Par exemple, Torres-Ruiz, Wehr & Perrone (2007) ont pu montrer que l'espèce de *Hygrohypnum luridum* (Hedw.) Jenn., contenait de l'acide arachidonique (20:4 $\omega$ 6) en concentration similaire à celle retrouvée dans la biomasse de certains invertébrés. Ces producteurs primaires pourraient ainsi se révéler jouer un rôle tout aussi important que les biofilms phototrophes (et les diatomées en particulier, Crenier *et al.*, 2017) qui ont été étudiés dans cette thèse.

3) Au sein des biofilms phototrophes, les mesures à la benthotorche nous ont apporté des indices sur les assemblages de chlorophycées, de cyanobactéries et de diatomées. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux diatomées, présentant de manière notoire des pourcentages d'AGPI à longue chaîne carbonée élevés. Cependant, le biofilm représente une communauté complexe de microorganismes, incluant également une méiofaune particulière. La structure de ces communautés est susceptible de subir diverses pressions et/ou stressseurs, ce qui génère des modifications potentielles des espèces en présence (par exemple, Leflaive *et al.* (2015)). Néanmoins, la plupart des études se sont intéressées aux communautés algales ou bactériennes. Les protozoaires, pourtant bien présents dans les biofilms, ne sont que rarement ou jamais suivis. Or, ces protozoaires sont potentiellement riches en acides gras essentiels, et ont déjà été décrits comme des améliorateurs de la qualité des ressources pour les consommateurs herbivores (par exemple : Bec, Martin-Creuzburg & Elert, 2006). Des modifications de la densité de protozoaires, au même titre que des changements d'algues, pourraient ainsi jouer sur la qualité des biofilms. Par ailleurs, les protozoaires et la méiofaune du biofilm pourraient impacter la dynamique des communautés bactériennes et algales (Majdi, Tackx & Buffan-Dubau, 2012), ces effets en cascade pouvant à leur tour jouer un rôle dans la qualité des biofilms. La prise en compte de la complexité des biofilms épilithiques représente donc à mes yeux une perspective d'intérêt pour la compréhension du fonctionnement des cours d'eau de tête de bassin versant.

4) Dans notre étude de suivi des producteurs primaires (Chapitre 2, Partie 1), nous avons prélevé les biofilms après seulement 2 mois de croissance. Nous n'avons pas pris en compte l'impact de la saisonnalité sur cette qualité biochimique. Par ailleurs, nous n'avons pas spécifiquement étudié la réponse individuelle des espèces présentes dans le biofilm à des stressseurs. Il serait pourtant intéressant d'observer si les changements de qualité des ressources sont dus à des modifications

de structure des communautés, ou si c'est simplement dû à une plasticité intraspécifique de la réponse des organismes face aux différentes pressions et stressseurs.

5) Une élévation de température des cours d'eau pourrait potentiellement affecter positivement la croissance fongique et la décomposition des litières, ce qui, dans un contexte de réchauffement climatique global, pourrait mener à une activité fongique accrue, des taux de décomposition en augmentation, réduisant les ressources avec des effets délétères à l'échelle des niveaux trophiques supérieurs (Ferreira & Chauvet, 2011). La température est l'un facteur de base des processus métaboliques (Brown *et al.*, 2004) impactant les réactions chimiques de respiration, d'assimilation des ressources et plus généralement de la croissance des organismes (Loi de Van't Hoff : Myers (2003) dans Chauvet *et al.*, 2016). Même si ces effets sont variables suivant les litières et la composition des communautés, ils mériteraient certainement d'être pris en compte dans de futures études.

6) Pour finir, nous avons pu mettre en évidence un impact de la qualité stœchiométrique et biochimique des ressources carbonées produites au sein des cours d'eau (producteurs primaires autochtones) sur des consommateurs détritvires benthiques. Néanmoins, la potentialité que d'autres groupes fonctionnels, tels des herbivores stricts ou bien des prédateurs, ingèrent directement ou indirectement le carbone et les nutriments issus de ces producteurs primaires reste à évaluer. Pour les prédateurs, il est possible de penser que le choix de proies puisse être influencé par la réponse (comportementale ou bien physiologique) des consommateurs face à des ressources riches en acides gras (par exemple, coloration par une accumulation de bêta-carotène dans les tissus de détritvires à carapaces chitineuse translucide ou par parasites, Confer, travaux de thèse de Kévin Sanchez-Thirion, 2017). Le transfert du statut de « meilleure qualité en tant que ressource » d'un producteur primaire à un consommateur primaire puis à un prédateur reste à explorer. L'intégration de notre raisonnement à des études sur les réseaux trophiques complexes (au-delà de la simple interaction entre une ressource et un consommateur) reste à étudier.

# Références Bibliographiques



## A

- Alewell C., Armbruster M., Bittersohl J., Evans C.D., Meeseburg H., Moritz K., *et al.* (2001) Are there signs of acidification reversal in freshwaters of the low mountain ranges in Germany? *Hydrology and Earth System Sciences Discussions* **5**, 367–378.
- Allan E., Manning P., Alt F., Binkenstein J., Blaser S., Blüthgen N., *et al.* (2015) Land use intensification alters ecosystem multifunctionality via loss of biodiversity and changes to functional composition. *Ecology Letters* **18**, 834–843.
- Allan J.D. & Castillo M.M. (2007) *Stream ecology: structure and function of running waters*, 2nd Edition. Springer, Dordrecht.
- Allen J.L., Leflaive J., Binguier C., Ten-Hage L., Chauvet E., Cornut J., *et al.* (2017) Allelopathic inhibition of primary producer growth and photosynthesis by aquatic fungi. *Fungal Ecology*.
- Anderson N.H. & Sedell J.R. (1979) Detritus processing by macroinvertebrates in stream ecosystems. *Annual Review of Entomology* **24**, 351–377.
- Andreï J. (2015) *Effets (sub)individuels et fonctionnels des nanoparticules manufacturées sur des Crustacés Gammaridae*. Université de Lorraine, Metz, France.
- Andreï J., Pain-Devin S., Felten V., Devin S., Giambérini L., Mehennaoui K., *et al.* (2016) Silver nanoparticles impact the functional role of *Gammarus roeseli* (Crustacea Amphipoda). *Environmental Pollution* **208**, 608–618.
- Angéli N., Dambrine E., Boudot J.P., Nedeltcheva T., Guérolde F.A., Tixier G., *et al.* (2009) Evaluation of streamwater composition changes in the Vosges Mountains (NE France): 1955–2005. *Science of The Total Environment* **407**, 4378–4386.
- Arce-Funck J., Bec A., Perrière F., Felten V. & Danger M. (2015) Aquatic hyphomycetes: a potential source of polyunsaturated fatty acids in detritus-based stream food webs. *Fungal Ecology* **13**, 205–210.
- Arce-Funck J., Clivot H., Felten V., Rousselle P., Guérolde F.A. & Danger M. (2013a) Phosphorus availability modulates the toxic effect of silver on aquatic fungi and leaf litter decomposition. *Aquatic Toxicology* **144–145**, 199–207.
- Arce-Funck J., Crenier C., Danger M., Cossu-Leguille C., Guérolde F.A. & Felten V. (2016) Stoichiometric constraints modulate impacts of silver contamination on stream detritivores: an experimental test with *Gammarus fossarum*. *Freshwater Biology*.
- Arce-Funck J., Danger M., Gismondi E., Cossu-Leguille C., Guérolde F.A. & Felten V. (2013b) Behavioural and physiological responses of *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda) exposed to silver. *Aquatic Toxicology* **142–143**, 73–84.
- Arsuffi T.L. & Suberkropp K. (1989) Selective feeding by shredders on leaf-colonizing stream fungi: comparison of macroinvertebrate taxa. *Oecologia* **79**, 30–37.
- Arts M.T., Ackman R.G. & Holub B.J. (2001) “Essential fatty acids” in aquatic ecosystems: a crucial link between diet and human health and evolution. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **58**, 122–137.
- Arts M.T., Brett M.T. & Kainz M.J. eds (2009) *Lipids in Aquatic Ecosystems*. Springer New York, New York, NY.
- Arts M.T. & Kohler C. (2009) Health and condition in fish: the influence of lipids on membrane competency and immune response. In: *Lipids in Aquatic Ecosystems*. (Eds M.T. Arts, M.T. Brett & M.J. Kainz), pp. 237–255. Springer, New York.
- Arts M.T. & Wainman B.C. eds (1998) *Lipids in Freshwater Ecosystems*, Springer-Verlag, Springer New York, New York, NY.

## B

- Baldy V. & Gessner M.O. (1997) Towards a budget of leaf litter decomposition in a first-order woodland stream. Décomposition des litières dans une petite rivière forestière : essai de bilan. *Académie des sciences*, 747–758.
- Baldy V., Gessner M.O. & Chauvet E. (1995) Bacteria, Fungi and the Breakdown of Leaf Litter in a Large River. *Oikos* **74**, 93.
- Baldy V., Gobert V., Guérol F.A., Chauvet E., Lambrigot D. & Charcosset J.-Y. (2007) Leaf litter breakdown budgets in streams of various trophic status: effects of dissolved inorganic nutrients on microorganisms and invertebrates. *Freshwater Biology* **52**, 1322–1335.
- Bärlocher F. (1991) Fungal colonization of fresh and dried leaves in the River Teign (Devon, England). *Nova Hedwigia* **52**, 349–357.
- Bärlocher F. (1982) The contribution of fungal enzymes to the digestion of leaves by *Gammarus fossarum* Koch (Amphipoda). *Oecologia* **52**, 1–4.
- Bärlocher F. (1992) *The Ecology of Aquatic Hyphomycetes*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Bärlocher F. (1985) The role of fungi in the nutrition of stream invertebrates. *Botanical journal of the Linnean Society* **91**, 83–94.
- Bärlocher F. & Kendrick B. (1975) Assimilation efficiency of *Gammarus pseudolimnaeus* (Amphipoda) feeding on fungal mycelium or autumn-shed leaves. *Oikos* **26**, 55.
- Bärlocher F. & Kendrick B. (1973a) Fungi and food preferences of *Gammarus pseudolimnaeus*. *Archiv für Hydrobiologie* **72**, 501–516.
- Bärlocher F. & Kendrick B. (1973b) Fungi in the diet of *Gammarus pseudolimnaeus*. *Oikos* **24**, 295–300.
- Bärlocher F. & Kendrick B. (1976) Hyphomycetes as intermediaries of energy flow in streams. In: *Recent Advances in Aquatic Mycology*. pp. 435–445.
- Bärlocher F. & Sridhar K.R. (2014) Ch.19-Association of animals and fungi in leaf decomposition. In: *Freshwater fungi and fungus-like organisms*, National Taiwan Ocean University. (Eds E.B.G. Jones, K.D. Hyde & K.-L. Pang), pp. 413–441. De Gruyter, Keelung, Taiwan (R.O.C.).
- Baudin J.P. & Garnier-Laplace J. (1994) Accumulation, release, and tissue distribution of <sup>110m</sup>Ag from natural food (*Gammarus pulex*) by the common carp, *Cyprinus carpio* L. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **27**, 459–465.
- Baudoin J.M., Guérol F., Felten V., Chauvet E., Wagner P. & Rousselle P. (2008) Elevated Aluminium Concentration in Acidified Headwater Streams Lowers Aquatic Hyphomycete Diversity and Impairs Leaf-Litter Breakdown. *Microbial Ecology* **56**, 260–269.
- Bec A., Desvillettes C., Véra A., Fontvieille D. & Bourdier G. (2003) Nutritional value of different food sources for the benthic Daphnidae *Semicepaganus vetulus*: role of fatty acids. *Archiv für Hydrobiologie* **156**, 145–163.
- Bec A., Martin-Creuzburg D. & Elert E. von (2006) Trophic upgrading of autotrophic picoplankton by the heterotrophic nanoflagellate *Paraphysomonas* sp. *Limnology and Oceanography* **51**, 1699–1797.
- Beisel J.-N. & Médoc V. (2010) Bird and amphipod parasites illustrate a gradient from adaptation to exaptation in complex life cycle. *Ethology Ecology & Evolution* **22**, 265–270.
- Bell J.G. & Sargent J.R. (1996) Lipid nutrition and fish recruitment. *Marine Ecology-Progress Series*, 315–316.

- Bell M.V., Batty R.S., Dick J.R., Fretwell K., Navarro J.C. & Sargent J.R. (1995) Dietary deficiency of docosahexaenoic acid impairs vision at low light intensities in juvenile herring (*Clupea harengus* L.). *Lipids* **30**, 443–449.
- Berg B. & Ekbohm G. (1991) Litter mass-loss rates and decomposition patterns in some needle and leaf litter types. Long-term decomposition in a Scots pine forest. VII. *Canadian Journal of Botany* **69**, 1449–1456.
- Birk S., Bonne W., Borja A., Bruce S., Courrat A., Poikane S., *et al.* (2012) Three hundred ways to assess Europe's surface waters: An almost complete overview of biological methods to implement the Water Framework Directive. *Ecological Indicators* **18**, 31–41.
- Bourdier G.G. & Amblard C.A. (1989) Lipids in *Acanthodiptomus denticomis* during starvation and fed on three different algae. *Journal of Plankton Research* **11**, 1201–1212.
- Bradley D.C. & Ormerod S.J. (2002) Long-term effects of catchment liming on invertebrates in upland streams. *Freshwater Biology* **47**, 161–171.
- Brett M.T. & Müller-Navarra D.C. (1997) The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic foodweb processes. *Freshwater Biology* **38**, 483–499.
- Brett M.T., Müller-Navarra D.C. & Persson J. (2009) Crustacean zooplankton fatty acid composition. In: *Lipids in Aquatic Ecosystems*. (Eds M. Kainz, M.T. Brett & M.T. Arts), pp. 115–146. Springer New York, New York, NY.
- Brosed M. (2016) *Evaluation de l'intégrité fonctionnelle des écosystèmes lotiques du sud-ouest de la France*. Université Toulouse 3 Paul Sabatier, Toulouse.
- Brosed M., Lamothe S. & Chauvet E. (2016) Litter breakdown for ecosystem integrity assessment also applies to streams affected by pesticides. *Hydrobiologia* **773**, 87–102.
- Brown J.H., Gillooly J.F., Allen A.P., Savage V.M. & West G.B. (2004) Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology* **85**, 1771–1789.

## C

- Calder P.C. (2009) Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie* **91**, 791–795.
- Canhoto C. & Graça M.A.S. (2008) Interactions between fungi and stream invertebrates: back to the future. In: *Novel Techniques and Ideas in Mycology, Fungal Diversity Research Series*, Fungal Diversity Press. (Eds K.R. Sridhar, F. Bärlocher & K.D. Hyde), pp. 305–325. Yunnan, P.R., China.
- Cargill II A.S., Cummins K.W., Hanson B.J. & Lowry R.R. (1985) The Role of Lipids, Fungi, and Temperature in the Nutrition of a Shredder Caddisfly, *Clistronia magnifica*. *Freshwater Invertebrate Biology* **4**, 64–78.
- Cebrian J., Shurin J.B., Borer E.T., Cardinale B.J., Ngai J.T., Smith M.D., *et al.* (2009) Producer Nutritional Quality Controls Ecosystem Trophic Structure. *PLoS ONE* **4**, e4929.
- Chamberlain P.M. & Black H.I.J. (2005) Fatty acid compositions of Collembola: unusually high proportions of C20 polyunsaturated fatty acids in a terrestrial invertebrate. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **140**, 299–307.
- Chapman D. ed. (1996) *Water quality assessments: a guide to the use of biota, sediments and water environmental monitoring*, 2. ed. E & FN Spon, London.
- Chappell K.R. & Goulder R. (1994) Enzymes as river pollutants and the response of native epilithic extracellular-enzyme activity. *Environmental pollution* **86**, 161–169.

- Chaumot A., Geffard O., Armengaud J. & Maltby L. (2015) Gammarids as Reference Species for Freshwater Monitoring. In: *Aquatic Ecotoxicology - Advancing tool for dealing with emerging risks*, Academic Press. (Eds C. Amiard-Triquet, J.-C. Amiard & C. Mouneyrac), pp. 253–280. Elsevier, Paris.
- Chauvet E. (1987) Changes in the chemical composition of alder, poplar and willow leaves during decomposition in a river. *Hydrobiologia* **148**, 35–44.
- Chauvet E., Ferreira V., Giller P.S., McKie B.G., Tiegs S.D., Woodward G., *et al.* (2016) Litter Decomposition as an Indicator of Stream Ecosystem Functioning at Local-to-Continental Scales. In: *Advances in Ecological Research*. pp. 99–182. Elsevier.
- Chauvet E. & Guérolde F.A. (2015) Petites rivières, qualité de l'eau et organismes. In: *L'eau à découvert*. (Eds A. Euzen, C. Jeandel & R. Mosseri), pp. 134–135. CNRS Editions, Paris.
- Cheever B.M., Kratzer E.B. & Webster J.R. (2012) Immobilization and mineralization of N and P by heterotrophic microbes during leaf decomposition. *Freshwater Science* **31**, 133–147.
- Chrost R.J. (1991) Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes. In: *Microbial enzymes in aquatic environments*. (Ed. R.J. Chrost), pp. 29–59. Springer-Verlag, New York, NY.
- Chrost R.J. (1990) Microbial ectoenzymes in aquatic environments. In: *Aquatic Microbial Ecology: Biochemical and Molecular Approaches*, Springer Verlag. (Eds J. Overbeck & R.J. Chrost), pp. 47–78. New York. 190 pp.
- Chung N. & Suberkropp K. (2009) Effects of aquatic fungi on feeding preferences and bioenergetics of *Pycnopsyche gentilis* (Trichoptera: Limnephilidae). *Hydrobiologia* **630**, 257–269.
- Clarke A., Mac Nally R., Bond N. & Lake P.S. (2008) Macroinvertebrate diversity in headwater streams: a review. *Freshwater Biology* **53**, 1707–1721.
- Clivot H., Charmasson F., Felten V., Boudot J.-P., Guérolde F.A. & Danger M. (2014a) Interactive effects of aluminium and phosphorus on microbial leaf litter processing in acidified streams: A microcosm approach. *Environmental Pollution* **186**, 67–74.
- Clivot H., Cornut J., Chauvet E., Elger A., Poupin P., Guérolde F.A., *et al.* (2014b) Leaf-associated fungal diversity in acidified streams: insights from combining traditional and molecular approaches. *Environmental Microbiology* **16**, 2145–2156.
- Clivot H., Danger M., Pagnout C., Wagner P., Rousselle P., Poupin P., *et al.* (2013) Impaired Leaf Litter Processing in Acidified Streams: Learning from Microbial Enzyme Activities. *Microbial Ecology* **65**, 1–11.
- Colas F., Baudoin J.-M., Gob F., Tamisier V., Valette L., Kreutzenberger K., *et al.* (2017) Scale dependency in the hydromorphological control of a stream ecosystem functioning. *Water Research* **115**, 60–73.
- Cole J.J. (1982) Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics* **13**, 291–314.
- Cooper A.B. & Cooke J.G. (1984) Nitrate loss and transformation in 2 vegetated headwater streams. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* **18**, 441–450.
- Copeman L.A., Parrish C.C., Brown J.A. & Harel M. (2002) Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment. *Aquaculture* **210**, 285–304.
- Cordier M., Brichon G., Weber J.-M. & Zwingelstein G. (2002) Changes in the fatty acid composition of phospholipids in tissues of farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during

- an annual cycle. Roles of environmental temperature and salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **133**, 281–288.
- Cornut J. (2010) *Décomposition de débris végétaux dans la zone hyporhéique de cours d'eau forestiers : implication du compartiment fongique*. Université de Toulouse III.
- Cornut J., Clivot H., Chauvet E., Elger A., Pagnout C. & Guérold F.A. (2012) Effect of acidification on leaf litter decomposition in benthic and hyporheic zones of woodland streams. *Water Research* **46**, 6430–6444.
- Council of the European Union (2001) Programme National de Réduction des Emissions de Polluants Atmosphériques (SO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>, COV, NH<sub>3</sub>) en application de la Directive 2001/81/CE du 23 Octobre 2001.
- Covich A.P., Palmer M.A. & Crowl T.A. (1999) The role of benthic invertebrate species in freshwater ecosystems: zoobenthic species influence energy flows and nutrient cycling. *BioScience* **49**, 119–127.
- Crawley M.J. (1997) Plant-herbivore dynamics. In: *Plant Ecology*, Blackwell. (Ed. M.J. Crawley), pp. 401–474.
- Crenier C., Arce-Funck J., Bec A., Billoir E., Perrière F., Leflaive J., *et al.* (2017) Minor food sources can play a major role in secondary production in detritus-based ecosystems. *Freshwater Biology* **62**, 1155–1167.
- Cross W.F., Benstead J.P., Rosemond A.D. & Wallace J.B. (2003) Consumer-resource stoichiometry in detritus-based streams. *Ecology Letters* **6**, 721–732.
- Cummins K.W. (1974) Structure and Function of Stream Ecosystems. *BioScience* **24**, 631–641.
- Cummins K.W. (2016) Combining taxonomy and function in the study of stream macroinvertebrates. *Journal of Limnology* **75(s1)**, 235-241.
- Cummins K.W. (1979) The natural stream ecosystem. In: *The ecology of regulated streams*. (Eds J.V. Ward & J.A. Stanford), pp. 7–24. Springer Science+Business Media, New York.
- Cummins K.W., Coffman W.P. & Roff P.A. (1966) Trophic relations in a small woodland stream. *Verhandlungen der internationalen Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie* **16**, 627–638.
- Cummins K.W. & Klug M.J. (1979) Feeding Ecology of Stream Invertebrates. *Annual Review of Ecology and Systematics* **10**, 147–172.
- Cummins K.W., Petersen R.C., Howard F.O., Wuycheck J.C. & Holt V.I. (1973) The Utilization of Leaf Litter by Stream Detritivores. *Ecology* **54**, 336–345.
- Cushing C.E., Minshall G.W. & Newbold J.D. (1993) Transport dynamics of fine particulate organic matter in two Idaho streams. *Limnology and oceanography* **38**, 1101–1115.

## D

- Dalsgaard J., St John M., Kattner G., Müller-Navarra D.C. & Hagen W. (2003) Fatty Acid Trophic Markers in the Pelagic Marine Environment. *Advances in Marine Biology* **46**, 225–340.
- Danger M., Arce Funck J., Devin S., Heberle J. & Felten V. (2013a) Phosphorus content in detritus controls life-history traits of a detritivore. *Functional Ecology* **27**, 807–815.
- Danger M. & Chauvet E. (2013) Elemental composition and degree of homeostasis of fungi: are aquatic hyphomycetes more like metazoans, bacteria or plants? *Fungal Ecology* **6**, 453–457.

- Danger M., Cornut J., Chauvet E., Chavez P., Elger A. & Lecerf A. (2013b) Benthic algae stimulate leaf litter decomposition in detritus-based headwater streams: a case of aquatic priming effect? *Ecology* **94**, 1604–1613.
- Danger M., Cornut J., Elger A. & Chauvet E. (2012) Effects of burial on leaf litter quality, microbial conditioning and palatability to three shredder taxa. *Freshwater Biology* **57**, 1017–1030.
- Danger M., Daufresne T., Lucas F., Pissard S. & Lacroix G. (2008) Does Liebig's law of the minimum scale up from species to communities? *Oikos* **117**, 1741–1751.
- Danger M., Gessner M.O. & Bärlocher F. (2016) Ecological stoichiometry of aquatic fungi: current knowledge and perspectives. *Fungal Ecology* **19**, 100–111.
- Danger M., Oumarou C., Benest D. & Lacroix G. (2007) Bacteria can control stoichiometry and nutrient limitation of phytoplankton. *Functional Ecology* **21**, 202–210.
- Dangles O. (2000) *Approche du fonctionnement de ruisseaux forestiers soumis à des processus d'acidification : Décomposition des litières, rôle des macro-invertébrés benthiques et application vers une gestion conservatoire*. Université de Metz, Metz, France.
- Dangles O.J. (2002) Functional Plasticity of benthic macroinvertebrates: implications for trophic dynamics in acid streams. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **59**, 1563–1573.
- Dangles O.J., Gessner M.O., Guérol F.A. & Chauvet E. (2004) Impacts of stream acidification on litter breakdown: implications for assessing ecosystem functioning. *Journal of Applied Ecology* **41**, 365–378.
- Dangles O.J. & Guérol F.A. (1999) Impact of Headwater Acidification on the Trophic Structure of Macroinvertebrate Communities. *International Review of Hydrobiology* **84**, 287–297.
- Dangles O.J. & Guérol F.A. (2001) Influence of shredders in mediating rates of beech leaves in circumneutral and acidic forest streams. *Archiv für Hydrobiologie* **151**, 659–666.
- Dangles O.J. & Guérol F.A. (2000) Structural and functional responses of benthic macroinvertebrates to acid precipitation in two forested headwater streams (Vosges Mountains, northeastern France). *Hydrobiologia* **418**, 25–31.
- Dawoud M., Bundschuh M., Goedkoop W. & McKie B.G. (2017) Interactive effects of an insecticide and a fungicide on different organism groups and ecosystem functioning in a stream detrital food web. *Aquatic Toxicology* **186**, 215–221.
- Del Arco A.I., Guerrero F., Jiménez-Gómez F. & Parra G. (2015) Effects of nitrate concentration within legal limits on natural assemblages of plankton communities. *Fundamental and Applied Limnology / Archiv für Hydrobiologie* **187**, 1–10.
- Demars B.O.L., Russell Manson J., Ólafsson J.S., Gíslason G.M., Gudmundsdóttir R., Woodward G., *et al.* (2011) Temperature and the metabolic balance of streams: Temperature and the metabolic balance of streams. *Freshwater Biology* **56**, 1106–1121.
- Desjardins R. & Cavayas F. (1991) Possibilités et limites des images satellites TM LANDSAT en matière d'occupation du sol: le cas de Montréal (Québec). *Cahiers de géographie du Québec* **35**, 137.
- Di H.J. & Cameron K.C. (2002) Nitrate leaching in temperate agroecosystems: sources, factors and mitigating strategies. *Nutrient cycling in agroecosystems* **64**, 237–256.
- Dick J.T. (1995) The cannibalistic behaviour of two *Gammarus* species (Crustacea: Amphipoda). *Journal of Zoology* **236**, 697–706.
- Dijkman N.A., Boschker H.T.S., Stal L.J. & Kromkamp J.C. (2010) Composition and heterogeneity of the microbial community in a coastal microbial mat as revealed by the analysis of pigments and phospholipid-derived fatty acids. *Journal of Sea Research* **63**, 62–70.
- Dinar S. (2002) Water, Security, Conflict, and Cooperation. *SAIS Review* **22**, 229–253.

- Dray S. & Dufour A.-B. (2007) The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of statistical software* **22**, 1–20.
- Drerup S.A. & Vis M.L. (2017) Extracellular enzyme activity suggests phosphorus limitation of biofilm productivity in acid mine drainage remediated streams. *Hydrobiologia* **784**, 225–236.
- Driscoll C.T., Lawrence G.B., Bulger A.J., Butler T.J., Cronan C.S., Eagar C., *et al.* (2001) Acidic Deposition in the Northeastern United States: Sources and Inputs, Ecosystem Effects, and Management Strategies. *BioScience* **51**, 180–198.
- Duarte S., Pascoal C., Alves A., Correia A. & CáSsio F. (2008) Copper and zinc mixtures induce shifts in microbial communities and reduce leaf litter decomposition in streams. *Freshwater Biology* **53**, 91–101.
- Dudgeon D., Arthington A.H., Gessner M.O., Kawabata Z.-I., Knowler D.J., Lévêque C., *et al.* (2006) Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews* **81**, 163.
- Dunstan G.A., Volkman J.K., Barrett S.M., Leroi J.-M. & Jeffrey S.W. (1994) Essential Polyunsaturated Fatty Acids from 14 species of diatom (*Bacillariophyceae*). *Phytochemistry* **35**, 155–161.
- Duran M. (2007) Life Cycle of *Gammarus pulex* (L.) in the River Yeşilirmak. *Turkish Journal of Zoology* **31**, 389–394.

## E

- Ederington M.C., McManus G.B. & Harvey H.R. (1995) Trophic transfer of fatty acids, sterols, and a triterpenoid alcohol between bacteria, a ciliate, and the copepod *Acartia tonsa*. *Limnology and Oceanography* **40**, 860–867.
- Eldho N.V., Feller S.E., Tristram-Nagle S., Polozov I.V. & Gawrisch K. (2003) Polyunsaturated Docosahexaenoic vs Docosapentaenoic Acid-Differences in Lipid Matrix Properties from the Loss of One Double Bond. *Journal of the American Chemical Society* **125**, 6409–6421.
- Elósegui A., Arana X., Basaguren A. & Pozo J. (1995) Self-purification processes along a medium-sized stream. *Environmental Management* **19**, 931.
- Elósegui A. & Pozo J. (1998) Epilithic biomass and metabolism in a north Iberian stream. *Aquatic Sciences-Research Across Boundaries* **60**, 1–16.
- El-Sabaawi R., Dower J.F., Kainz M. & Mazumder A. (2009) Characterizing dietary variability and trophic positions of coastal calanoid copepods: insight from stable isotopes and fatty acids. *Marine Biology* **156**, 225–237.
- Elser J.J. (2012) Phosphorus: a limiting nutrient for humanity? *Current Opinion in Biotechnology* **23**, 833–838.
- Elser J.J., Bracken M.E.S., Cleland E.E., Gruner D.S., Harpole W.S., Hillebrand H., *et al.* (2007) Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* **10**, 1135–1142.
- Elser J.J., Chrzanowski T.H., Sterner R.W. & Mills K.H. (1998) Stoichiometric constraints on food-web dynamics: a whole-lake experiment on the Canadian Shield. *Ecosystems* **1**, 120–136.
- Elser J.J., Dobberfuhl D.R., Mackay N.A. & Schampel J.H. (1996) Organism Size, Life History, and N:P Stoichiometry. Toward a unified view of cellular and ecosystem processes. *BioScience* **46**, 674–684.

- Elser J.J., Hayakawa K. & Urabe J. (2001) Nutrient Limitation Reduces Food Quality for Zooplankton: Daphnia Response to Seston Phosphorus Enrichment. *Ecology* **82**, 898.
- Elwood J.W., Newbold J.D., Trimble A.F. & Stark R.W. (1981) The Limiting Role of Phosphorus in a Woodland Stream Ecosystem: Effects of P Enrichment on Leaf Decomposition and Primary Producers. *Ecology* **62**, 146–158.
- Emilson C.E., Kreuzweiser D.P., Gunn J.M. & Mykytczuk N.C.S. (2016) Effects of land use on the structure and function of leaf-litter microbial communities in boreal streams. *Freshwater Biology* **61**, 1049–1061.
- Ensign S.H. & Doyle M.W. (2006) Nutrient spiraling in streams and river networks. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* **111**, n/a-n/a.
- Erisman J.W. & Draaijers G. (1995) *Atmospheric deposition in relation to acidification and eutrophication*. Elsevier Science, Amsterdam; New York.
- Esri France (2013) Produits ArcGis.
- Evans C.D., Cullen J.M., Alewell C., Kopáček J., Marchetto A., Moldan F., *et al.* (2001) Recovery from acidification in European surface waters. *Hydrology and Earth System Sciences Discussions* **5**, 283–298.
- Evans-White M.A., Stelzer R.S. & Lamberti G.A. (2005) Taxonomic and regional patterns in benthic macroinvertebrate elemental composition in streams. *Freshwater Biology* **50**, 1786–1799.

## F

- Falkowski P.G. & Raven J.A. (2007) *Aquatic photosynthesis*, 2nd edition. Princeton University Press, Princeton.
- Fanin N., Fromin N., Buatois B. & Hättenschwiler S. (2013) An experimental test of the hypothesis of non-homeostatic consumer stoichiometry in a plant litter-microbe system. *Ecology Letters* **16**, 764–772.
- Feckler A., Goedkoop W., Zubrod J.P., Schulz R. & Bundschuh M. (2016) Exposure pathway-dependent effects of the fungicide epoxiconazole on a decomposer-detritivore system. *Science of The Total Environment* **571**, 992–1000.
- Felten V., Baudoin J.M. & Guérol F.A. (2006) Physiological recovery from episodic acid stress does not mean population recovery of *Gammarus fossarum*. *Chemosphere* **65**, 988–998.
- Felten V. & Guérol F.A. (2004) Haemolymph [Na<sup>+</sup>] and [Cl<sup>-</sup>] loss in *Gammarus fossarum* exposed in situ to a wide range of acidic streams. *Diseases of aquatic organisms* **61**, 113–121.
- Felten V. & Guérol F.A. (2001) Hyperventilation and loss of hemolymph Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* exposed to acid stress: a preliminary study. *Diseases of aquatic organisms* **45**, 77–80.
- Felten V., Tixier G., Guérol F.A., De Crespin De Billy V. & Dangles O.J. (2008) Quantification of diet variability in a stream amphipod: implications for ecosystem functioning. *Fundamental and Applied Limnology / Archiv für Hydrobiologie* **170**, 303–313.
- Ferlian O., Scheu S. & Pollierer M.M. (2012) Trophic interactions in centipedes (Chilopoda, Myriapoda) as indicated by fatty acid patterns: Variations with life stage, forest age and season. *Soil Biology and Biochemistry* **52**, 33–42.
- Ferreira V., Castagneyrol B., Koricheva J., Gulis V., Chauvet E. & Graça M.A.S. (2015) A meta-analysis of the effects of nutrient enrichment on litter decomposition in streams: Nutrient enrichment and litter decomposition. *Biological Reviews* **90**, 669–688.

- Ferreira V. & Chauvet E. (2011) Synergistic effects of water temperature and dissolved nutrients on litter decomposition and associated fungi. *Global Change Biology* **17**, 551–564.
- Ferreira V. & Guérolde F. (2017) Leaf litter decomposition as a bioassessment tool of acidification effects in streams: Evidence from a field study and meta-analysis. *Ecological Indicators* **79**, 382–390.
- Ferreira V., Koricheva J., Duarte S., Niyogi D.K. & Guérolde F. (2016a) Effects of anthropogenic heavy metal contamination on litter decomposition in streams – A meta-analysis. *Environmental Pollution* **210**, 261–270.
- Ferreira V., Koricheva J., Pozo J. & Graça M.A.S. (2016b) A meta-analysis on the effects of changes in the composition of native forests on litter decomposition in streams. *Forest Ecology and Management* **364**, 27–38.
- Field C.B., Behrenfeld M.J., Randerson J.T. & Falkowski P. (1998) Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science* **281**, 237–240.
- Fisher S.G. & Likens G.E. (1973) Energy Flow in Bear Brook, New Hampshire: An Integrative Approach to Stream Ecosystem Metabolism. *Ecological Monographs* **43**, 421–439.
- Flores L., Larrañaga S. & Elosegi A. (2014) Compensatory feeding of a stream detritivore alleviates the effects of poor food quality when enough food supplied. *Freshwater Science* **33**, 134–141.
- Folch J., Lees M. & Stanley H.S. (1957a) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* **226**, 497–509.
- Folch J., Lees M. & Stanley H.S. (1957b) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* **226**, 497–509.
- Fouillet M. (2014) *Développement d'indicateurs fonctionnels pour l'évaluation de la qualité écologique des cours d'eau de tête de bassin versant. Etude des processus de décomposition de la matière organiques détritiques et de production primaire benthique*. U.C.O. Établissement d'enseignement supérieur privé.
- Fountoulaki E., Alexis M.N., Nengas I. & Venou B. (2003) Effects of dietary arachidonic acid (20:4n-6), on growth, body composition, and tissue fatty acid profile of gilthead bream fingerlings (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture* **225**, 309–323.
- Frost P.C., Benstead J.P., Cross W.F., Hillebrand H., Larson J.H., Xenopoulos M.A., et al. (2006) Threshold elemental ratios of carbon and phosphorus in aquatic consumers. *Ecology Letters* **9**, 774–779.
- Fuller C.L., Evans-White M.A. & Entekin S.A. (2015) Growth and stoichiometry of a common aquatic detritivore respond to changes in resource stoichiometry. *Oecologia* **177**, 837–848.

G

- Gallo E.R. (2013) *The importance of stream invertebrates to riverine ecosystem function*.
- Gessner M.O. & Chauvet E. (2002) A case for using litter breakdown to assess functional stream integrity. *Ecological applications* **12**, 498–510.
- Gessner M.O. & Chauvet E. (1994) Importance of stream microfungi in controlling breakdown rates of leaf litter. *Ecology* **75**, 1807–1817.
- Gessner M.O., Gulis V., Kuehn K.A., Chauvet E. & Suberkropp K. (2007) Fungal Decomposers of Plant Litter in Aquatic Ecosystems. In: *The Mycota: A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research*. Vol.IV Environmental and

- Microbial Relationships*, 2nd Edition. The Mycota, (Eds C.P. Kubicek, I.S. Druzhinina, C.P. Kubicek & I.S. Druzhinina), pp. 301–324. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Gessner M.O. & Schwoerbel J. (1989) Leaching kinetics of fresh leaf-litter with implications for the current concept of leaf-processing in streams. *Archiv für Hydrobiologie* **115**, 81–90.
- Gessner M.O., Swan C.M., Dang C.K., McKie B.G., Bardgett R.D., Wall D.H., *et al.* (2010) Diversity meets decomposition. *Trends in ecology & evolution* **25**, 372–380.
- Giller P.S. & Malmqvist B. (1998) *The Biology of Rivers and Streams.*, Oxford University Press. Oxford, UK.
- Giri S. & Qiu Z. (2016) Understanding the relationship of land uses and water quality in Twenty First Century: A review. *Journal of Environmental Management* **173**, 41–48.
- Godwin C.M. & Cotner J.B. (2015) Stoichiometric flexibility in diverse aquatic heterotrophic bacteria is coupled to differences in cellular phosphorus quotas. *Frontiers in Microbiology* **6**.
- Gomi T., Sidle R.C. & Richardson J.S. (2002) Understanding Processes and Downstream Linkages of Headwater Systems Headwaters differ from downstream reaches by their close coupling to hillslope processes, more temporal and spatial variation, and their need for different means of protection from land use. *BioScience* **52**, 905–916.
- Grabowski M., Bacela K. & Konopacka A. (2007) How to be an invasive gammarid (Amphipoda: Gammaroidea)–comparison of life history traits. *Hydrobiologia* **590**, 75–84.
- Graça M.A.S., Maltby L. & Calow P. (1993a) Importance of fungi in the diet of *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus*. I: feeding strategies. *Oecologia* **93**, 139–144.
- Graça M.A.S., Maltby L. & Calow P. (1993b) Importance of fungi in the diet of *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus*. II: Effects on growth, reproduction and physiology. *Oecologia* **96**, 304–309.
- Gran G. (1952) Determination of the equivalence point in potentiometric titrations. Part II. *Analyst of London* **77**, 661–671.
- Grimmett I.J., Shipp K.N., Macneil A. & Bärlocher F. (2013) Does the growth rate hypothesis apply to aquatic hyphomycetes? *Fungal Ecology* **6**, 493–500.
- Groom A.P. & Hildrew A.G. (1989) Food quality for detritivores in streams of contrasting pH. *Journal of Animal Ecology* **58**, 863–881.
- Guéroid F.A., Boudot J.-P., Jacquemin G., Vein D., Merlet D. & Rouiller J. (2000) Macroinvertebrate community loss as a result of headwater stream acidification in the Vosges Mountains (N-E France). *Biodiversity & Conservation* **9**, 767–783.
- Guéroid F.A., Boudot J.-P., Merlet D., Rouillet J., Vein D. & Jacquemin G. (1997) *Evaluation de l'état d'acidification des cours d'eau du département des Vosges*. Conseil Général Des Vosges, Metz, France.
- Gulis V., Ferreira V. & Graça M.A.S. (2006) Stimulation of leaf litter decomposition and associated fungi and invertebrates by moderate eutrophication: implications for stream assessment. *Freshwater Biology* **51**, 1655–1669.
- Gulis V., Kuehn K.A. & Suberkropp K. (2009) Fungi. In: *Encyclopedia of Inland Waters*, Elsevier. (Ed. G.E. Likens), pp. 233–243. Oxford, UK.
- Gulis V., Marvanová L. & Descals E. (2004) An illustrated key to the common temperate species of aquatic hyphomycetes. In: *Methods to Study Litter Decomposition: A Practical Guide*. (Eds M.A.S. Graça, F. Bärlocher & M.O. Gessner), pp. 135–149. Springer.
- Gulis V. & Suberkropp K. (2003a) Interactions between stream fungi and bacteria associated with decomposing leaf litter at different levels of nutrient availability. *Aquatic Microbial Ecology* **30**, 149–157.

- Gulis V. & Suberkropp K. (2003b) Leaf litter decomposition and microbial activity in nutrient-enriched and unaltered reaches of a headwater stream. *Freshwater Biology* **48**, 123–134.
- Guo F., Kainz M.J., Sheldon F. & Bunn S.E. (2016a) The importance of high-quality algal food sources in stream food webs - current status and future perspectives. *Freshwater Biology* **61**, 815–831.
- Guo F., Kainz M.J., Valdez D., Sheldon F. & Bunn S.E. (2016b) High-quality algae attached to leaf litter boost invertebrate shredder growth. *Freshwater Science* **35**, 1213–1221.
- Guschina I. & Harwood J. (2009) Algal lipids and effect of the environment on their biochemistry. In: *Lipids in Aquatic Ecosystems*. (Eds M.T. Arts & M.T. Brett), pp. 1–24. Springer New York, New York, NY.

H

- Hall R.J., Likens G.E., Fiance S.B. & Hendrey G.R. (1980) Experimental Acidification of a Stream in the Hubbard Brook Experimental Forest, New Hampshire. *Ecology* **61**, 976–989.
- Harte J. & Kinzig A.P. (1993) Mutualism and competition between plants and decomposers-implications for nutrient allocation in ecosystems. *The American Naturalist* **141**, 829–84.
- Hayden B., McWilliam-Hughes S.M. & Cunjak R.A. (2016) Evidence for limited trophic transfer of allochthonous energy in temperate river food webs. *Freshwater Science* **35**, 544–558.
- Henderson R.J. & Tocher D.R. (1987) The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Progress in lipid research* **26**, 281–347.
- Hendrixson H.A., Sterner R.W. & Kay A.D. (2007) Elemental stoichiometry of freshwater fishes in relation to phylogeny, allometry and ecology. *Journal of Fish Biology* **70**, 121–140.
- Hessen D.O. & Leu E. (2006) Trophic transfer and trophic modification of fatty acids in high Arctic lakes. *Freshwater Biology* **51**, 1987–1998.
- Hieber M. & Gessner M.O. (2002) Contribution of stream detritivores, fungi, and bacteria to leaf breakdown based on biomass estimates. *Ecology* **83**, 1026–1038.
- Hill W.R., Ryon M.G. & Schilling E.M. (1995) Light Limitation in a Stream Ecosystem: Responses by Primary Producers and Consumers. *Ecology* **76**, 1297–1309.

I

- Ingold C.T. (1942) Aquatic hyphomycetes of decaying alder leaves. *Transactions of the British Mycological Society* **25**, 339IN1–417IN6.

J

- Jabiol J., Cornut J., Danger M., Jouffroy M., Elger A. & Chauvet E. (2014) Litter identity mediates predator impacts on the functioning of an aquatic detritus-based food web. *Oecologia* **176**, 225–235.
- Jażdżewski K. (1980) Range extensions of some gammaridean species in European inland waters caused by human activity. *Crustaceana. Supplement* **6**, 84–107.

- Jenkins G.B., Woodward G. & Hildrew A.G. (2013) Long-term amelioration of acidity accelerates decomposition in headwater streams. *Global Change Biology* **19**, 1100–1106.
- Johnson L.T., Tank J.L. & Arango C.P. (2009) The effect of land use on dissolved organic carbon and nitrogen uptake in streams. *Freshwater Biology* **54**, 2335–2350.

## K

- Kahlert M. & McKie B.G. (2014) Comparing new and conventional methods to estimate benthic algal biomass and composition in freshwaters. *Environ. Sci.: Processes Impacts* **16**, 2627–2634.
- Karaman G.S. & Pinkster S. (1977) Freshwater *Gammarus* species from Europe, North Africa and adjacent regions of Asia (Crustacea-Amphipoda). PART II. *Gammarus Roeseli*-group and related species. *Bijdragen Tot De Dierkunde* **47**, 165–196.
- Karr J.R. (1991) Biological Integrity: A Long-Neglected Aspect of Water Resource Management. *Ecological Applications* **1**, 66–84.
- Karr J.R. & Dudley D.R. (1981) Ecological perspective on water quality goals. *Environmental management* **5**, 55–68.
- Kattner G., Hirche H.-J. & Krause M. (1989) Spatial variability in lipid composition of calanoid copepods from Fram Strait, the Arctic. *Marine Biology* **102**, 473–480.
- Kaushik N.K. & Hynes B.N. (1968) Experimental Study on the Role of Autumnshed Leaves in Aquatic Environments. *Journal of Ecology* **56**, 229–243.
- Keeney D.R. & DeLuca T.H. (1993) Des Moines River Nitrate in Relation to Watershed Agricultural Practices: 1945 Versus 1980s. *Journal of Environmental Quality* **22**, 267–272.
- Kelly D.W., Dick J.T. & Montgomery W. (2002a) Predation on mayfly nymph, *Baetis rhodani*, by native and introduced *Gammarus*: direct effects and the facilitation of predation by salmonids. *Freshwater Biology* **47**, 1257–1268.
- Kelly D.W., Dick J.T. & Montgomery W.I. (2002b) The functional role of *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda): shredders, predators, or both? *Hydrobiologia* **485**, 199–203.
- Khériji S., El Cafsi M., Masmoudi W., Castell J.D. & Romdhane M.S. (2003) Salinity and temperature effects on the lipid composition of mullet sea fry (*Mugil cephalus*, Linne, 1758). *Aquaculture international* **11**, 571–582.
- Kilham S.S., Kreeger D.A., Lynn S.G., Goulden C.E. & Herrera L. (1998) COMBO: a defined freshwater culture medium for algae and zooplankton. *Hydrobiologia* **377**, 147–159.
- Klotz R.L. (1985) Factors controlling phosphorus limitation in stream sediments. *Limnology and Oceanography* **30**, 543–553.
- Knops J.M., Tilman D., Haddad N.M., Naeem S., Mitchell C.E., Haarstad J., *et al.* (1999) Effects of plant species richness on invasion dynamics, disease outbreaks, insect abundances and diversity. *Ecology Letters* **2**, 286–293.
- Knox J.C. (1977) Human impacts on Wisconsin Stream Channels. *Annals of the Association of American Geographers* **67**, 323–342.
- Kolanowski W., Stolyhwo A. & Grabowski M. (2007) Fatty Acid Composition of Selected Fresh Water Gammarids (Amphipoda, Crustacea): A Potentially Innovative Source of Omega-3 LC PUFA. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **84**, 827–833.

- Kooijman S.A.L.M. (2000) *Dynamic energy and mass budgets in biological systems*, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK ; New York, NY, USA.
- Kopacek J., Hejzlar J., Borovec J., Porcal P. & Kotorova I. (2000) Phosphorus inactivation by aluminum in the water column and sediments: Lowering of in-lake phosphorus availability in an acidified watershed–lake ecosystem. *Limnology and Oceanography* **45**, 212–225.
- Koussoroplis A., Bec A., Perga M., Koutrakis E., Desvillettes C. & Bourdier G. (2010) Nutritional importance of minor dietary sources for leaping grey mullet *Liza saliens* (Mugilidae) during settlement: insights from fatty acid  $\delta^{13}\text{C}$  analysis. *Marine Ecology Progress Series* **404**, 207–217.
- Koussoroplis A.-M. (2010) *Sources de carbone et d'acides gras essentiels pour les juvéniles de Liza saliens (Pisces, Mugilidae) dans le réseau trophique d'une lagune côtière méditerranéenne : approches in situ par biomarqueurs lipidiques et isotopiques*. Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II, Clermont-Ferrand.
- Koven W., van Anholt R., Lutzky S., Ben Atia I., Nixon O., Ron B., et al. (2003) The effect of dietary arachidonic acid on growth, survival, and cortisol levels in different-age gilthead seabream larvae (*Sparus auratus*) exposed to handling or daily salinity change. *Aquaculture* **228**, 307–320.
- Krauss G.-J., Solé M., Krauss G., Schlosser D., Wesenberg D. & Bärlocher F. (2011) Fungi in freshwaters: ecology, physiology and biochemical potential. *FEMS Microbiology Reviews* **35**, 620–651.
- Kunz P.Y., Kienle C. & Gerhardt A. (2010) *Gammarus* spp. in Aquatic Ecotoxicology and Water Quality Assessment: Toward Integrated Multilevel Tests. In: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 205. (Ed. D.M. Whitacre), pp. 1–76. Springer New York, New York, NY.

## L

- Lagroe C., Kominoski J.S., Danger M., Baudoin J.-M., Lamothe S., Lambrigtot D., et al. (2011) Experimental shading alters leaf litter breakdown in streams of contrasting riparian canopy cover: Experimental shading and litter breakdown dynamics. *Freshwater Biology* **56**, 2059–2069.
- Lancaster J., Real M., Juggins S., Monteith D.T., Flower R.J. & Beaumont W.R.C. (1996) Monitoring temporal changes in the biology of acid waters. *Freshwater Biology* **36**, 179–201.
- Lauridsen R.B., Edwards F.K., Cross W.F., Woodward G., Hildrew A.G. & Jones J.I. (2014) Consequences of inferring diet from feeding guilds when estimating and interpreting consumer-resource stoichiometry. *Freshwater Biology* **59**, 1497–1508.
- Lawrence G.B., David M.B., Lovett G.M., Murdoch P.S., Burns D.A., Stoddard J.L., et al. (1999) Soil Calcium Status and the Response of Stream Chemistry to Changing Acidic Deposition Rates. *Ecological Applications* **9**, 1059.
- Lawrence G.B., Hazlett P.W., Fernandez I.J., Ouimet R., Bailey S.W., Shortle W.C., et al. (2015) Declining Acidic Deposition Begins Reversal of Forest-Soil Acidification in the Northeastern U.S. and Eastern Canada. *Environmental Science & Technology* **49**, 13103–13111.
- Le Bihan M. (2009) *L'enterrement des cours d'eau de tete de basin en Moselle*. Université de Lorraine.

- Lecerf A. (2005) *Perturbations anthropiques et fonctionnement écologique des d'eau de tête de bassin-Etude du processus de décomposition des litières*. Université Toulouse 3 Paul Sabatier, Toulouse.
- Ledger M.E. & Hildrew A.G. (2000) Herbivory in an acid stream. *Freshwater Biology* **43**, 545–556.
- Lee R.F., Nevenzel J.C. & Paffenhöfer G.-A. (1971) Importance of wax esters and other lipids in the marine food chain: phytoplankton and copepods. *Marine Biology* **9**, 99–108.
- Leflaive J., Felten V., Ferriol J., Lamy A., Ten-Hage L., Bec A., *et al.* (2015) Community structure and nutrient level control the tolerance of autotrophic biofilm to silver contamination. *Environmental Science and Pollution Research* **22**, 13739–13752.
- Lepori F., Barbieri A. & Ormerod S.J. (2003) Effects of episodic acidification on macroinvertebrate assemblages in Swiss Alpine streams. *Freshwater Biology* **48**, 1873–1885.
- Likens G.E. (2009) *Encyclopedia of Inland Waters*, Elsevier. Academic Press, Oxford, UK.
- Likens G.E., Butler T.J. & Buso D.C. (2001) Long-and short-term changes in sulfate deposition: Effects of the 1990 Clean Air Act Amendments. *Biogeochemistry* **52**, 1–11.
- Likens G.E., Driscoll C.T. & Buso D.C. (1996) Long-term effects of acid rain-response and recovery of a forest ecosystem. *Science* **272**, 244–246.
- Lindeman R.L. (1942) The Trophic-Dynamic Aspect of Ecology. *Ecology* **23**, 399–417.
- Lohman K., Jones J.R. & Baysinger-Daniel C. (1991) Experimental Evidence for Nitrogen Limitation in a Northern Ozark Stream. *Journal of the North American Benthological Society* **10**, 14–23.

## M

- MacDonald L.H. & Coe D. (2007) Influence of headwater streams on downstream reaches in forested areas. *Forest Science* **53**, 148–168.
- MacNeil C., Dick J.T. & Elwood R.W. (1997) The trophic ecology of freshwater *Gammarus* spp. (Crustacea: Amphipoda): problems and perspectives concerning the functional feeding group concept. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **72**, 349–364.
- MacNeil C., Dick J.T.A. & Elwood R.W. (1999) The dynamics of predation on *Gammarus* spp. (Crustacea: Amphipoda). *Biological Reviews* **74**, 375–395.
- Majdi N., Tackx M. & Buffan-Dubau E. (2012) Trophic positioning and microphytobenthic carbon uptake of biofilm-dwelling meiofauna in a temperate river. *Freshwater Biology* **57**, 1180–1190.
- Makhutova O.N., Kalachova G.S. & Gladyshev M.I. (2003) A comparison of the fatty acid composition of *Gammarus lacustris* and its food sources from a freshwater reservoir, Bugach, and the saline Lake Shira in Siberia, Russia. *Aquatic Ecology* **37**, 159–167.
- Malcolm I.A., Bacon P.J., Middlemas S.J., Fryer R.J., Shilland E.M. & Collen P. (2014a) Relationships between hydrochemistry and the presence of juvenile brown trout (*Salmo trutta*) in headwater streams recovering from acidification. *Ecological Indicators* **37**, 351–364.
- Malcolm I.A., Gibbins C.N., Fryer R.J., Keay J., Tetzlaff D. & Soulsby C. (2014b) The influence of forestry on acidification and recovery: Insights from long-term hydrochemical and invertebrate data. *Ecological Indicators* **37**, 317–329.
- Maltby L. (1996) Detritus processing. In: *River Biota: Diversity and Dynamics*, Blackwell Science. (Eds G. Petts & P. Calow), pp. 145–167. Oxford, UK.

- Martin-Creuzburg D. & von Elert E. (2009) Good food versus bad food: the role of sterols and polyunsaturated fatty acids in determining growth and reproduction of *Daphnia magna*. *Aquatic Ecology* **43**, 943–950.
- Martinson H.M., Schneider K., Gilbert J., Hines J.E., Hambäck P.A. & Fagan W.F. (2008) Detritivory: stoichiometry of a neglected trophic level. *Ecological Research* **23**, 487–491.
- Marzetz V., Koussoroplis A.-M., Martin-Creuzburg D., Striebel M. & Wacker A. (2017) Linking primary producer diversity and food quality effects on herbivores: A biochemical perspective. *Scientific Reports* **7**.
- Masclaux H., Bec A., Kainz M.J., Desvillettes C., Jouve L. & Bourdier G. (2009) Combined effects of food quality and temperature on somatic growth and reproduction of two freshwater cladocerans. *Limnology and Oceanography* **54**, 1323–1332.
- Masuda R. & Tsukamoto K. (1999) School formation and concurrent developmental changes in carangid fish with reference to dietary conditions. *Environmental Biology of Fishes* **56**, 243–252.
- McMeans B.C., Koussoroplis A.-M., Arts M.T. & Kainz M.J. (2015) Terrestrial dissolved organic matter supports growth and reproduction of *Daphnia magna* when algae are limiting. *Journal of Plankton Research* **37**, 1201–1209.
- Medeiros A.O., Pascoal C. & Graça M.A.S. (2009) Diversity and activity of aquatic fungi under low oxygen conditions. *Freshwater Biology* **54**, 142–149.
- Merritt M.V., Rosenstein S.P., Rachel C.L., Chou H. & Allen M.M. (1991) A comparison of the major lipid classes and fatty acid composition of marine unicellular cyanobacteria with freshwater species. *Archives of microbiology* **155**, 107–113.
- Mersch J., Guérol F., Rousselle P. & Pihan J.-C. (1993) Transplanted aquatic mosses for monitoring trace metal mobilization in acidified streams of the Vosges Mountains, France. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* **51**, 255–259.
- Methvin B.R. & Suberkropp K. (2003) Annual production of leaf-decaying fungi in 2 streams. *Journal of the North American Benthological Society* **22**, 554–564.
- Meyer J.L., Strayer D.L., Wallace J.B., Eggert S.L., Helfman G.S. & Leonard N.E. (2007) The Contribution of Headwater Streams to Biodiversity in River Networks. *JAWRA Journal of the American Water Resources Association* **43**, 86–103.
- Meyer J.L. & Wallace J.B. (2001) Lost linkages and lotic ecology: rediscovering small streams. In: *Ecology: Achievement and challenge*, The 41st Symposium of the British Ecological Society jointly sponsored by the Ecological Society of America. (Eds M.C. Press, N.J. Huntly & S. Levin), pp. 295–317. Blackwell Scientific Publications, Orlando, Florida, USA.
- Meyer J.L., Wallace J.B. & Eggert S.L. (1998) Leaf litter as a source of dissolved organic carbon in streams. *Ecosystems* **1**, 240–249.
- Mille-Lindblom C. & Tranvik L.J. (2003) Antagonism between Bacteria and Fungi on Decomposing Aquatic Plant Litter. *Microbial Ecology* **45**, 173–182.
- Millennium Ecosystem Assessment (2005) *Ecosystems and human well-being: synthesis*. Island Press, Washington, DC.
- Millennium Ecosystem Assessment (2005b) *Millennium Ecosystem Assessment Findings*. Millennium Ecosystem Assessment.
- Ministre de l'écologie, du développement durable et de l'énergie (2015) Instruction du Gouvernement du 3 juin 2015 relative à la cartographie et l'identification des cours d'eau et à leur entretien.
- Minshall G.W. (1978) Autotrophy in stream ecosystems. *BioScience* **28**, 767–771.

- Minshall G.W. (1996) Bringing biology back into water quality assessments. In: *Freshwater Ecosystems: Revitalizing Educational Programs in Limnology*. (Ed. Committee on Inland Aquatic ecosystems), pp. 289–324. Water Science and Technology Board, Commission on Geosciences, National Research Council, Washington, DC, USA.
- Minshall G.W. (1967) Role of Allochthonous Detritus in the Trophic Structure of a Woodland Springbrook Community. *Ecology* **48**, 139–149.
- Minshall G.W., Petersen R.C., Cummins K.W., Bott T.L., Sedell J.R., Cushing C.E., *et al.* (1983) Interbiome Comparison of Stream Ecosystem Dynamics. *Ecological Monographs* **53**, 1–25.
- Moe S.J., Stelzer R.S., Forman M.R., Harpole W.S., Daufresne T. & Yoshida T. (2005) Recent advances in ecological stoichiometry: insights for population and community ecology. *Oikos* **109**, 29–39.
- Monteith D.T., Hildrew A.G., Flower R.J., Raven P.J., Beaumont W.R.B., Collen P., *et al.* (2005) Biological responses to the chemical recovery of acidified fresh waters in the UK. *Environmental Pollution* **137**, 83–101.
- Moore J.C., Berlow E.L., Coleman D.C., Ruitter P.C., Dong Q., Hastings A., *et al.* (2004) Detritus, trophic dynamics and biodiversity: Detritus, trophic dynamics and biodiversity. *Ecology Letters* **7**, 584–600.
- Mulholland P.J., Fellows C.S., Tank J.L., Grimm N.B., Webster J.R., Hamilton S.K., *et al.* (2001) Inter-biome comparison of factors controlling stream metabolism. *Freshwater Biology* **46**, 1503–1517.
- Mulholland P.J., Palumbo A.V., Elwood J.W. & Rosemond A.D. (1987) Effects of Acidification on Leaf Decomposition in Streams. *Journal of the North American Benthological Society* **6**, 147–158.
- Müller-Navarra D.C. (1995) Biochemical versus mineral limitation in Daphnia. *Limnology and Oceanography* **40**, 1209–1214.
- Müller-Navarra D.C., Brett M.T., Liston A.M. & Goldman C.R. (2000) A highly unsaturated fatty acid predicts carbon transfer between primary producers and consumers. *Nature* **403**, 74–77.
- Münster U. & Chrost R.J. (1990) Origin, Composition, and Microbial Utilization of Dissolved Organic Matter. In: *Aquatic Microbial Ecology: Biochemical and Molecular Approaches*, Springer Verlag. (Eds J. Overbeck & R.J. Chrost), pp. 8–46. New York. 190 pp.
- Muscutt A.D., Harris G.L., Bailey S.W. & Davies D.B. (1993) Buffer zones to improve water quality: a review of their potential use in UK agriculture. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **45**, 59–77.
- Musolff A., Selle B., Büttner O., Opitz M. & Tittel J. (2017) Unexpected release of phosphate and organic carbon to streams linked to declining nitrogen depositions. *Global Change Biology* **23**, 1891–1901.
- Myers R.L. (2003) *The basics of chemistry*. Greenwood Press, Westport, Conn.

## N

- Napolitano G.E. (1998) Fatty Acids as Trophic and Chemical Markers in Freshwater Ecosystems. In: *Lipids in freshwater Ecosystems*, Springer-Verlag. (Eds M.T. Arts & B.C. Wainmann), pp. 21–44. Springer New York, New York.

- Navel S., Simon L., Lecuyer C., Fourel F. & Mermillod-Blondin F. (2011) The shredding activity of gammarids facilitates the processing of organic matter by the subterranean amphipod *Niphargus rhenorhodanensis*. *Freshwater Biology* **56**, 481–490.
- Nedeltcheva T. (2005) *Analyse spatiale de la composition chimique des ruisseaux vosgiens*. Université Henri Poincaré-Nancy 1, Nancy.
- Nelson D. (2011) Gammarus-Microbial Interactions : A Review. *International Journal of Zoology* **2011**, 1–6.
- Newbold J.D., Elwood J.W., O'Neill R.V. & Winkle W.V. (1981) Measuring nutrient spiralling in streams. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **38**, 860–863.
- Niyogi D.K., Lewis W.M. & McKnight D.M. (2001) Litter breakdown in mountain streams affected by mine drainage: biotic mediation of abiotic controls. *Ecological Applications* **11**, 506–516.
- Niyogi D.K., Simon K.S. & Townsend C.R. (2003) Breakdown of tussock grass in streams along a gradient of agricultural development in New Zealand. *Freshwater Biology* **48**, 1698–1708.
- Nykvist N. (1962) Leaching and Decomposition of Litter V. Experiments on Leaf Litter of *Alnus glutinosa*, *Fagus silvatica* and *Quercus robur*. *Oikos* **13**, 232.

O

- O'Brien A., Townsend K., Hale R., Sharley D. & Pettigrove V. (2016) How is ecosystem health defined and measured? A critical review of freshwater and estuarine studies. *Ecological Indicators* **69**, 722–729.
- Odum E.P. (1975) *Ecology: the link between the natural and the social sciences*, 2nd edition. Holt, Rinehart & Winston.
- Odum E.P. ed. (1971) *Fundamentals of Ecology*, 3rd edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Odum H.T. (1956) Primary Production in Flowing Waters. *Limnology and Oceanography* **1**, 102–117.
- Oksanen J., Blanchet F.G., Kindt R., Legendre P., Minchin P.R., O'Hara R.B., *et al.* (2016) vegan: Community Ecology Package. R package version 2.3-5.
- Olsen Y. (1998) Lipids and Essential Fatty Acids in Aquatic Food Webs: What Can Freshwater Ecologists Learn from Mariculture? In: *Lipids in freshwater ecosystems*, Springer-Verlag. (Eds M.T. Arts & B.C. Wainman), pp. 161–202. Springer New York, New York, NY.
- Olson J.S. (1963) Energy Storage and the Balance of Producers and Decomposers in Ecological Systems. *Ecology* **44**, 322–331.
- Ormaza-González F.I. & Statham P.J. (1996) A comparison of methods for the determination of dissolved and particulate phosphorus in natural waters. *Water Research* **30**, 2739–2747.

P

- Paerl H.W. & Paul V.J. (2012) Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Research* **46**, 1349–1363.
- Pan Y., Herlihy A., Kaufmann P., Wigington J., Van Sickle J. & Moser T. (2004) Linkages among land-use, water quality, physical habitat conditions and lotic diatom assemblages: a multi-spatial scale assessment. *Hydrobiologia* **515**, 59–73.

- Parlement et Conseil Européen (2000) *Directive 2000/60/CE du parlement Européen et du conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau*. Journal Officiel.
- Parrish C.C. (1998) Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples. In: *Lipids in freshwater ecosystems*, Springer-Verlag. (Eds M.T. Arts & B.C. Wainman), pp. 4–20. Springer New York, New York, NY.
- Pastor A., Lupon A., Gomez-Gener L., Rodriguez-Castillo T., Abril M., Arce M.I., *et al.* (2017) Local and regional drivers of headwater streams metabolism: insights from the first ALL collaborative project. *Limnetica* **36**, 67–85.
- Peeters E.T.H.M. & Gardeniers J.J.P. (1998) Logistic regression as a tool for defining habitat requirements of two common gammarids. *Freshwater Biology* **39**, 605–615.
- Petersen R.C. & Cummins K.W. (1974) Leaf processing in a woodland stream. *Freshwater Biology* **4**, 343–368.
- Pierre J.-F. (1996) Communauté algale et acidité des ruisseaux du massif vosgien. *Bulletin des Académie et Société Lorraines des Sciences* **35**, 139–156.
- Pöckl M., Webb B.W. & Sutcliffe D.W. (2003) Life history and reproductive capacity of *Gammarus fossarum* and *G. roeseli* (Crustacea: Amphipoda) under naturally fluctuating water temperatures: a simulation study. *Freshwater Biology* **48**, 53–66.
- Polis G.A. & Strong D.R. (1996) Food web complexity and community dynamics. *The American Naturalist* **147**, 813–846.
- Powers S.M., Tank J.L. & Robertson D.M. (2015) Control of nitrogen and phosphorus transport by reservoirs in agricultural landscapes. *Biogeochemistry* **124**, 417–439.
- Puckett L.J. & Hughes W.B. (2005) Transport and Fate of Nitrate and Pesticides. *Journal of Environment Quality* **34**, 2278.

## R

- R Development Core Team (2015) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ramade F. ed. (2008) *Dictionnaire encyclopédique des sciences de la nature et de la biodiversité*. Dunod, Paris.
- Reuss N. & Poulsen L. (2002) Evaluation of fatty acids as biomarkers for a natural plankton community. A field study of a spring bloom and a post-bloom period off West Greenland. *Marine Biology* **141**, 423–434.
- Ribblett S.G., Palmer M.A. & Wayne Coats D. (2005) The importance of bacterivorous protists in the decomposition of stream leaf litter. *Freshwater Biology* **50**, 516–526.
- Risse-Buhl U., Karsubke M., Schlieff J., Baschien C., Weitere M. & Mutz M. (2012) Aquatic protists modulate the microbial activity associated with mineral surfaces and leaf litter. *Aquatic Microbial Ecology* **66**, 133–147.
- Romaní A.M., Fischer H., Mille-Lindblom C. & Tranvik L.J. (2006) Interactions of Bacteria and Fungi on decomposing Litter-Differential Extracellular enzyme Activities. *Ecology* **87**, 2559–2569.
- Romaní A.M. & Sabater S. (2001) Structure and Activity of Rock and Sand Biofilms in a Mediterranean Stream. *Ecology* **82**, 3232.
- Rosemond A.D., Pringle C.M., Ramirez A. & Paul M.J. (2001) A Test of Top-down and Bottom-up Control in a Detritus-Based Food Web. *Ecology* **82**, 2279.

Rosenfeld J. & Roff J.C. (1991) Primary production and potential availability of autochthonous carbon in southern Ontario streams. *Hydrobiologia* **224**, 99–109.

## S

- Sabater S., Guasch H., Romaní A.M. & Muñoz I. (2002) The effect of biological factors on the efficiency of river biofilms in improving water quality. *Hydrobiologia* **469**, 149–156.
- Salunke D., Mangalekar R., Kuvalekar A. & Harsulkar A. (2014) Bioconversion of Alpha-Linolenic Acid into Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids by Oleaginous Fungi. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* **5**, 27–35.
- Sargent J., Bell G., McEvoy L., Tocher D. & Estevez A. (1999) Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* **177**, 191–199.
- Sargent J.R., Bell J.G., Bell M.V., Henderson R.J. & Tocher D.R. (1995) Requirement criteria for essential fatty acids. *Journal of applied Ichthyology* **11**, 183–198.
- Schaefer M. (1991) The animal community: diversity and resources. In: *Temperate deciduous forests. Ecosystems of the World 7*. (Eds E. Rohrig & B. Ulrich), pp. 51–120. Elsevier, Amsterdam.
- Schindler D.W. (1988) Effects of Acid Rain on Freshwater Ecosystems. *Science*, 149–157.
- Schlechtriem C., Arts M.T. & Zellmer I.D. (2006) Effect of temperature on the fatty acid composition and temporal trajectories of fatty acids in fasting *Daphnia pulex* (Crustacea, Cladocera). *Lipids* **41**, 397–400.
- Schmitz G. & Ecker J. (2008) The opposing effects of *n*-3 and *n*-6 fatty acids. *Progress in Lipid Research* **47**, 147–155.
- Schumm S.A. (1956) Evolution of drainage systems and slopes in badland at Perth Amboy, New Jersey. *Bulletin of Geological Society of America* **67**, 597–646.
- Scribe P., Fillaux J., Laureillard J., Denant V. & Saliot A. (1991) Fatty acids as biomarkers of planktonic inputs in the stratified estuary of the Krka River, Adriatic Sea: relationship with pigments. *Marine Chemistry* **32**, 299–312.
- Shelton L.R. (1994) *Field guide for collecting and processing stream-water samples for the national water-quality assessment program*. Sacramento, California.
- Short R.A. & Maslin P.E. (1977) Processing of Leaf Litter by a Stream Detritivore: Effect on Nutrient Availability to Collectors. *Ecology* **58**, 935–938.
- Sigee D.C. (2005) *Freshwater microbiology: biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the aquatic environment*. J. Wiley, Hoboken, NJ.
- Simon K.S., Simon M.A. & Benfield E.F. (2009) Variation in Ecosystem Function in Appalachian Streams along an Acidity Gradient. *Ecological Applications* **19**, 1147–1160.
- Sinsabaugh R., Zak D., Gallo M., Lauber C. & Amonette R. (2004) Nitrogen deposition and dissolved organic carbon production in northern temperate forests. *Soil Biology and Biochemistry* **36**, 1509–1515.
- Sinsabaugh R.L., Antibus R.K. & Linkins A.E. (1991) An enzymic approach to the analysis of microbial activity during plant litter decomposition. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **34**, 43–54.
- Sinsabaugh R.L., Hill B.H. & Follstad Shah J.J. (2009) Ecoenzymatic stoichiometry of microbial organic nutrient acquisition in soil and sediment. *Nature* **462**, 795–798.

- Sinsabaugh R.L., Linkins A.E. & Benfield E.F. (1985) Cellulose Digestion and Assimilation by Three Leaf-shredding Aquatic Insects. *Ecology* **66**, 1464–1471.
- Sinsabaugh R.L., Moorhead D.L. & Linkins A.E. (1994) The enzymic basis of plant litter decomposition: emergence of an ecological process. *Applied Soil Ecology* **1**, 97–111.
- Skei J., Larsson P., Rosenberg R., Jonsson P., Olsson M. & Broman D. (2000) Eutrophication and Contaminants in Aquatic Ecosystems. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* **29**, 184–194.
- Skjelkvåle B.L., Stoddard J.L., Jeffries D.S., Tørseth K., Høgåsen T., Bowman J., *et al.* (2005) Regional scale evidence for improvements in surface water chemistry 1990–2001. *Environmental Pollution* **137**, 165–176.
- Smith K.L., Bryan G.W. & Harwood J.L. (1985) Changes in endogenous fatty acids and lipid synthesis associated with copper pollution in *Fucus* spp. *Journal of experimental botany* **36**, 663–669.
- Smits A.P., Schindler D.E. & Brett M.T. (2015) Geomorphology controls the trophic base of stream food webs in a boreal watershed. *Ecology* **96**, 1775–1782.
- Spitoni M. (2013) *Influence de l'occupation et de l'utilisation du sol sur les propriétés physiques, chimiques et biologiques des cours d'eau de tête de bassins versants*. Université de Strasbourg.
- St. John M. & Lund T. (1996) Lipid biomarkers: linking the utilization of frontal plankton biomass to enhanced condition of juvenile North Sea cod. *Marine Ecology-Progress Series* **131**, 75–85.
- Stanford J.A. (2006) Landscapes and riverscapes. In: *Methods in Stream ecology*, 2nd ed. (Eds F.R. Hauer & G.A. Lamberti), pp. 3–21. Academic Press/Elsevier, San Diego, Calif.
- Steinman A.D., McIntire C.D., Gregory S.V., Lamberti G.A. & Ashkenas L.R. (1987) Effects of herbivore type and density on taxonomic structure and physiognomy of algal assemblages in laboratory streams. *Journal of the North American Benthological Society* **6**, 175–188.
- Sterner R.W. & Elser J.J. (2002) Stoichiometry and Homeostasis. In: *Ecological Stoichiometry: The Biology of Elements from Molecules to the Biosphere*, Princeton University Press. (Eds R.W. Sterner & J.J. Elser), pp. 2–43. Princeton, NJ, USA.
- Stoddard J.L., Jeffries D.S., Lükewille A., Clair T.A., Dillon P.J., Driscoll C.T., *et al.* (1999) Regional trends in aquatic recovery from acidification in North America and Europe. *Nature* **401**, 575–578.
- Stokes P.M. (1986) Ecological effects of acidification on primary producers in aquatic systems. In: *Acidic Precipitation*. pp. 421–438. Springer.
- Strahler A.N. (1957) Quantitative Analysis of Watershed Geomorphology. *Transaction, American Geophysical Union* **38**, 913–920.
- Suberkropp K. (1997) Annual production of leaf-decaying fungi in a woodland stream. *Freshwater Biology* **38**, 169–178.
- Suberkropp K. (2003) Methods for examining interactions between freshwater fungi and macroinvertebrates. In: *Freshwater Mycology*. (Eds C.K. Tsui & K.D. Hyde), pp. 159–171. Fungal Diversity Press, Honk-Kong, China.
- Suberkropp K. (1991) Relationships between growth and sporulation of aquatic hyphomycetes on decomposing leaf litter. *Mycological Research* **95**, 843–850.
- Suberkropp K. (1995) The influence of nutrients on fungal growth, productivity, and sporulation during leaf breakdown in streams. *Canadian Journal of Botany* **73**, 1361–1369.

- Suberkropp K., Godshalk G.L. & Klug M.J. (1976) Changes in the Chemical Composition of Leaves During Processing in a Woodland Stream. *Ecology* **57**, 720–727.
- Suberkropp K. & Klug M.J. (1976) Fungi and Bacteria Associated with Leaves During Processing in a Woodland Stream. *Ecology* **57**, 707–719.
- Swaffar S.M. & O'Brien W.J. (1996) Spines of *Daphnia lumholtzi* create feeding difficulties for juvenile bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Journal of Plankton Research* **18**, 1055–1061.

## T

- Tank J.L. & Dodds W.K. (2003) Nutrient limitation of epilithic and epixylic biofilms in ten North American streams. *Freshwater Biology* **48**, 1031–1049.
- Thiébaud G., Guérol F. & Muller S. (1995) Impact de l'acidification des eaux sur les macrophytes aquatiques dans les eaux faiblement minéralisées des Vosges du Nord. Premiers résultats. *Acta Botanica Gallica* **142**, 617–626.
- Thiébaud G. & Muller S. (1999) A macrophyte communities sequence as an indicator of eutrophication and acidification levels in weakly mineralised streams in north-eastern France. *Hydrobiologia* **410**, 17–24.
- Thiebaut G., Vanderpoorten A., Guerold F., Boudot J.-P. & Muller S. (1998) Bryological patterns and streamwater acidification in the Vosges Mountains (NE France): an analysis tool for the survey of acidification processes. *Chemosphere* **36**, 1275–1289.
- Tilman D., Kilham S.S. & Kilham P. (1982) Phytoplankton Community Ecology: The Role of Limiting Nutrients. *Annual Review of Ecology and Systematics* **13**, 349–372.
- Tixier G., Felten V. & Guérol F.A. (2009) Life cycle strategies of Baetis species (Ephemeroptera, Baetidae) in acidified streams and implications for recovery. *Fundamental and Applied Limnology / Archiv für Hydrobiologie* **174**, 227–243.
- Toman M.J. & Dall P.C. (1998) Respiratory levels and adaptations in four freshwater species of *Gammarus* (Crustacea: Amphipoda). *International review of hydrobiology* **83**, 251–263.
- Torres-Ruiz M. & Wehr J.D. (2010) Changes in the nutritional quality of decaying leaf litter in a stream based on fatty acid content. *Hydrobiologia* **651**, 265–278.
- Torres-Ruiz M., Wehr J.D. & Perrone A.A. (2010) Are net-spinning caddisflies what they eat? An investigation using controlled diets and fatty acids. *Journal of the North American Benthological Society* **29**, 803–813.
- Torres-Ruiz M., Wehr J.D. & Perrone A.A. (2007) Trophic relations in a stream food web: importance of fatty acids for macroinvertebrate consumers. *Journal of the North American Benthological Society* **26**, 509–522.
- Turner M.A., Jackson M.B., Findlay D.L., Graham R.W., DeBruyn E.R. & Vandermeer E.M. (1987) Early responses of periphyton of an experimental lake acidification. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **44**, s135–s149.
- Turner R.E. & Rabalais N.N. (2003) Linking landscape and water quality in the Mississippi River basin for 200 years. *BioScience* **53**, 563–572.

- Uriarte M., Yackulic C.B., Lim Y. & Arce-Nazario J.A. (2011) Influence of land use on water quality in a tropical landscape: a multi-scale analysis. *Landscape Ecology* **26**, 1151–1164.
- U.S. Department of the Interior & U.S. Geological Survey (2016) Where is Earth's water ? USGS Water-Science School. *USGS science for a changing world*.

## V

- Väinölä R., Witt J.D.S., Grabowski M., Bradbury J.H., Jazdzewski K. & Sket B. (2008) Global diversity of amphipods (Amphipoda; Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia* **595**, 241–255.
- Van Anholt R.D., Spannings F.A.T., Koven W.M., Nixon O. & Wendelaar Bonga S.E. (2004) Arachidonic acid reduces the stress response of gilthead seabream *Sparus aurata* L. *Journal of Experimental Biology* **207**, 3419–3430.
- Van Dokkum H.P., Slijkerman D.M.E., Rossi L. & Costantini M.L. (2002) Variation in the decomposition of *Phragmites australis* litter in a monomictic lake: the role of gammarids. *Hydrobiologia* **482**, 69–77.
- Van Dyk M.S., Kock J.L.F. & Botha A. (1994) Hydroxy long-chain fatty acids in fungi. *World journal of microbiology & biotechnology* **10**, 495–504.
- Vannote R.L., Minshall G.W., Cummins K.W., Sedell J.R. & Cushing C.E. (1980) The River Continuum Concept. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **37**, 130–137.
- Vargas M.A., Rodriguez H., Moreno J., Olivares H., Del Campo J.A., Rivas J., *et al.* (1998) Biochemical composition and fatty acid content of filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria. *Journal of phycology* **34**, 812–817.
- Viso A.-C. & Marty J.-C. (1993) Fatty acids from 28 marine microalgae. *Phytochemistry* **34**, 1521–1533.
- Vitousek P.M. & Farrington H. (1997) Nutrient limitation and soil development: experimental test of a biogeochemical theory. *Biogeochemistry* **37**, 63–75.
- Volkman J.K., Barrett S.M., Blackburn S.I., Mansour M.P., Sikes E.L. & Gelin F. (1998) Microalgal biomarkers: A review of recent research developments.pdf. *Organic Geochemistry* **29**, 1163–1179.
- Volkman J.K., Jeffrey S.W., Nichols P.D., Rogers G.I. & Garland C.D. (1989) Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **128**, 219–240.
- Vörösmarty C.J., McIntyre P.B., Gessner M.O., Dudgeon D., Prusevich A., Green P., *et al.* (2010) Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature* **467**, 555–561.
- Vrebos D., Beauchard O. & Meire P. (2017) The impact of land use and spatial mediated processes on the water quality in a river system. *Science of The Total Environment* **601–602**, 365–373.

## W

- Waldner P., Marchetto A., Thimonier A., Schmitt M., Rogora M., Granke O., *et al.* (2014) Detection of temporal trends in atmospheric deposition of inorganic nitrogen and sulphate to forests in Europe. *Atmospheric Environment* **95**, 363–374.
- Wallace J.B., Eggert S.L., Meyer J.L. & Webster J.R. (1999) Effects of resource limitation on a detrital-based ecosystem. *Ecological Monographs* **69**, 409–442.
- Wallace J.B. & Webster J.R. (1996) The Role of Macroinvertebrates in Stream Ecosystem Function-Zoobenthic species influence energy flows and nutrient cycling. *Annual Review of Entomology* **41**, 115–139.
- Wallace J.B., Webster J.R. & Cuffney T.F. (1982) Stream Detritus Dynamics: Regulation by Invertebrate Consumers. *Oecologia* **53**, 197–200.
- Wallis J.G., Watts J.L. & Browse J. (2002) Polyunsaturated fatty acids synthesis: what will they think of next? *Trends in Biochemical Sciences* **27**, 467–473.
- Wassall S.R., Brzustowicz M.R., Shaikh S.R., Cherezov V., Caffrey M. & Stillwell W. (2004) Order from disorder, corralling cholesterol with chaotic lipids. The role of polyunsaturated lipids in membrane raft formation. *Chemistry and Physics of Lipids* **132**, 79–88.
- Webster J. & Davey R.A. (1984) Sigmoid conidial shape in aquatic fungi. *Transactions of the British Mycological Society* **83**, 43–52.
- Webster J.R. (1987) Convergent evolution and the functional significance of spore shape in aquatic and semi-aquatic fungi. In: *Evolutionary biology of the fungi*. (Eds A.D.M. Rayner, C.M. Brasier & D. Moore), pp. 191–201. University Press, Cambridge.
- Webster J.R. & Benfield E.F. (1986) Vascular plant breakdown in freshwater ecosystems. *Annual review of ecology and systematics* **17**, 567–594.
- Webster J.R. & Descals E. (1981) Morphology, distribution, and ecology of conidial fungi in freshwater habitats. In: *Biology of conidial fungi*, Academic Press. (Eds G.T. Cole & B. Kendrick), pp. 295–355. London.
- Woods H.A., Fagan W.F., Elser J.J. & Harrison J.F. (2004) Allometric and phylogenetic variation in insect phosphorus content.pdf. *Functional Ecology* **18**, 103–109.
- Woodward G., Gessner\* M.O., Giller P.S., Gulis V., Hladyz S., Lecerf A., *et al.* (2012) Continental-Scale Effects of Nutrient Pollution on Stream Ecosystem Functioning. *Science* **336**, 1438–1440.

Y

- Young R.G. & Collier K.J. (2009) Contrasting responses to catchment modification among a range of functional and structural indicators of river ecosystem health. *Freshwater Biology* **54**, 2155–2170.
- Young R.G., Matthaei C.D. & Townsend C.R. (2008) Organic matter breakdown and ecosystem metabolism: functional indicators for assessing river ecosystem health. *Journal of the North American Benthological Society* **27**, 605–625.

Z

- Zhou B., Xu Y., Vogt R.D., Lu X., Li X., Deng X., *et al.* (2016) Effects of Land Use Change on Phosphorus Levels in Surface Waters—a Case Study of a Watershed Strongly Influenced by Agriculture. *Water, Air, & Soil Pollution* **227**.

- Zubrod J.P., Baudy P., Schulz R. & Bundschuh M. (2014) Effects of current-use fungicides and their mixtures on the feeding and survival of the key shredder *Gammarus fossarum*. *Aquatic Toxicology* **150**, 133–143.
- Zubrod J.P., Englert D., Lüderwald S., Poganiuch S., Bundschuh M. & Schulz R. (2017a) History matters: pre-exposure to wastewater enhances pesticide toxicity in invertebrates. *Environmental Science & Technology*.
- Zubrod J.P., Englert D., Wolfram J., Rosenfeldt R.R., Feckler A., Bundschuh R., *et al.* (2017b) Long-term effects of fungicides on leaf-associated microorganisms and shredder populations-an artificial stream study: Long-term fungicide effects on microbes and shredders. *Environmental Toxicology and Chemistry*.
- Zubrod J.P., Englert D., Wolfram J., Wallace D., Schnetzer N., Baudy P., *et al.* (2015a) Waterborne toxicity and diet-related effects of fungicides in the key leaf shredder *Gammarus fossarum* (Crustacea: Amphipoda). *Aquatic Toxicology* **169**, 105–112.
- Zubrod J.P., Feckler A., Englert D., Koksharova N., Rosenfeldt R.R., Seitz F., *et al.* (2015b) Inorganic fungicides as routinely applied in organic and conventional agriculture can increase palatability but reduce microbial decomposition of leaf litter. *Journal of Applied Ecology* **52**, 310–322.

# Annexes

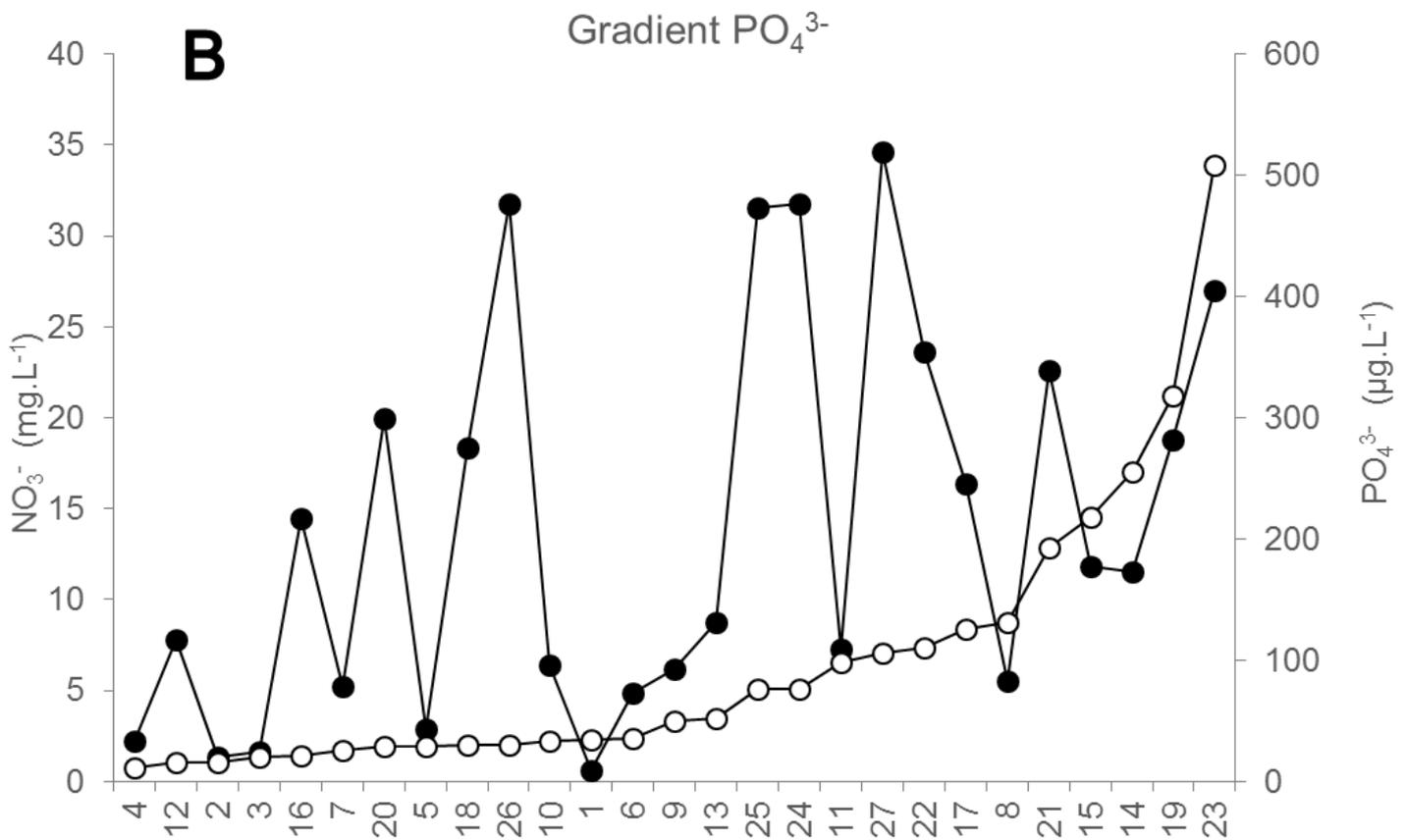
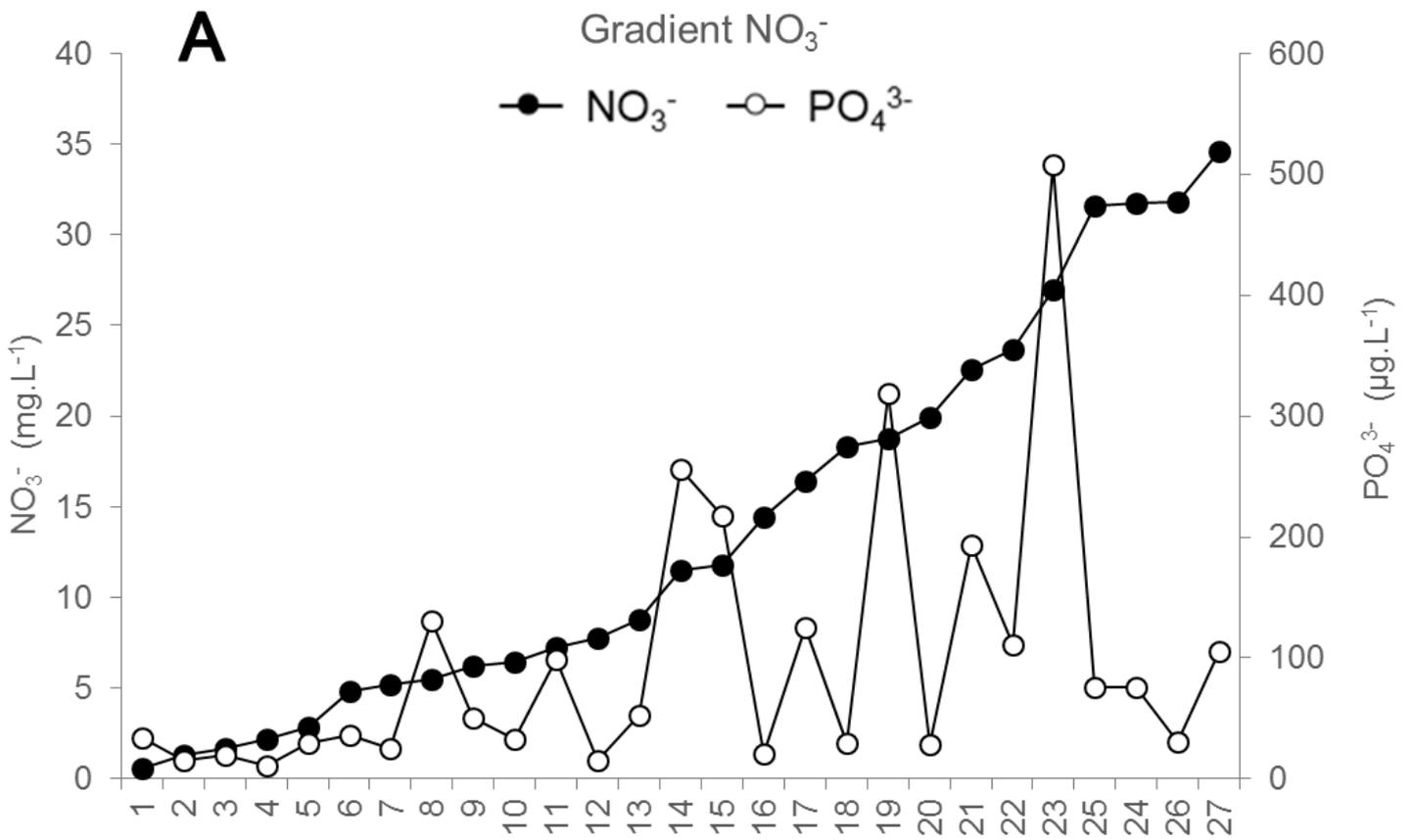


Annexe 1 : Complément du **Tableau 3**, Paramètres chimiques des sites d'études en 1998-99 et 2014-15.

Site	Conductivité ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )				$\text{Na}^+$ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )				$\text{K}^+$ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )				$\text{Cl}^-$ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )			
	1998-99		2014-15		1998-99		2014-15		1998-99		2014-15		1998-99		2014-15	
	Moy. $\pm$ Et.	Moy. $\pm$ Et.	Moy. $\pm$ Et.	Moy. $\pm$ Et.	Moy. $\pm$ Et.	Moy. $\pm$ Et.	Moy. $\pm$ Et.	Moy. $\pm$ Et.	Moy. $\pm$ Et.	Moy. $\pm$ Et.	Moy. $\pm$ Et.	Moy. $\pm$ Et.	Moy. $\pm$ Et.	Moy. $\pm$ Et.	Moy. $\pm$ Et.	
BR	20,09 $\pm$ 1,85	14,49 $\pm$ 1,04	1,16 $\pm$ 0,10	0,95 $\pm$ 0,12	0,22 $\pm$ 0,08	0,16 $\pm$ 0,05	1,23 $\pm$ 0,35	0,93 $\pm$ 0,11								
CH	57,66 $\pm$ 5,23	44,31 $\pm$ 6,07	1,63 $\pm$ 0,16	1,24 $\pm$ 0,09	2,07 $\pm$ 0,17	1,57 $\pm$ 0,11	2,79 $\pm$ 0,51	1,92 $\pm$ 0,08								
EC	17,30 $\pm$ 1,31	17,34 $\pm$ 5,99	1,40 $\pm$ 0,13	1,27 $\pm$ 0,14	0,16 $\pm$ 0,05	0,12 $\pm$ 0,04	0,96 $\pm$ 0,09	0,86 $\pm$ 0,11								
GC	20,58 $\pm$ 2,50	15,50 $\pm$ 1,77	1,34 $\pm$ 0,11	1,03 $\pm$ 0,16	0,33 $\pm$ 0,05	0,21 $\pm$ 0,06	1,29 $\pm$ 0,40	0,93 $\pm$ 0,13								
GS	38,94 $\pm$ 4,12	24,19 $\pm$ 1,90	0,92 $\pm$ 0,05	0,63 $\pm$ 0,04	1,06 $\pm$ 0,06	0,84 $\pm$ 0,09	1,77 $\pm$ 0,45	1,07 $\pm$ 0,09								
HR	26,41 $\pm$ 3,35	26,04 $\pm$ 4,99	1,51 $\pm$ 0,22	1,64 $\pm$ 0,26	0,55 $\pm$ 0,15	0,45 $\pm$ 0,09	2,08 $\pm$ 0,81	1,90 $\pm$ 0,40								
LG	20,71 $\pm$ 2,17	15,34 $\pm$ 3,71	1,63 $\pm$ 0,23	1,16 $\pm$ 0,18	0,19 $\pm$ 0,03	0,07 $\pm$ 0,03	1,52 $\pm$ 0,31	0,99 $\pm$ 0,12								
LM1	41,04 $\pm$ 10,09	38,78 $\pm$ 12,65	1,00 $\pm$ 0,10	0,82 $\pm$ 0,20	1,38 $\pm$ 0,17	1,16 $\pm$ 0,24	1,78 $\pm$ 0,57	1,37 $\pm$ 0,07								
LM2	57,66 $\pm$ 7,06	57,31 $\pm$ 12,56	1,07 $\pm$ 0,08	0,81 $\pm$ 0,03	1,66 $\pm$ 0,15	1,34 $\pm$ 0,18	1,93 $\pm$ 0,55	1,47 $\pm$ 0,06								
LM3	87,30 $\pm$ 3,86	79,56 $\pm$ 8,37	1,17 $\pm$ 0,07	0,88 $\pm$ 0,05	1,80 $\pm$ 0,15	1,61 $\pm$ 0,04	2,11 $\pm$ 0,53	1,49 $\pm$ 0,14								
LM4	77,13 $\pm$ 3,32	86,25 $\pm$ 11,15	1,16 $\pm$ 0,13	0,92 $\pm$ 0,03	1,97 $\pm$ 0,15	1,44 $\pm$ 0,12	2,07 $\pm$ 0,35	1,57 $\pm$ 0,06								
MA	45,63 $\pm$ 3,92	35,13 $\pm$ 1,41	1,38 $\pm$ 0,13	1,16 $\pm$ 0,04	1,81 $\pm$ 0,17	1,45 $\pm$ 0,07	2,33 $\pm$ 0,25	1,88 $\pm$ 0,26								
MD	31,87 $\pm$ 3,83	27,31 $\pm$ 4,82	0,87 $\pm$ 0,05	0,68 $\pm$ 0,04	1,29 $\pm$ 0,11	1,11 $\pm$ 0,21	1,62 $\pm$ 0,27	1,26 $\pm$ 0,14								
ME	91,14 $\pm$ 12,70	86,13 $\pm$ 15,39	9,10 $\pm$ 2,33	7,90 $\pm$ 0,89	0,43 $\pm$ 0,10	0,29 $\pm$ 0,03	19,29 $\pm$ 4,28	14,11 $\pm$ 2,11								
MR	20,09 $\pm$ 1,76	16,73 $\pm$ 1,71	1,29 $\pm$ 0,11	1,09 $\pm$ 0,11	0,29 $\pm$ 0,09	0,19 $\pm$ 0,07	1,14 $\pm$ 0,20	0,92 $\pm$ 0,18								
PL	84,44 $\pm$ 6,26	79,19 $\pm$ 9,25	4,68 $\pm$ 0,48	4,82 $\pm$ 0,49	1,91 $\pm$ 1,03	1,15 $\pm$ 0,11	8,56 $\pm$ 1,07	8,49 $\pm$ 1,10								
RA	42,78 $\pm$ 4,10	32,50 $\pm$ 1,75	1,27 $\pm$ 0,09	1,03 $\pm$ 0,05	1,72 $\pm$ 0,13	1,35 $\pm$ 0,09	2,55 $\pm$ 0,57	1,61 $\pm$ 0,07								
RB	37,08 $\pm$ 3,82	31,56 $\pm$ 8,82	0,88 $\pm$ 0,08	0,65 $\pm$ 0,04	1,23 $\pm$ 0,12	1,01 $\pm$ 0,13	1,77 $\pm$ 0,52	1,17 $\pm$ 0,15								
RE	42,28 $\pm$ 5,68	31,88 $\pm$ 1,71	1,30 $\pm$ 0,08	1,07 $\pm$ 0,03	1,70 $\pm$ 0,18	1,29 $\pm$ 0,07	2,38 $\pm$ 0,47	1,69 $\pm$ 0,08								
RR	17,48 $\pm$ 1,12	12,28 $\pm$ 0,80	1,33 $\pm$ 0,16	1,10 $\pm$ 0,14	0,14 $\pm$ 0,05	0,08 $\pm$ 0,04	1,01 $\pm$ 0,10	0,83 $\pm$ 0,07								
TI	44,14 $\pm$ 4,33	49,88 $\pm$ 8,45	2,98 $\pm$ 0,30	3,89 $\pm$ 1,07	0,47 $\pm$ 0,05	0,37 $\pm$ 0,09	4,33 $\pm$ 1,10	5,99 $\pm$ 2,37								
TR	50,84 $\pm$ 3,66	49,69 $\pm$ 8,68	1,04 $\pm$ 0,06	0,80 $\pm$ 0,02	1,62 $\pm$ 0,08	1,33 $\pm$ 0,18	1,77 $\pm$ 0,41	1,35 $\pm$ 0,10								
VE	16,43 $\pm$ 1,40	21,19 $\pm$ 10,99	1,28 $\pm$ 0,19	1,15 $\pm$ 0,15	0,17 $\pm$ 0,03	0,12 $\pm$ 0,05	0,96 $\pm$ 0,10	0,84 $\pm$ 0,18								
VO	118,67 $\pm$ 31,73	110,00 $\pm$ 34,26	15,90 $\pm$ 5,75	12,87 $\pm$ 4,93	0,52 $\pm$ 0,15	0,36 $\pm$ 0,11	28,96 $\pm$ 9,93	22,26 $\pm$ 9,73								
WA	18,10 $\pm$ 2,07	13,60 $\pm$ 2,70	1,37 $\pm$ 0,09	1,21 $\pm$ 0,14	0,16 $\pm$ 0,05	0,08 $\pm$ 0,04	1,01 $\pm$ 0,10	0,99 $\pm$ 0,31								
Total	45,03 $\pm$ 28,23	40,65 $\pm$ 28,73	2,35 $\pm$ 3,45	2,03 $\pm$ 2,90	0,99 $\pm$ 0,74	0,77 $\pm$ 0,57	3,89 $\pm$ 6,65	3,12 $\pm$ 5,27								



**Annexe 2 :** Gradient d'azote (N) et phosphore (P) le long des sites d'étude. En (A), les sites en abscisse sont organisés selon le gradient de  $\text{NO}_3^-$ . En (B), ils sont organisés selon le gradient de  $\text{PO}_4^{3-}$ .





### Annexe 3 : Pourcentage des comptages des espèces de diatomées retrouvées dans les biofilms.

Diatomées (espèces)	Site														
	GS	CE	RA	BR	RR	WA	MD	RB	VE	LM1	HR	MR	TI	PL	LM3
<i>Achnanthes oblongella</i>					4,2				47,1						
<i>Achnanthes daonense</i>											0,1				
<i>Achnantheidium cf. minutissimum</i>										27,0					
<i>Achnantheidium exiguum</i>										52,8					
<i>Achnantheidium lineare</i>													16,3		
<i>Achnantheidium sp.</i>	0,1		0,1	0,1			2,3	3,5			97,3	16,7	42,8	11,1	16,6
<i>Amphora sp.</i>							0,1								1,0
<i>Brachysira sp.</i>			0,1				0,1								
<i>Cocconeis euglypta</i>															4,0
<i>Cocconeis placentula</i>	0,1						0,1			0,1					41,6
<i>Cocconeis sp.</i>											0,1	0,1	19,1	11,1	
<i>Cymbella excisiformis</i>			0,1												
<i>Delicata delicatula</i>			0,1												
<i>Diadesmis sp.</i>									0,1						
<i>Diadesmis gallica</i>								0,1					0,1		
<i>Diatoma erhenbergii</i>															0,1
<i>Diatoma mesodon</i>	0,1		1,7		0,1	0,1		3,0		0,1	2,0	59,2	6,0	11,1	1,6
<i>Diatomella sp.</i>							0,1						0,1		
<i>Diploneis parma</i>						0,1									
<i>Encyonema sp.</i>			2,2				0,1						4,5		0,1
<i>Encyonopsis aequalis</i>					0,1										
<i>Encyonopsis sp.</i>	0,1		0,1				0,1								
<i>Eunotia spp.</i>	84,1	99,4	88,6	35,8	64,9	95,8	86,7	77,2	38,1	1,8	0,1	3,9	2,3	11,1	2,2
<i>Fragilaria aff. Vaucheriae</i>					1,0										
<i>Fragilaria construens var. venter</i>		0,1						2,9	0,1	0,1	0,1				
<i>Fragilaria virescens</i>					0,1	0,1			5,0						
<i>Fragilaria sp.</i>						0,1						0,1	4,5		
<i>Frustulia saxonica</i>	1,1	0,1			1,0		0,1		4,5						
<i>Gomphonema exilissimum</i>							2,3								
<i>Gomphonema hebridense</i>					0,1										
<i>Gomphonema parvulum</i>													0,1		
<i>Gomphonema sp.</i>	0,1			0,1			0,1		0,1		0,1	0,1	3,4		0,1
<i>Halamphora veneta</i>			0,1												
<i>Karayevia oblongella</i>			4,5	63,9		0,1						18,0		11,1	
<i>Kolbesia ploenensis</i>			0,1												
<i>Luticola sp.</i>													0,1		
<i>Meridion circulare</i>		0,1										1,5			0,1
<i>Navicula caterva</i>															0,1
<i>Navicula heimansoides</i>			0,1												
<i>Navicula lanceolata</i>															0,1
<i>Navicula radiosa</i>														11,1	
<i>Navicula sp.</i>						0,1		0,1	0,1						0,1
<i>Nitzschia sp.</i>													0,1		4,5
<i>Nupela lapidosa</i>											0,1				
<i>Pinnularia sp.</i>	14,0	0,1	0,1	0,1		0,1	0,1		0,1			0,1	0,1		
<i>Pinnularia subcapitata var. elongata</i>			0,1												
<i>Planothidium lanceolatum</i>					0,1										
<i>Planothidium sp.</i>							2,3	4,1	0,1		0,1		0,1	11,1	12,5
<i>Platessia conspicua</i>															2,8
<i>Psammothium spp.</i>	0,1		0,1			0,1		2,0		18,0		0,1	0,1		12,5
<i>Reimeria sinuata</i>													0,1	11,1	0,1
<i>Sellaphora joubaudii</i>							2,3								
<i>Sellaphora seminulum</i>													0,1		
<i>Surirella sp.</i>		0,1					0,1	6,8							
<i>Surirella angusta</i>			1,7		3,1				4,5	0,1					
<i>Synedra ulna</i>															
<i>Tabellaria sp.</i>	0,1	0,1	0,1			3,3		3,1	0,1					11,1	
<i>Tabellaria ventricosa</i>					25,1										



## Annexe 4 : Interactive impacts of silver and phosphorus on autotrophic biofilm elemental and biochemical quality for a macroinvertebrate consumer

Sanchez-Thirion K<sup>1\*</sup>, Crenier C.<sup>1\*</sup>, Bec A.<sup>2</sup>, Felten V.<sup>1,2</sup>, Ferriol J.<sup>3</sup>, Gonzalez A.<sup>4</sup>, Leflaive J.<sup>3</sup>, Perrière F.<sup>2</sup>, Ten Hage L.<sup>3</sup>, Danger M.<sup>1,5#</sup>

<sup>1</sup> Université de Lorraine – Metz, UMR 7360, Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC), Rue C. Bernard, 57070 Metz, France.

<sup>2</sup> Université Clermont Auvergne, CNRS UMR 6023, Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement (LMGE), Clermont Ferrand, France.

<sup>3</sup> Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement, UMR 5245 CNRS-INP-UPS, Université de Toulouse, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France

<sup>4</sup> Lab Aridane

<sup>5</sup> CNRS, LIEC, UMR 7360, Rue C. Bernard, 57070 Metz, France

\* both authors equally contributed to the work

#corresponding author: michael.danger@univ-lorraine.fr

This manuscript contains 7936 words, 51 references, 5 figures and 2 tables

**Keywords:** Ecological stoichiometry, essential fatty acids, trophic ecotoxicology, *Gammarus fossarum*

### Abstract

Autotrophic biofilms are complex and fundamental biological compartments of many aquatic ecosystems. In particular, these biofilms represent a major resource for many invertebrate consumers. To date, most ecotoxicological studies have been devoted to understand the impacts of stressors on microbial communities or on functional processes taking place into the biofilm mat. Far less studies have investigated the indirect effects of stressors on upper trophic levels through alterations of the quality of biofilms for their consumers.

Among the numerous stressors impacting aquatic ecosystems, eutrophication and metal pollution are certainly the most common. Despite these stressors often occur concomitantly, their effects on biofilms have been far much studied separately than interactively. Yet, previous studies suggested that higher amounts of nutrients could help microorganisms to overcome some deleterious effects of contaminants.

In a laboratory study, we investigated the single and combined effects of phosphorus (P) availability and silver contamination on the elemental (Carbon (C) : Nitrogen (N) : P ratios) and biochemical (fatty acid profiles) compositions of a diatom-dominated biofilm

initially collected in a shallow lake. We hypothesized that 1) P would enhance the elemental quality while 2) P and silver, through the replacement of diatoms by more tolerant primary producer species, would reduce the biochemical quality of biofilms for their consumers. The quality of biofilms for consumers was assessed for a common crustacean species, *Gammarus fossarum*, by measuring organisms' survival and growth rates.

Results mainly showed that species replacement induced by both stressors affected biofilm fatty acid compositions, and that P immobilization permitted to achieve low C:P biofilms, whatever the level of silver contamination. Gammarids growth and survival were not significantly impacted by the ingestion of silver-contaminated resource. On the contrary, we found a significant positive relationship between the biofilm P-content and gammarids growth. This study underlines the large indirect consequences stressors could play on basal resources quality for consumers, and, in turn, on the whole food web.

### Introduction

In ecosystems, living organisms most often face multiple stressors simultaneously.

However, the interactive effects of these stressors, acting synergistically or antagonistically on species and ecosystems, remain hardly predictable. In particular, in aquatic ecosystems, contaminants have often been described as co-occurring with eutrophication (Skei et al. 2000). Yet, to date, the interactive effects of these stressors on ecosystem functioning remain poorly understood. By alleviating organisms' nutrient limitation, increases in nutrient concentrations might potentially increase organisms' tolerance to contaminants (Arce Funck et al. 2016). In contrast, by altering water quality parameters, such as dissolved oxygen concentrations, one could expect changes in contaminant bioavailability (Skei et al. 2000) and/or intensification of the damages caused by the contaminants on already stressed organisms (Rattner & Heath, 2003). Finally, eutrophication-induced shifts in community composition could deeply change, either positively or adversely, the tolerance to contaminants of communities, mainly depending on individual species traits (Baird & Van den Brink, 2007).

In freshwater ecosystems, phosphorus (P) has long been recognized as one of the most important factor of eutrophication (Smith et al. 1999). Falkowski et al. (2000) have shown that human activities have increased the global fluxes of P by a 4-fold factor when compared to natural fluxes, P exhibiting by far the most dysregulated biogeochemical cycle on earth. Since this chemical element is generally scarce in natural environments, any anthropogenic input is susceptible to deeply alter ecosystems functioning (Elser & Bennett 2011). Due to these peculiarities, P-release impacts in aquatic ecosystems has received much attention in the past 60 years. Yet, these impacts have most often been considered without considering co-occurring stressors. Among the numerous contaminants entering aquatic ecosystems, toxic trace metals represent some of the most common persistent pollutants (Nriagu & Pacyna, 1988). Studying the interactive impacts of phosphorus load and toxic trace metal seems thus particularly

important for understanding the impacts of contaminants in nature.

In all aquatic ecosystems, a large proportion of primary production is ensured by phototrophic biofilms. These biofilms are composed of attached communities generally dominated by unicellular algae, and containing different amounts of bacteria, fungi, and micro-eukaryotic species embedded in an organic polysaccharidic matrix (Wetzel 1983). As a central basal resource, these biofilms play a fundamental role in aquatic food webs (Wetzel 1983). These biofilms also have large consequences on aquatic biogeochemical cycles, ensuring the production, the decomposition, and the transfer of numerous organic molecules (Battin et al. 2003). Due the ecological importance of biofilms, several studies have investigated the interactive impacts of diverse stressors on biofilm community structures and on some functional processes they ensure. For example, studies showed either antagonistic or synergistic effects of P concentration on the impacts of pesticides on biofilm community structure and/or primary production (Tlili et al. 2010; Murdock and Wetzel 2012; Murdock et al. 2013). While being far less studied, some authors also showed that the deleterious impacts of metallic contaminants were reduced when biofilms were released from P limitation (Guasch et al. 2004; Serra et al. 2010). More recently, Leflaive et al. (2015) showed that high P concentrations alleviated the impact of ionic silver on biofilm communities, but only for a cyanobacteria-dominated biofilm, impacts of silver on diatom-dominated biofilm being unaffected by P concentrations. Surprisingly, while multi-stressors impacts on biofilm community structure and functions have received much attention, and despite the major role of biofilms as basal resources in aquatic ecosystems, almost nothing is known on the cumulative impacts of multiple stressors on biofilm quality. Yet, investigating this parameter might bring insightful results on multiple stressors indirect effects on aquatic food webs and, *in fine*, on ecosystem functioning.

In the literature, several parameters are generally evoked for measuring the potential quality of biofilms for their consumers. First, biofilm elemental content (often expressed as C:N:P ratios) has long been considered as an indicator of the quality of a resource for a consumer, this resource being of high quality when the imbalance between resource elemental content and consumers elemental requirements are minimal (Sterner & Elser 2002). Since consumers have generally high N and P requirements, resources with the lowest C:P or C:N ratios are generally considered as resources of the highest quality, maximizing consumer life history traits such as growth rates or reproduction (Liess & Hillebrand 2006; Danger et al. 2008, 2013). Second, the resource quality of a biofilm can also be evaluated by measuring its fatty acid contents (a parameter classified as a biochemical quality parameter). Indeed, among the diversity of fatty acids found in nature, some of them are considered as essential for consumers, i.e. these fatty acids cannot be synthesized or at least not in sufficient amounts to fulfill the requirements of consumers (Arts et al. 2009). These essential fatty acids are generally composed of long chain polyunsaturated fatty acids (PUFA), such as 20:5 $\omega$ 3 (EPA) and 22:6 $\omega$ 3 (DHA). The consumption of these compounds have been regularly reported as controlling consumers' growth and/or reproduction (Masclaux et al. 2009; Crenier et al. 2017). Since fatty acid profiles are highly variable between algal groups, any change in biofilm algal communities can have drastic impacts on biofilm PUFA content (Muller-Navara et al. 2004, Bec et al. 2010). For example, the replacement of diatoms, rich in long-chain PUFAs, by green algae or cyanobacteria, depleted in such compounds, could have profound impacts on consumers' life history traits and secondary production (Muller-Navara et al. 2004). Finally, in the case of biofilms exposed to contaminants, the contaminant content of biofilm biomass could also be considered as a potential quality parameter since some contaminants can be highly toxic through trophic pathways (Luoma & Rainbow 2008). Note that whatever the quality parameter

investigated, effects of resources consumption on consumers life history traits must be systematically measured to evaluate the effective quality of resources, resource quality being not only dependent on resource composition but also on consumers requirements and physiology.

In the present study, we investigated the single and combined effects of P concentration and metallic contamination on biofilm quality for a model consumer, *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda). This study is an independent part of the study published by Leflaive et al. (2015), dealing with the interactive impacts of P and ionic silver on biofilm (prokaryotic and microeukaryotic) communities. Silver was chosen as a model of metallic contaminant since it is well known as a potent biocide, and is certainly among the most toxic to microorganisms (bacteria, fungi and phytoplankton) and invertebrates (Ratte 1999; Arce Funck et al. 2013a; Arce Funck et al. 2013b). Silver currently represent a reemerging toxic risk since it is widely used as an antibacterial agent in partly soluble nanoparticles (Marambio-Jones & Hoek 2010). This study was carried out on a diatom-dominated biofilm initially collected in the field. First results showed that on this biofilm, both P increase and silver contamination led to significant reductions of diatoms proportion in algal communities, these algae being partly replaced by green algae (Leflaive et al. 2015). We thus hypothesize that P and silver lead to reductions in biofilm PUFA content, thus reducing biofilm biochemical quality (Hypothesis 1). In contrast, P increase in water lead to reductions of biofilm C:P ratios, thus potentially increasing resources elemental quality for consumers (Hypothesis 2). Finally, we hypothesize that silver have deleterious impacts on consumers' growth and survival through the ingestion of toxic metal, leading to strong interactions between silver contamination and P concentration (Hypothesis 3).

## Material and Methods

### *Experimental setup*

To investigate the single and combined effects of Ag and P concentrations on biofilm quality, a diatom-dominated biofilm was collected in the field. This biofilm was then exposed for three weeks in a full factorial design to a gradient of silver concentration at three distinct P concentrations. Impacts on microbial community structures were investigated independently from the present experiment, results being available in Leflaive et al. (2015). The present study specifically investigates the impacts of P and Ag stressors on biofilm fatty acids profiles, elemental composition, and silver concentration, giving an evaluation of biofilm potential quality for consumers. To measure the real/effective quality of biofilms, we fed a model consumer, *Gammarus fossarum*, with the distinct biofilms, and followed organisms survival and growth throughout a 42 days experiment.

All details of the experimental procedure can be found in Leflaive et al. (2015). Briefly, the diatom-dominated biofilm was collected in a mesotrophic reservoir (Lake Saint-Ferréol, South-West France) using polyethylene plates (10 cm × 5 cm) placed vertically, 60-cm deep in the lake. Substrates were immersed during 3 weeks (May-June), then brought back to the laboratory in a cool box and placed two by two in beakers filled with 500 ml of modified COMBO medium (Kilham et al. 1998). The experiment was carried out in a controlled culture chamber (18°C, light intensity between 50 and 60  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 16h/8h light/dark cycles). Twelve conditions were tested: three P levels (20, 100 or 500  $\mu\text{g/L}$ ) and four Ag concentrations (0, 5, 50 or 150  $\mu\text{g/L}$ ), each treatment being replicated 3 times. To maintain our exposure conditions, media were entirely renewed each week. To avoid important silver adsorption on beakers surface, glass beakers were pre-saturated during 24h with Ag solutions at concentrations similar to those of the diverse treatments.

### *Sampling*

After the end of the biofilm experiment, 5 mL of incubation medium from each beaker were sampled and acidified with 15  $\mu\text{L}$  of 70%  $\text{HNO}_3$  and stored at 4°C for later Ag quantification. Biofilms present on polyethylene substrates were scrapped, then homogenized in 20 ml of incubation medium. Some subsamples were taken for measuring bacterial and micro-eukaryotic community structures. In particular, 1 ml was fixed (2% formaldehyde) and kept at 4°C for algal determination and counts (see Leflaive et al. 2015 for community structure results). The remaining volume of suspension was concentrated (centrifugation 7 000 g, 10 min), supernatant was eliminated and the biofilm was stored at -20°C until being freeze-dried.

### *Measurements of Ag in biofilm and water, and $\text{PO}_4^{3-}$ in water*

Silver concentrations in culture media was measured by atomic absorption spectrophotometry (graphite furnace Varian SpectrAA 300, detection limit = 0.1  $\mu\text{g Ag/L}$ ). The concentration of silver in the biofilm was measured after acidic digestion with 1 mL bidistilled  $\text{HNO}_3$  (15 N) and 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 %, Sigma) for 24 h at 70 °C. After full dissolution, the samples were evaporated at 70 °C and redissolved by 2 % bidistilled  $\text{HNO}_3$  for analysis by ICP-MS (Agilent 7500 ce). All the materials used for silver sampling and measurements were cleaned with 1 N HCl for 24 h. Due to the cost of Ag analyses, measurements were done for each treatment on a pooled sample of biofilm corresponding to a mix of equal quantities of the 3 replicates.

Initial  $\text{PO}_4^{3-}$  concentrations were measured spectrophotometrically (ammonium molybdate method, AFNOR, 1990) in culture media used for microcosms filling.

### *Biofilm elemental composition measurements*

Freeze-dried biofilm was first gently homogenized in a plastic centrifugation tube using a glass pestle. The C and N content of biofilm was measured on ca. 1mg samples using

a CHN elementary analyzer (Carlo Erba NA2100, Thermo Quest CE International, Milan, Italy). Biofilm P content was quantified after alkaline digestion with persulfate, and mineral P was then quantified spectrophotometrically following the AFNOR procedure (1990). Results are expressed as the mass percentage of the element in different resources, and C:N:P ratios correspond to molar ratios.

#### ***Biofilm fatty acid profiles determination***

Fatty acids analyses were performed on dried subsamples of all biofilms. Analyses followed the procedure described in Crenier et al. (2017). Briefly, lipids were extracted two times with a chloroform/methanol solution according to the method proposed by Folch et al. (1957). Fatty acids were then converted into fatty acid methyl-esters (FAME) by acid catalysed transesterification and analysed on an Agilent technologies™ 6850 gas chromatograph. FAME were identified after a comparison of retention times with those obtained from Supelco® and laboratory standards, and were quantified using internal standards (13:0).

#### ***Gammarus fossarum growth measurements***

##### *Gammarids sampling and initial sizing*

Gammarids were collected in an unpolluted second-order forested stream (La Maix, Vosges Mountains Latitude N 48°29'02.1", longitude E 007°04'008.5"). Organisms were immediately transported to the laboratory, then acclimatized at 12°C, in the dark and in aerated water for 15 days. During the acclimation period, animals were fed with alder (*Alnus glutinosa*, (L.) Gaertn.) leaf litter directly collected in la Maix stream. Two days before the beginning of the growth experiment, 204 gammarids of 4-5 mm in length were sorted and put in individual plastic cups containing 50mL of La Maix stream water. Organisms were let emptying their guts for 48h. During this period, all organisms were individually photographed, and initial sizes were measured with SigmaScan Image Analysis Version 5.000 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). The mean body length of gammarids used in the experiment was  $4.52 \pm 0.70$  mm (mean  $\pm$  SD), and

size were similar between all treatments (ANOVA<sub>2</sub>: P effect:  $F_{2,154} = 0.3$ ,  $p = 0.73$ ; Ag effect:  $F_{3,154} = 0.3$ ,  $p = 0.85$ ; Ag  $\times$  P effect:  $F_{6,154} = 1.7$ ,  $p = 0.11$ ).

##### *Preparation of biofilm resources for G. fossarum growth experiment*

To maximize *G. fossarum* consumption of freeze-dried and homogenized biofilm, biofilm powders were embedded in low gelling temperature agarose (Sigma A9414), following the protocol proposed by Crenier et al. (2017). This agarose matrix permits to reconstitute a cohesive biofilm, and present the advantages of being nutrient-free. Agarose concentration used was 2%, and biofilm biomass introduced in each pellet was calculated to ensure that 50% of C came from the biofilm, the remaining coming from agarose. Agarose was dissolved in glass bottles with deionized water, heated in a microwave, and then placed in an agitated water bath at 38°C. After reaching this temperature, 1.6 ml of agarose solution was introduced in a 2 ml Eppendorf® tube and mixed with biofilm powders. This mixture was then homogenized and poured in the holes of a Plexiglas® mould (holes: 3mm wide, 2mm high). After a few minutes, the pellets were unmounted and kept at -20°C in Petri dishes until use.

##### *G. fossarum survival and growth experiment*

Organisms were fed individually with one biofilm pellets. We verified that organisms were fed *ad libitum* and diatom pellets were replaced every two days. The experiment lasted 42 days, and was carried out at 12°C, in the dark. Water was renewed every week, using aerated La Maix water. Survival was monitored daily. All survivors were photographed at the end of the experiment and the body length was measured as described above. The growth rates were expressed as length gain per mm of gammarid initial size per day ( $\text{mm mm}^{-1} \text{d}^{-1}$ ).

##### *Statistical treatment of data*

All parameters (Ag concentration in water and biofilm, biofilm %C, %N, %P, C:N, C:P and N:P ratios, fatty acid contents, *Gammarus fossarum*

growth rates) except survival curves were analyzed using two way ANOVAs, considering P level and Ag concentrations as categorical predictors. Data were log transformed when necessary in order to meet the variance homoscedasticity condition for using ANOVAs. When ANOVA indicated significant differences between treatments, multiple comparisons were conducted using Tukey's HSD test. Due to the elevated costs of analyses and the quantity of biological material required, Ag concentrations in biofilms were not replicated, rather measured on a pooled sample coming from the three replicates. The interactive effects of P and Ag were thus impossible to calculate, and only the main effects were analyzed. Survival were analyzed using Kaplan–Meier survival curves and log-rank tests for comparing curves. By accounting for censored data (i.e. when organisms were still alive at the end of the experiment), this approach enabled to investigate the effects of P and Ag during the whole experiment. Yet, since mortality remained null in several treatments of this experiment, it was statistically impossible to compare the 12 treatments. To make the analysis feasible, survival values were pooled by P levels, then by Ag levels. This permitted to compare the effects of P and Ag concentrations on gammarids survival, the analysis of the interactive effects of P and Ag being not possible. Survival curves analyses showing significant differences for both Ag and P treatments, the 3 curves obtained for P effect and the 4 curves obtained for Ag effects were compared pairwise. To take into account the multiple comparisons, p-values considered as significant followed a Bonferroni adjustment. Finally, impacts of resource quality parameters (biofilm C/P ratios, PUFA contents, and Ag concentrations) were analyzed using linear regressions. All statistical analyses were computed with STATISTICA (SAS institute). Statistical significance was inferred at  $p \leq 0.05$ .

## Results

After one week of biofilm exposure to Ag and P treatments, Ag levels reached  $0.01 \pm 0.01$ ,  $4.16 \pm 0.54$ ,  $33.48 \pm 0.53$ , and  $85.07 \pm 27.51 \mu\text{g Ag L}^{-1}$ ,

in the 0, 5, 50 and  $150 \mu\text{g Ag L}^{-1}$  treatments, respectively. Ag concentrations were significantly altered by the P concentration, higher P concentrations leading to higher Ag concentrations in the culture medium (Figure 1A, Table 1). Ag measurements in biofilm showed traces of Ag in control biofilm ( $0.8 \pm 1.11 \mu\text{g g}^{-1}$ ), while Ag concentrations reached  $8.24 \pm 1.19$ ,  $86.41 \pm 10.77$ , and  $279.13 \pm 72.85 \mu\text{g g}^{-1}$ , in the 5, 50 and  $150 \mu\text{g Ag L}^{-1}$  treatments, respectively (Figure 1B, Table 1).

Results of biofilm elemental composition measurements showed that biofilm %C and %N remained unchanged whatever the P and Ag concentrations tested. In contrast, biofilm %P was strongly altered by the P concentration in water, but remained unchanged along the Ag gradient (no interactive effect). All elemental ratios were modified by P concentration in the culture medium, biofilm C:P, C:N, and N:P ratios being significantly reduced under the highest P-concentrations (Table 1, Figure 2). In contrast, only biofilm C:N and C:P ratios were significantly altered by the Ag concentration, these ratios slightly decreasing along the Ag concentration gradient (Figure 2), and no interactive effect was revealed (Table 1).

Fatty acid profiles were largely modified by both Ag and P exposures (Figure 3, Table 1), but no interactive effects between both factors were evidenced. Culture medium P concentrations significantly reduced biofilm unsaturated fatty acid contents: MUFA concentrations were reduced by 36% while PUFA concentrations decreased by 28% between the P20 and the P500 treatments, respectively. The 20:5 $\omega$ 3 followed a similar trend, but differences were only marginally significant ( $p=0.06$ ). In contrast, low Ag contamination ( $5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) led to a significant 2-fold decrease in biofilm SAFA content, while this reduction was no more significant for the 50 and the  $150 \mu\text{g Ag L}^{-1}$  treatments. The same effect was observed on the total amount of fatty acids found in biofilm (Table 1).

During the *Gammarus fossarum* growth experiment, that lasted 42-days, the survival rate remained extremely high (>80%) for all

treatments. The survival was significantly lower for organisms fed with the biofilms coming from the P100 and the P500 treatments when compared to those fed with the biofilm grown in the P20 treatment (Figure 4A). Ag also had significant effects on gammarids survival, the lowest survival being observed for organisms fed with control (Ag0) biofilms, and the highest for organisms fed with biofilms coming from the Ag 50 treatment, those fed with biofilms coming from the Ag5 and the Ag150 treatments showing intermediate survival (Figure 4B).

Size growth (calculated on the surviving organisms after the 42-days experiment) of organisms fed with the different biofilms was neither affected by the Ag nor by the P concentrations of biofilm exposure (Figure 5A), despite a marginally significant effect of P ( $P=0.052$ , Table 1). When considering the regressions between organisms growth rates and the main descriptors of resource quality (PUFA and Ag concentrations, biofilm C:P ratios; Figure 5 B, C, and D), a significant negative relationship was only revealed for the effect of biofilm C:P ratios ( $P<0.01$ ) on *G. fossarum* growth, whereas no significant relationship was found for biofilm Ag and PUFA concentrations.

## Discussion

While the single and interactive impacts of nutrient concentrations and metallic contaminations have long been investigated on biofilm community structures, far less is known on the effects these multiple stressors might play on the quality of the biomass produced, and, in turn, on their consequences for biofilm consumers. In this study, we showed that both phosphorus and silver significantly change diverse parameters of biofilms quality for an invertebrate consumer, without strong interactive effects between stressors. In particular, we partially verified Hypothesis 1, P but not Ag significantly reducing biofilm PUFA content. The P-level also markedly increased biofilm elemental quality, validating hypothesis 2. In contrast, hypothesis 3, dealing with the negative effects of

Ag contaminated resources ingestion on consumers must be rejected.

After one week of exposure, silver concentrations were reduced when compared to what was initially introduced. These reductions could be related to the great potential of algal cells and biofilms to adsorb ionic metals on their surfaces, adsorption processes being more common in algae than active uptake into the cells (Ratte 1999). Adsorption might even be increased by the presence of extracellular polymers (EPS), such substances presenting numerous potential binding sites (van Hullebusch et al. 2003). Nutrient depletions are well known to stimulate the production of EPS by phototrophic biofilms (Lyon & Ziegler, 2009). In our study, higher P levels led to higher silver concentrations remaining in water. By decreasing nutrient depletion of biofilms, P inputs might have led to reduced production of EPS, reducing in turn the adsorption potential of biofilms. Even if we were unable to test for the interactive effects of P and Ag on silver concentration in biofilms, one could expect that higher P concentrations in water should lead to reduced Ag concentrations in biofilms (this general trend being visible on Figure 1B). Some silver-phosphate complexes might also have been produced, but considering the high recovery of dissolved silver in the culture medium (e.g.  $> 80\%$  for the  $5\mu\text{gAg L}^{-1}$ , P500 treatment), this complexation might remain extremely reduced, and, in all cases, has not led to important silver complexes precipitation.

Elemental compositions of resources are generally considered as good proxies of resources quality for consumers (Sterner & Elser 2002). Indeed, life history traits of several species have been shown to be controlled by the imbalance between their elemental requirements and what they can effectively find in their resources (e.g. Elser et al. 2001, Frost & Elser 2002). Since C proportions in resources is rarely limiting for consumers, resources presenting low C:N and/or low C:P ratios are generally considered as potentially high quality resources for their consumers (Sterner & Elser 2002). Our study revealed that both biofilm C:P and N:P ratios were

significantly reduced by the P concentration of the culture medium. This effect might be simply explained by the fact that algae have the potential to immobilize nutrient in excess in their biomass, this process being generally called luxury consumption (Droop et al. 1974). This effect occurs concomitantly with a reduction of the C-rich EPS production (Lyon & Ziegler, 2009), these compounds generally largely contributing to increasing algal communities C:nutrient ratios (Pannard et al. 2016). In addition, bacterial communities have the potential to quickly change, selecting for species able to use optimally nutrients available and adjusting the stoichiometry of the whole community to that of their resources (Danger et al. 2008). Unexpectedly, silver contamination also led to significant reductions of biofilm C:N and C:P ratios, even if these reductions remained low when compared to those observed along the P gradient. Data on the effects of contaminants on resources elemental compositions remain extremely scarce in the literature. Some studies showed that biofilms tend to increase their production of EPS as a response to contaminant exposure (García-Meza et al. 2005; Serra & Guasch 2009). This physiological response, aimed at increasing the metal-binding sites of the biofilm, would lead to increases in biofilm C:nutrient ratios (Pannard et al. 2016). Opposite effects observed might be potentially explained by the large Ag-induced shifts in prokaryotic and microeukaryotic community structures observed in our study (see Leflaive et al. 2015). One could expect that different species with different luxury consumption capabilities might be selected by Ag contamination. Another potential, non-exclusive, explanation could be that organisms stressed by the Ag contamination tend to increase their antitoxic defenses, these defenses generally relying on N-rich enzymes and leading to apparent lower biofilm C:N ratios.

Some fatty acids, and especially long-chain PUFAs, are also good indicators of resources quality. Indeed, most metazoans are unable to (or, at least, not in sufficient amounts) synthesize these essential compounds that must

be found in their diet. These compounds are notably involved in the synthesis of key hormones and represent important molecules in cell membranes, controlling in particular membrane fluidity (Arts et al. 2009). In algal communities, diatoms are known to produce high amounts of long chain PUFAs (20:5 $\omega$ 3, Dunstan et al. 1994) in comparison with green algae and cyanobacteria that mainly produce shorter chain PUFAs (Masclaux et al. 2009) or are unable to synthesize highly unsaturated fatty-acids (Muller-Navarra et al. 2004), respectively. In the present study, both Ag contamination and P concentrations greatly altered algal communities, reducing diatoms proportion and increasing green algae proportions (see Leflaive et al. 2015, Figure 1). Both P and Ag stressors led to similar effects, without acting interactively. Thus, reductions in biofilm PUFA and 20:5 $\omega$ 3 content were expected for both stressors. In the present study, only the P increase led to significant but low reductions in these compounds. Surprisingly, we did not observe any significant effect of silver on biofilm PUFA and 20:5 $\omega$ 3 contents. In contrast, silver contamination significantly modified biofilm SAFA and the total amount of fatty acids, these parameters reaching their minimal values for an exposure to 5 $\mu$ g Ag L<sup>-1</sup>. The effect of P level on biofilm fatty acid profiles can certainly be explained by the replacement of 20:5 $\omega$ 3-rich diatoms by green algae, as already observed in diverse studies dealing with natural communities (e.g. Muller-Navarra et al. 2004; Bec et al. 2010). The absence of silver effect on biofilm PUFA and 20:5 $\omega$ 3 contents, despite the replacement of diatoms by green algae, could be explained either by the replacement of some diatom species by other diatom species containing more PUFAs or by an increase of diatoms' PUFA content as a response to Ag contamination. However, Ag and P stressors led to similar changes in biofilm community compositions (Leflaive et al. 2015), both communities showing similar reductions in the abundance of the most abundant diatom species (*Achnanthes minutissima*, Kützing and *Cymbella excisa*, Kützing). The second explanation thus appears as the most probable.

Even if data remain scarce in the literature, such an effect of fatty acid synthesis deregulation was already found in the macroalgae *Fucus* sp. exposed to copper (Smith et al, 1985).

While biofilm Ag, nutrients, and PUFA concentrations remain only potential quality parameters for biofilm consumers, measuring the impacts of biofilms consumption on metazoans is the only way for evaluating the effective quality of biofilms, and anticipate the indirect effects of the multiple stressors selected (Ag and P) on higher trophic levels. Consumers' growth measurements have been shown as a powerful mean for evaluating resources quality. In particular, effects of resources stoichiometry and/or highly unsaturated fatty acids on consumers' growth have already been successfully tested on planktonic and terrestrial herbivores (e.g. Elser et al. 2001; Schade et al. 2003; Masclaux et al. 2009). More recently, such effects have been revealed in the crustacean species, *Gammarus fossarum*, both for the effect of resources P (Danger et al. 2013) and highly unsaturated fatty acid contents (Crenier et al. 2017). In the present study, only biofilm C:P ratios were significantly related to *G. fossarum* growth, growth being reduced when organisms were fed with the highest C:P ratio resources. Organisms P content being directly related to organisms' nucleic acid production and cell proliferation (Elser et al. 2003), eating low C:P resources can help organisms to overcome P limitations of their growth. Low reductions in PUFA and 20:5 $\omega$ 3 biofilm contents induced by biofilm exposure to high P concentrations were certainly not sufficient to significantly impact consumers' growth. Surprisingly, accumulation of Ag in biofilm biomass, which led to high Ag concentrations in biofilm biomass, had strictly no influence on consumers' growth. Yet, some studies showed that toxicity of Ag on zooplankton species could be higher via trophic transfer than by direct uptake from water (Hook & Fisher 2001, Bielmyer et al. 2006). In contrast, other studies suggested that Ag toxicity was very variable depending on water chemistry, and that free ionic silver was the most toxic form to invertebrates

(Ratte 1999). In our study, elemental quality of resources played the greatest role in *G. fossarum* growth. However, observed responses could have been different if other life history traits had been considered. Indeed, PUFA concentrations have been regularly shown to control organisms' reproduction (e.g. Masclaux et al. 2009), and multiple stressor effects might also impact organisms reproduction.

Finally, it must be noted that in contrast to the observed stimulation of *G. fossarum* growth, our results also showed a low but significant negative effect of P on organisms' survival. Such an effect has already been observed in another study (Arce Funck 2014). It was proposed that higher growth rates generated by higher resource quality increases moulting frequency. Yet, moulting is by far the most sensitive stage of moulting organisms' development, especially when exposed to contaminants (McCahon & Pascoe, 1988). Stimulation of organisms' growth thus generally co-occur with an increase in organisms' mortality. In contrast, the highest survival found for Ag-fed gammarids is more difficult to explain. One could imagine a stimulation of immune defenses of gammarids or a reduction of potentially pathogenic bacteria growing in biofilms. Such effects yet remains to be tested.

To conclude, our results showed that both P and Ag impacted several biofilm quality parameters, but never interactively. The use of *G. fossarum* growth experiment permitted to verify the consequences of resources potential quality. Similar studies, potentially including other life history trait measurements (e.g. organisms' reproduction) would be required to understand in more details the indirect effects multiple stressors might play on consumers and, in turn, on ecosystem functioning.

#### **Acknowledgments**

This project was partly funded by the ICARE EC2CO program to MD and the ANR Multistress (ANR-13-BSV7-0004-01). We greatly thank P. Rousselle for his technical support.

## References

- AFNOR (1990) Eaux, Méthodes d'essais: recueil de normes françaises. Association Française de Normalisation, Paris.
- Arce Funck, J. (2014) Modulation d'un stress chimique par la contrainte alimentaire : approche intégrée de l'individu au fonctionnement de l'écosystème. Thèse de l'Université de Lorraine, 271p.
- Arce Funck J, Clivot H, Felten V, Rousselle P, Guérold F, Danger M (2013a) Phosphorus availability modulates the toxic effect of silver on aquatic fungi and leaf litter decomposition. *Aquatic Toxicology* 144–145:199–207
- Arce Funck J, Danger M, Gismondi E, Cossu-Leguille C, Guérold F, Felten V (2013b) Behavioural and physiological responses of *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda) exposed to silver. *Aquat Toxicol* 142–143:73–84
- Arce-Funck, J., Crenier, C., Danger, M., Cossu-Leguille, C., Guérold, F., & Felten, V. (2016). Stoichiometric constraints modulate impacts of silver contamination on stream detritivores: an experimental test with *Gammarus fossarum*. *Freshwater Biology*, 61(12), 2075-2089.
- Arts, M. T., Brett, M. T., & Kainz, M. (Eds.) (2009) Lipids in aquatic ecosystems. Springer Science & Business Media.
- Baird, D. J., & Van den Brink, P. J. (2007). Using biological traits to predict species sensitivity to toxic substances. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67(2), 296-301.
- Battin TJ, Kaplan LA, Newbold JD, Hansen CME (2003) Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms. *Nature* 426:439–442
- Bec, A., Perga, M.-E., Desvilettes, C., & Bourdier, G. (2010) How well can the fatty acid content of lake seston be predicted from its taxonomic composition? *Freshwater Biology* 55.9 (2010): 1958-1972.
- Bielmyer, G. K., Grosell, M., & Brix, K. V. (2006). Toxicity of silver, zinc, copper, and nickel to the copepod *Acartia tonsa* exposed via a phytoplankton diet. *Environmental science & technology*, 40(6), 2063-2068.
- Crenier, C Arce-Funck J, Bec A, Billoir E, Perrière F, Leflaive J., Guérold F., Felten V., Danger M. (2017) Minor food sources can play a major role in secondary production in detritus-based ecosystems. *Freshwater Biology*, 62, 1155-1167
- Danger, M., Lacroix, G., Oumarou, C., Benest, D., & Mériguet, J. (2008a). Effects of food-web structure on periphyton stoichiometry in eutrophic lakes: a mesocosm study. *Freshwater Biology*, 53(10), 2089-2100.
- Danger, M., Daufresne, T., Lucas, F., Pissart, S. & Lacroix, G. (2008) Does Liebig's law of the minimum scale up from species to communities? *Oikos*, 117, 1741-1751.
- Danger, M., Arce Funck, J., Devin, S., Heberlé, J. & Felten, V. (2013) Phosphorus content in detritus controls life history traits of a detritivore. *Functional Ecology*, 27, 807-815.
- Droop, M. R. 1974. The nutrient status of algal cells in continuous culture. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 54: 825–855.
- Dunstan G.A., Volkman J.K., Barrett S.M., Leroi J.M. & Jeffrey S.W. (1994) Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae). *Phytochemistry*, 35, 155–161.
- Elser, J., & Bennett, E. (2011). Phosphorus cycle: a broken biogeochemical cycle. *Nature*, 478(7367), 29-31.
- Elser, J.J., Hayakawa, K., & Urabe, J. (2001) Nutrient limitation reduces food quality for zooplankton: *Daphnia* response to seston phosphorus enrichment. *Ecology*, 82(3), 898-903.
- Elser, J.J., Acharya, K., Kyle, M., Cotner, J., Makino, W., Markow, T., Watts, T., Hobbie, S., Fagan, W., Schade, J., Hood, J. & Sterner, R.W. (2003) Growth rate-stoichiometry couplings in diverse biota. *Ecology Letters*, 6, 936-943.
- Falkowski, P., Scholes, R.J., Boyle, E., Canadell, J., Canfield, D., Elser, J., Gruber, N., Hibbard, K., Högberg, P., Linder, S., Mackenzie, F.T., Moore, III B., Pedersen, T., Rosenthal, Y., Seitzinger, S., Smetacek, V. & Steffen, W. (2000). The global carbon cycle: a test of our knowledge of earth as a system. *Science*, 290, 291-296.
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, H. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497–509.
- Frost, P.C. & Elser, J.J. (2002b). Growth responses of littoral mayflies to the phosphorus content of their food. *Ecology Letters*, 5, 232–240.
- García-Meza JV, Barranguet C, Admiraal W (2005) Biofilm formation by algae as a mechanism for surviving on mine tailings. *Environ Toxicol Chem* 24:573–581

- Guasch H, Navarro E, Serra A, Sabater S (2004) Phosphate limitation influences the sensitivity to copper in periphytic algae. *Freshwat Biol* 49:463–473
- Hook, S. E., & Fisher, N. S. (2001). Sublethal effects of silver in zooplankton: importance of exposure pathways and implications for toxicity testing. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(3), 568-574.
- Kilham SS, Kreeger DA et al (1998) COMBO: a defined freshwater culture medium for algae and zooplankton. *Hydrobiologia* 377: 147–159
- Leflaive J., Felten V. Ferriol J., Lamy A., Ten-Hage L., Bec A., Danger M. (2015) Community structure and nutrient level control the tolerance of autotrophic biofilm to silver contamination. *Environ Sci Pollut Res*, 22, 13739–13752
- Liess, A., & Hillebrand, H. (2006). Role of nutrient supply in grazer–periphyton interactions: reciprocal influences of periphyton and grazer nutrient stoichiometry. *Journal of the North American Benthological Society*, 25(3), 632-642.
- Luoma SN, Rainbow PS (2008) Metal contamination in aquatic environments: science and lateral management. Cambridge University Press, Cambridge
- Lyon, D. R., & Ziegler, S. E. (2009). Carbon cycling within epilithic biofilm communities across a nutrient gradient of headwater streams. *Limnology and Oceanography*, 54(2), 439-449.
- Marambio-Jones C, Hoek EMV (2010) A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *J Nanopart Res* 12:1531–1551
- Masclaux, H., Bec, A., Kainz, M. J., Desvillettes, C., Jouve, L., & Bourdier, G. (2009). Combined effects of food quality and temperature on somatic growth and reproduction of two freshwater cladocerans. *Limnology and Oceanography*, 54(4), 1323-1332.
- McCahon, C.P., Pascoe, D., 1988a. Cadmium toxicity to the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) during the moult cycle. *Freshwater Biol.* 19,197–203.
- Muller-Navarra, D. C., Brett, M. T., Park, S., & Chandra, S. (2004). Unsaturated fatty acid content in seston and tropho-dynamic coupling in lakes. *Nature*, 427(6969), 69.
- Murdock JN, Wetzel DL (2012) Macromolecular response of individual algal cells to nutrient and atrazine mixtures within biofilms. *Micro Ecol* 63:761–772
- Murdock JN, Shields FD Jr, Lizotte RE Jr (2013) Periphyton responses to nutrient and atrazine mixtures introduced through agricultural runoff. *Ecotoxicology* 22:215–230
- Nriagu, J. O., & Pacyna, J. M. (1988). Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, 333(6169), 134-139.
- Liess, A., & Hillebrand, H. (2006). Role of nutrient supply in grazer–periphyton interactions: reciprocal influences of periphyton and grazer nutrient stoichiometry. *Journal of the North American Benthological Society*, 25(3), 632-642.
- Pannard, A. Pédrono J., Bormans M., Briand E., Claquin P., Lagadeuc Y. Production of exopolymers (EPS) by cyanobacteria: impact on the carbon-to-nutrient ratio of the particulate organic matter. *Aquatic Ecology*, 2016, 50, 29-44.
- Ratte, H.T., 1999. Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 89–108
- Rattner, B. A., & Heath, A. G. (2003). Environmental factors affecting contaminant toxicity in aquatic and terrestrial vertebrates. *Handbook of ecotoxicology*, 679-699.
- Schade, J. D., Kyle, M., Hobbie, S. E., Fagan, W. A., & Elser, J. J. (2003). Stoichiometric tracking of soil nutrients by a desert insect herbivore. *Ecology Letters*, 6(2), 96-101.
- Serra A, Guasch H (2009) Effects of chronic copper exposure on fluvial systems: Linking structural and physiological changes of fluvial biofilms with the in-stream copper retention. *Sci Total Environ* 407:5274–5282
- Serra A, Guasch H, Admiraal W, Van der Geest HG, Van Beusekom SAM (2010) Influence of phosphorus on copper sensitivity of fluvial periphyton: the role of chemical, physiological and community-related factors. *Ecotoxicology* 19:770–780
- Skei, J., Larsson, P., Rosenberg, R., Jonsson, P., Olsson, M., & Broman, D. (2000). Eutrophication and contaminants in aquatic ecosystems. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 29(4), 184-194.
- Smith K.L., Bryan G.W., Harwood J.L. (1985) Changes in Endogenous Fatty Acids and Lipid Synthesis Associated with Copper Pollution in *Fucus spp.* *Journal of Experimental Botany*, 36, 663–669.
- Smith, V. H., Tilman, G. D., & Nekola, J. C. (1999). Eutrophication: impacts of excess

nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environmental pollution*, 100(1), 179-196.

Sterner R.W. & Elser J. J. (2002). *Ecological stoichiometry: the biology of elements from molecules to the biosphere*. Princeton University Press, Princeton, USA.

Tlili A, Bérard A, Roulier J-L, Volata B, Montuelle B (2010)  $\text{PO}_4^{3-}$  dependence of the tolerance of autotrophic and heterotrophic

biofilm communities to copper and diuron. *Aquat Toxicol* 98:165–177

van Hullebusch, E. D., Zandvoort, M. H., & Lens, P. N. (2003). Metal immobilisation by biofilms: mechanisms and analytical tools. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2(1), 9-33.

Wetzel RG (1983) Opening remarks. In: Wetzel RG (ed) *Periphyton of freshwater ecosystems*. Dr W. Junk Publisher, The Hague, pp 3–4.

Figure 1

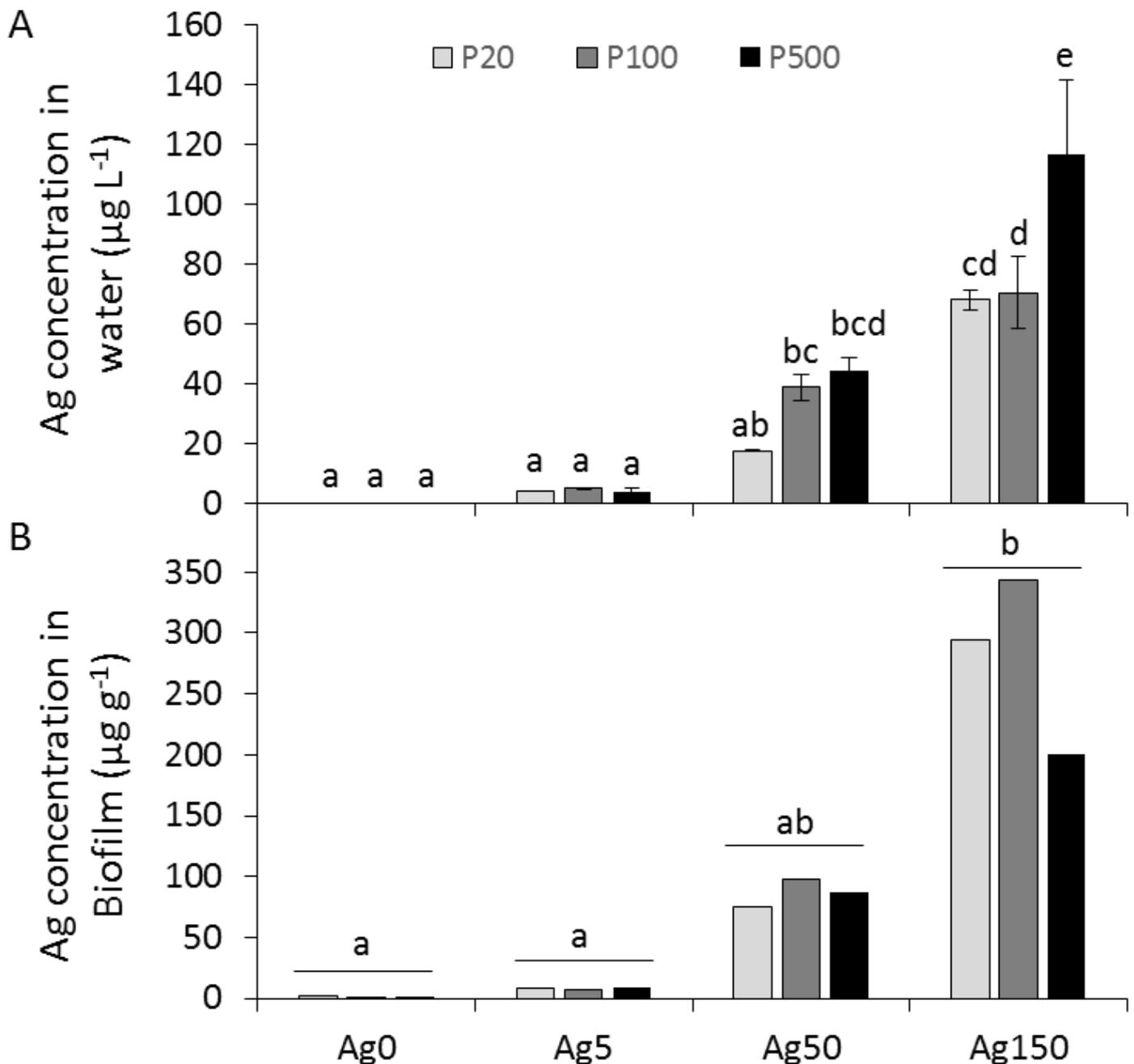


Figure 2

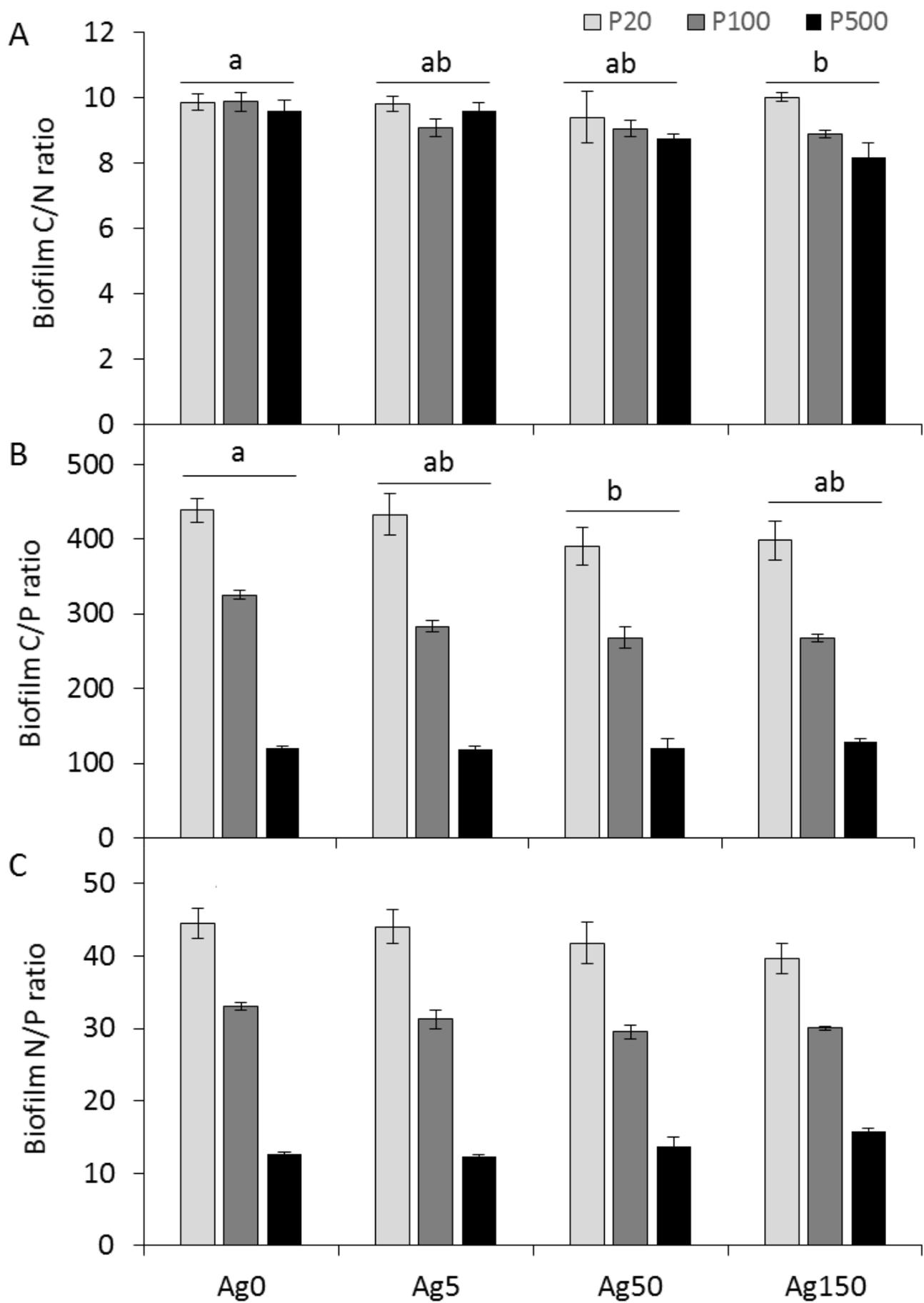


Figure 3

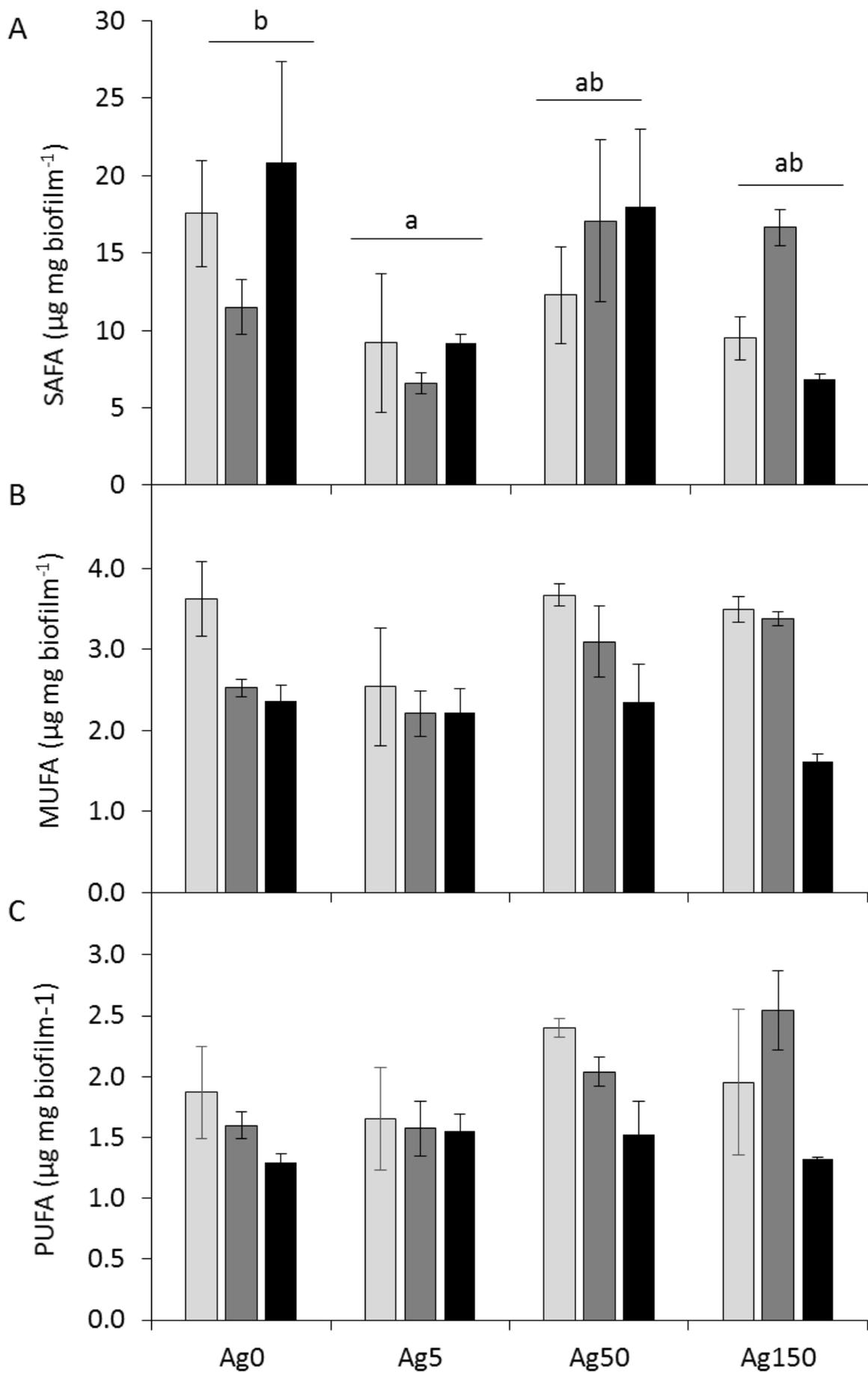


Figure 4

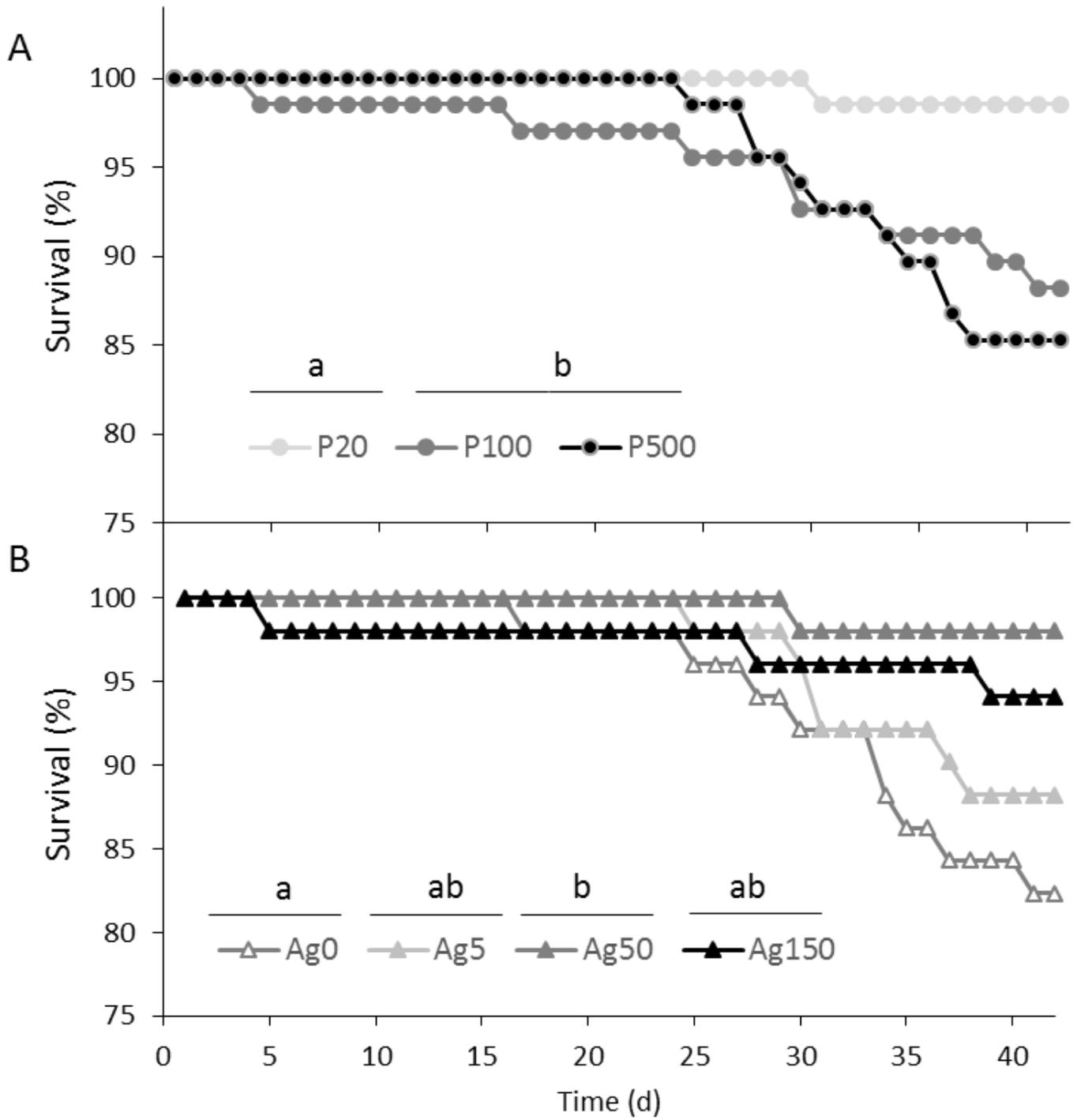


Figure 5

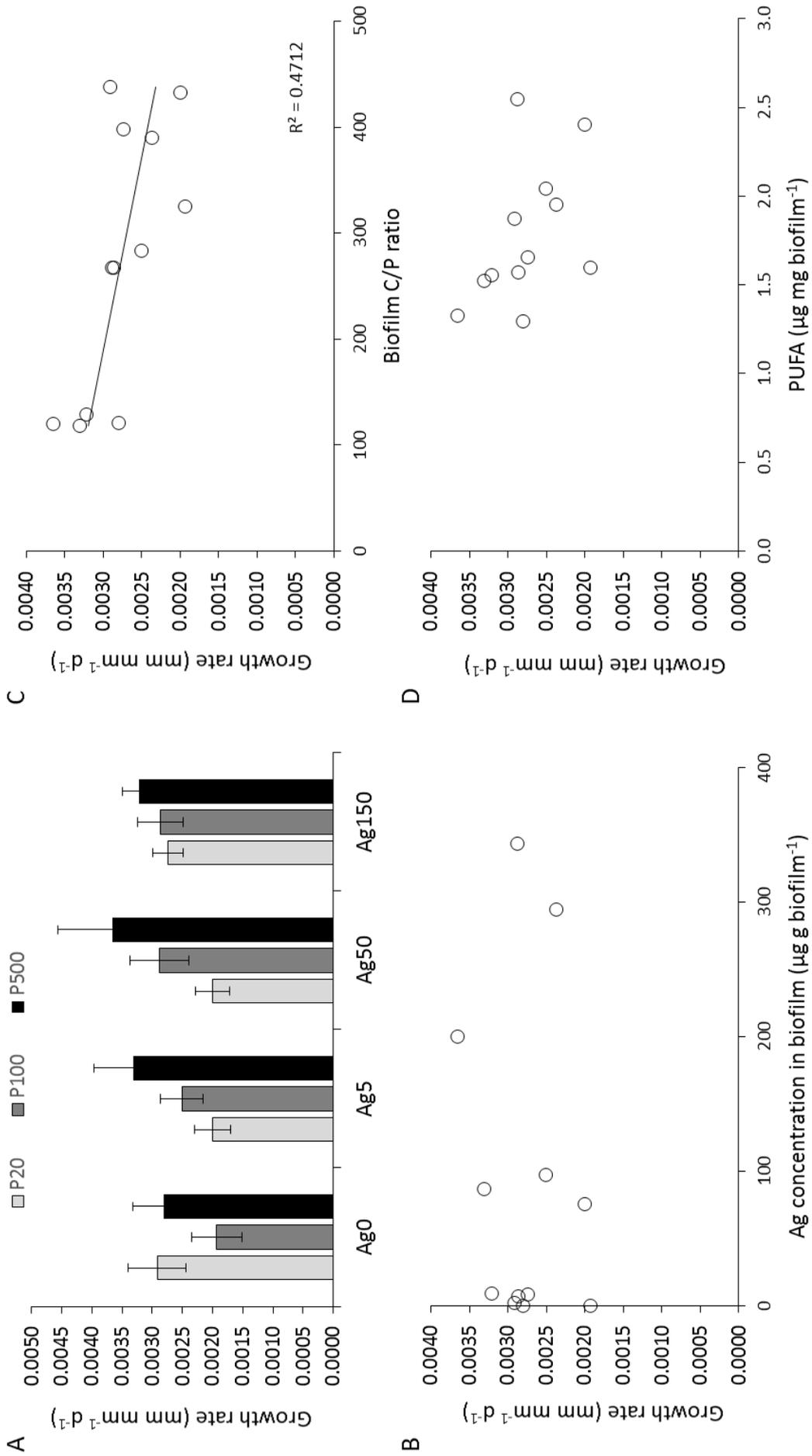


Table 1

Parameter	Two way ANOVA											
	P concentration			Ag concentration			P x Ag			d.f. error		
	d.f.	F	p-value	d.f.	F	p-value	d.f.	F	p-value	d.f.	F	p-value
[Ag] in water	2	9.9	<b>0.001</b>	3	121.0	<b>&lt;0.001</b>	6	4.8	<b>0.003</b>	17		
[Ag] in biofilm	2	1.1	0.39	3	37.9	<b>&lt;0.001</b>	na	na	na	6		
Elemental quality												
%C	2	0.3	0.76	3	0.6	0.64	6	1.4	0.26	24		
%N	2	0.8	0.44	3	2.2	0.10	6	0.7	0.61	24		
%P	2	129.8	<b>&lt;0.001</b>	3	1.0	0.39	6	0.8	0.59	24		
C:N ratio	2	5.1	<b>0.01</b>	3	3.5	<b>0.03</b>	6	1.6	0.19	24		
C:P ratio	2	369.1	<b>&lt;0.001</b>	3	3.2	<b>0.04</b>	6	1.3	0.29	24		
N:P ratio	2	374.8	<b>&lt;0.001</b>	3	0.8	0.52	6	1.8	0.14	24		
Fatty acid profiles												
SAFA	2	0.2	0.81	3	3.8	<b>0.02</b>	6	1.7	0.17	23		
MUFA	2	14.5	<b>&lt;0.001</b>	3	2.7	0.06	6	2.1	0.08	23		
PUFA	2	4.9	<b>0.01</b>	3	1.8	0.16	6	1.2	0.32	23		
18:3 $\omega$ 3	2	1.8	0.19	3	6.4	0.003	6	1.0	0.44	23		
20:5 $\omega$ 3	2	2.9	0.06	3	1.9	0.15	6	1.8	0.12	23		
Sum Fatty acids	2	0.1	0.98	3	4.1	<b>0.02</b>	6	1.9	0.12	23		
G. fassarum growth rates	2	2.9	0.05	3	0.6	0.60	6	0.7	0.60	154		

Table 2

Fatty acids ( $\mu\text{g mg biofilm}^{-1}$ )	Ag5			Ag50			Ag150		
	P20	P100	P500	P20	P100	P500	P20	P100	P500
	14:0	0.7±0.0	0.6±0.1	0.6±0.1	0.5±0.2	0.5±0.1	0.6±0.1	0.7±0.0	0.8±0.1
15:0		0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0
16:0	8.6±2.8	5.5±1.3	9.6±5.1	4.5±2.9	3.2±0.6	4.4±0.5	6.1±2.4	8.2±4.1	8.3±4.0
17:0		0.1±0.0	0.1±0.0				0.1±0.0		
18:0	8.0±3.1	5.0±1.8	10.2±6.0	4.0±3.0	2.5±0.5	3.9±0.3	5.1±2.9	7.9±4.9	8.6±4.3
20:0	0.7±0.0	0.1±0.0	0.2±0.1	0.1±0.1	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.1	0.2±0.1
22:0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0
24:0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0
<b>SAFA</b>	<b>17.5±5.9</b>	<b>11.5±3.1</b>	<b>20.9±11.2</b>	<b>9.2±6.4</b>	<b>6.6±1.2</b>	<b>9.2±0.9</b>	<b>12.3±5.4</b>	<b>17.1±9.1</b>	<b>18.0±8.7</b>
16:1 $\omega$ 9	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.2±0.0	0.1±0.1	0.2±0.1
16:1 $\omega$ 7	1.8±0.4	1.2±0.2	1.1±0.3	1.3±0.4	1.2±0.3	1.3±0.4	1.8±0.3	1.4±0.5	1.0±0.3
18:1 $\omega$ 9	1.3±0.2	0.9±0.0	0.9±0.4	0.8±0.4	0.6±0.1	0.6±0.1	1.3±0.1	1.3±0.3	0.9±0.3
18:1 $\omega$ 7	0.4±0.2	0.3±0.1	0.3±0.0	0.3±0.2	0.3±0.1	0.2±0.0	0.4±0.0	0.3±0.1	0.3±0.1
22:1 $\omega$ 9	0.1±0.0								
<b>MUFA</b>	<b>3.6±0.8</b>	<b>2.5±0.2</b>	<b>2.4±0.3</b>	<b>2.5±1.0</b>	<b>2.2±0.5</b>	<b>2.2±0.5</b>	<b>3.7±0.2</b>	<b>3.1±0.8</b>	<b>2.4±0.8</b>
16:2 $\omega$ 4	0.2±0.1	0.1±0.0	0.1±0.0	0.2±0.1	0.1±0.0	0.1±0.0	0.2±0.0	0.1±0.1	0.1±0.0
16:4 $\omega$ 3	0.2±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.1	0.1±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0
18:2 $\omega$ 6	0.5±0.1	0.4±0.0	0.3±0.1	0.4±0.2	0.3±0.1	0.2±0.0	0.5±0.0	0.5±0.1	0.3±0.1
18:3 $\omega$ 6	0.1±0.0	0.1±0.0		0.1±0.0			0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0
<b>18:3<math>\omega</math>3</b>	<b>0.4±0.2</b>	<b>0.4±0.0</b>	<b>0.3±0.0</b>	<b>0.3±0.1</b>	<b>0.3±0.1</b>	<b>0.4±0.1</b>	<b>0.5±0.0</b>	<b>0.6±0.1</b>	<b>0.5±0.1</b>
20:4 $\omega$ 6	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0
<b>20:5<math>\omega</math>3</b>	<b>0.5±0.3</b>	<b>0.4±0.1</b>	<b>0.4±0.1</b>	<b>0.6±0.2</b>	<b>0.5±0.1</b>	<b>0.5±0.1</b>	<b>0.8±0.1</b>	<b>0.7±0.1</b>	<b>0.5±0.2</b>
22:6 $\omega$ 3		0.1±0.0							0.1±0.0
<b>PUFA</b>	<b>1.8±0.6</b>	<b>1.6±0.2</b>	<b>1.3±0.1</b>	<b>1.7±0.6</b>	<b>1.6±0.4</b>	<b>1.6±0.2</b>	<b>2.4±0.1</b>	<b>2.0±0.2</b>	<b>1.5±0.5</b>
<b>Sum FA</b>	<b>23.0±5.4</b>	<b>15.6±2.7</b>	<b>24.5±11.4</b>	<b>13.4±8.0</b>	<b>10.4±1.8</b>	<b>13.0±1.6</b>	<b>18.3±5.1</b>	<b>22.2±9.5</b>	<b>21.9±9.8</b>
							<b>15.0±2.6</b>	<b>22.6±2.2</b>	<b>9.8±0.6</b>

**Annexe 5 : Stoichiometric constraints modulates impacts of silver contamination on stream detritivores: an experimental test with *Gammarus fossarum*. Arce-Funck *et al.* (2016)**



Freshwater Biology (2016)

doi:10.1111/fwb.12785

## Stoichiometric constraints modulate impacts of silver contamination on stream detritivores: an experimental test with *Gammarus fossarum*

JULIO ARCE-FUNCK\*, CLÉMENT CRENIER\*, MICHAEL DANGER\*†‡, CAROLE COSSU-LEGUILLE\*†, FRANÇOIS GUÉROLD\*†‡ AND VINCENT FELTEN\*†‡

\*Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, Université de Lorraine, LIEC, UMR 7360, Metz, France

†CNRS, LIEC, UMR 7360, Metz, France

‡LTER-“Zone Atelier Moselle”, LIEC, UMR 7360, Metz, France

### SUMMARY

1. Organisms commonly face multiple stresses in ecosystems, among which are toxic substances that add to natural ecological constraints such as insufficient resource quality. The combined effects of these stressors on species and ecosystems remain poorly investigated.
2. We hypothesised that feeding on high-quality resources in terms of phosphorus (P) content will improve the physiological state of consumers and thus increase tolerance to episodic metal stress by silver (Ag). We used a detritivorous crustacean from streams, *Gammarus fossarum*, to test this hypothesis.
3. The experimental design involved two phases. In the first phase, gammarids were fed *ad libitum* for 15 days to evaluate the effect of food quality on their energetic status. Gammarids were placed in laboratory microcosms and allowed to feed on two leaf species, alder and sycamore, that were colonised by aquatic fungi and experimentally enriched with P. At the end of this feeding period, we determined (i) food consumption, (ii) energetic reserves and (iii) physiological and behavioural states. In the second phase, gammarids previously consuming food of different quality were exposed to dissolved Ag (0, 0.5 and 1  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) for 4 days to investigate the physiological and behavioural responses of the consumers.
4. Elevated P concentrations in leaf litter increased the energetic reserves and locomotor activity of *G. fossarum*. Gammarids exposed to Ag had a low glycogen content, regardless of the Ag concentration and leaf P concentration, suggesting significant energy allocation to several aspects of organism maintenance (e.g. detoxification or compensatory mechanisms). In most cases, this investment appeared to prevent gammarids from carrying out lipid peroxidation (indicating cell membrane damage), except for those gammarids feeding on leaves with the highest P concentration.
5. Higher energetic storage (measured as glycogen content), related to higher elemental food quality, did not lead to a systematic increase in consumer tolerance to Ag, gammarids being unable to compensate for negative effects of Ag at the concentrations tested.

*Keywords:* Ag stress, Crustacea, ecological stoichiometry, invertebrate behaviour, nutritional ecology

### Introduction

Natural environments often impose multiple stresses, whose combined effects on species and ecosystems remain incompletely understood. In particular, at a time

when anthropogenic activities modify food quality and nutrient cycles as two major potential causes of stress (Whitehead & Crossman, 2011), the combined effect of food quality with abiotic stressors deserves attention. In the early literature on trophic dynamics of aquatic

Correspondence: Vincent Felten, Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC), Université de Lorraine, UMR 7360, Metz, France. E-mail: [vincent.felten@univ-lorraine.fr](mailto:vincent.felten@univ-lorraine.fr)

## 2 J. Arce-Funck et al.

ecosystems, energy was considered the sole limiting factor for consumers (Lindeman, 1942). However, consumers can also be limited by a range of chemical elements, including phosphorus (P; Danger *et al.*, 2013), whose ratios have been associated with the edibility, digestibility and mineral and biochemical composition of food items (Sterner & Elser, 2002; Wagner *et al.*, 2013). Numerous calls have been made to consider environmental context in ecotoxicological studies and thus increase realism in ecological risk assessment (Laskowski *et al.*, 2010; Beketov & Liess, 2012). Since resource elemental composition is an important ecological constraint (Sterner & Elser, 2002), consideration of this information might help achieve this goal. Ecological stoichiometry (ES) provides a useful conceptual framework to guide such assessments. ES addresses the mass balance of multiple chemical elements in ecological systems (Sterner & Elser, 2002). For example, growth rate and fecundity of consumers depend on the elemental stoichiometry of resources, whether the consumers rely on allochthonous organic matter (Danger *et al.*, 2013; González, Romero & Srivastava, 2014) or autochthonous primary production (Gulati & DeMott, 1997; Sundbom & Vrede, 1997). Nutrient concentrations and ratios of food also influence the structure of aquatic communities (Gaedke, Hochstetler & Straile, 2002; Andersen, Elser & Hessen, 2004) and often drive central ecosystem processes such as plant litter decomposition (Hladysz *et al.*, 2009) and nutrient recycling (Vanni *et al.* 2002).

In addition to natural ecological constraints such as insufficient food quality, organisms are exposed to numerous anthropogenic pollutants (Frossard *et al.*, 2014). Stress induced by such pollutants triggers energy-consuming defence mechanisms (e.g. detoxification, cell and/or tissue repair and compensatory mechanisms, defined as strategies adopted by stressed organisms to maintain homeostasis). Thus, when exposed to pollutants, organisms can increase their intake of energy and/or energy allocation to maintenance, to the detriment of other physiological functions (Kooijman *et al.*, 2009), reducing not only their energy reserves but also their fitness through reduced growth and reproduction. One important re-emergent pollutant in aquatic ecosystems is silver (Ag), due to the increased use of Ag nanoparticles in various industrial products and later release into the environment. For example, according to Blaser *et al.* (2008), 15% of total Ag (nanoparticles and other forms, including Ag ions) in European waters comes from biocidal textiles and plastics. Several studies have predicted increases in Ag concentrations in surface waters in the near future, as well as toxic effects on

aquatic organisms, which thus represents a potential risk for aquatic ecosystems (Geranio, Heuberger & Nowack, 2009; Gottschalk *et al.*, 2009; Arce-Funck *et al.*, 2013b; Bundschuh *et al.*, 2016).

Although a few studies have investigated the effect of pollutants on the quality of food for aquatic detritivores (Bundschuh *et al.*, 2011; Zubrod *et al.*, 2011; Arce-Funck *et al.*, 2013a), most have focused on the effect of resource quantity on organisms exposed to anthropogenic pollutants. Some consumers show increased sensitivity to pollutants when they are limited by food supply (Rose, Warne & Lim, 2002; Pieters *et al.*, 2006), but the opposite effect has also been observed (Alonso *et al.*, 2010). Less information is available about interactive effect of food stoichiometric quality and pollutants on aquatic organisms. The only two studies that assessed this combined effect were performed on *Daphnia magna* and showed inconsistent results (Hansen *et al.*, 2008; Lessard & Frost, 2013). Exposure to the antidepressant fluoxetine lowered survival, growth and reproduction rate when combined with high-quality food consisting of algae with low C : P ratios (Hansen *et al.*, 2008). In contrast, food poor in P amplified the negative effect of a herbicide on *Daphnia* growth and reproduction (Lessard & Frost, 2013). These interactive effects were only assessed, however, by determining responses of life-history traits, whereas physiological and behavioural responses were not considered, although they could improve understanding of the interactive effects.

The goal of this study was to evaluate the role of resource elemental stoichiometry in conferring tolerance of consumers to episodic metal stress. We hypothesised that organisms fed stoichiometrically high-quality resources, measured as C : nutrient ratio, would exhibit a better physiological state and thus better tolerate stress. To test this hypothesis, we first evaluated the effect of food P content on the metabolism and behaviour of *Gammarus fossarum*, an often-abundant crustacean detritivore that contributes importantly to leaf-litter breakdown in streams (Dangles *et al.*, 2004; Felten *et al.*, 2008b). Phosphorus content was chosen as an indicator of food quality since P can be a limiting factor for detritivores in streams (<20  $\mu\text{g P L}^{-1}$ ; Cross, Wallace & Rosemond, 2007) that affects key life-history traits (e.g. survival and growth rate) of these consumers (Danger *et al.*, 2013). In addition, to determine interactive effects of food elemental stoichiometry and metal stress, gammarids were fed leaves differing in P content and then exposed to environmentally realistic concentrations of Ag to assess several physiological [i.e. osmoregulation, energy metabolism, lipid peroxidation

(LPO)] and behavioural (i.e. ventilation and locomotor activity) responses.

## Methods

### Experimental set-up

Gammarids were collected with a hand net in La Maix stream (latitude 48°29'02.1" N, longitude 7°04'08.5" E), an unpolluted second-order forested stream in the Vosges Mountains of north-eastern France. The animals were placed in plastic coolers and transported to the laboratory within 2 h, where they were acclimated to laboratory conditions (12 °C, darkness, aerated water) for 7 days. Alder (*Alnus glutinosa*) leaves collected in the stream were provided as food. Water used for the experiment was also collected from La Maix stream and kept at 4 °C in the dark until use. The physicochemical characteristics of the stream water were as follows: pH = 7.2, conductivity = 54.3 IS cm<sup>-1</sup>, acid neutralising capacity = 278 leq. L<sup>-1</sup>, Cl<sup>-</sup> = 1.62 mg L<sup>-1</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = 2.35 mg L<sup>-1</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> = 2.23 mg L<sup>-1</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> < 0.02 mg L<sup>-1</sup>, Na<sup>+</sup> = 0.84 mg L<sup>-1</sup>, Ca<sup>2+</sup> = 4.09 mg L<sup>-1</sup>, K<sup>+</sup> = 1.25 mg L<sup>-1</sup> and Mg<sup>2+</sup> = 2.08 mg L<sup>-1</sup>. Before starting the experiment, the water temperature was increased from 4 to 12 °C. Leaf litter of alder and sycamore (*Acer pseudoplatanus*), which differ in food quality for detritivores (Hladyz *et al.*, 2009), was collected in the riparian zone of La Maix stream at abscission, dried and stored at room temperature until used.

Procedures used to manipulate and measure P concentrations of leaf litter were adopted from Danger *et al.* (2013) and are summarised in Fig. S1. Briefly, dried alder and sycamore leaves were soaked in deionised water for a few minutes before cutting 4040 discs (14 mm in diameter) while avoiding the main veins. Two control sets of 20 discs were stored at -20 °C for later analysis of carbon (C), nitrogen (N) and P. The remaining discs were introduced in 32 Erlenmeyer flasks (500 mL, 16 for each litter species). Each flask received 250 discs. The leaf discs were covered with 350 mL of deionised water, and autoclaved for 20 min. The sterilised discs from four randomly selected Erlenmeyer flasks per litter species (i.e. 1000 discs per species) were stored at -20 °C in Ziploc bags, with each bag containing 20 discs. These discs represent the non-conditioned (NC) treatment. Water of the 24 remaining Erlenmeyer flasks was replaced by 150 mL of sterile medium without P (Danger *et al.*, 2013). Next, 500 mL of a mycelium homogenate containing seven aquatic hyphomycete species (*Alatospora acuminata*, *Articulospora tetracladia*, *Flagellospora curvula*, *Neonectria lugdunensis*,

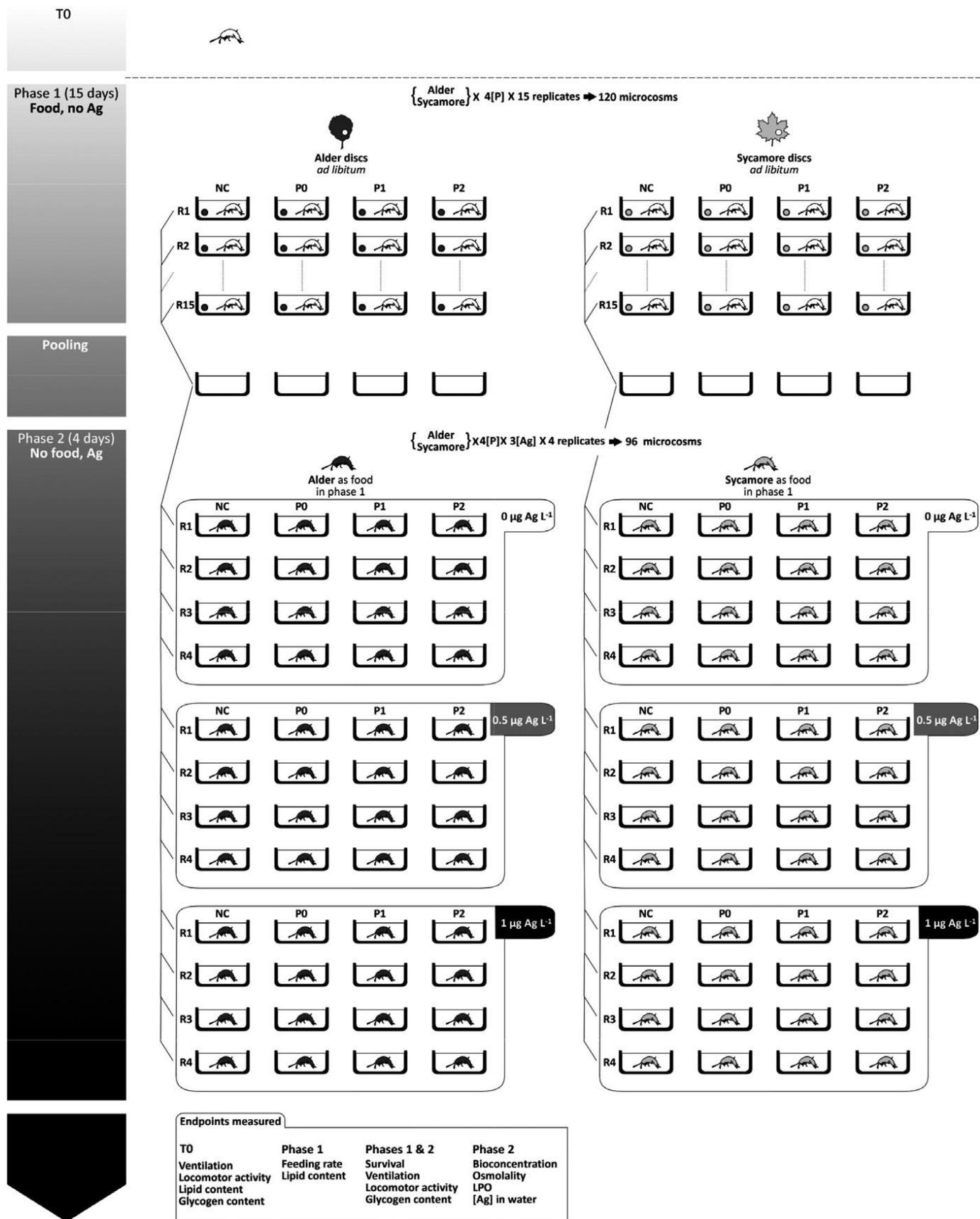
*Tetrachaetum elegans*, *Tricladium chaetocladium* and *Triscelophorus monosporus*) was added to each Erlenmeyer flask. The inoculated discs were incubated for 12 days in the dark at 15 °C on an orbital shaker. Culture medium was replaced every 3 days to avoid nutrient limitation of fungal growth. At the last medium replacement (i.e. after 9 days), 0, 110 or 735 µL of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> at 10 g P L<sup>-1</sup> was added to triplicate flasks per leaf-litter type (alder and sycamore). After 3 additional days, which is the time needed to induce P immobilisation without significantly increasing fungal biomass (Danger *et al.*, 2013), the discs were sorted, rinsed in deionised water and stored at -20 °C (c. 2 months for later CNP analysis).

A batch of five frozen leaf discs per replicate flask was freeze-dried, ground and weighed to the nearest 0.001 mg on a microbalance (Perkin Elmer AD6 Autobalance; Perkin Elmer Corp., Waltham, MA). C and N contents were quantified with a CHN elemental analyser (Carlo Erba NA2100; Thermo Quest CE International, Milan). P content was quantified after persulfate digestion and spectrophotometry as described by Danger *et al.* (2012).

### Experimental design

The experiment comprised two phases (Fig. 1). The first phase was designed to evaluate the effect of resource stoichiometry on physiological and behavioural characteristics of *G. fossarum*. Eight combinations were studied: two leaf-litter types (alder and sycamore) × four leaf conditioning treatments (NC, P0, P1 and P2). Each combination was replicated 15 times. Gammarids were sexed and sized to distribute sets of 20 males 7–8 mm in length in 120 microcosms (500-mL polypropylene tanks) containing 200 mL of stream water. Initial locomotor activity was measured on three additional sets of 10 randomly selected gammarids. Three to four of these specimens per replicate were used to measure individual ventilatory activity. The initial energetic status of the gammarids (glycogen and lipid content) was also measured on three batches of eight individuals (see below).

During the first phase of the experiment, the gammarids were fed *ad libitum* at 12 °C in the dark for 15 days. Duration and temperature were chosen to enable changes in energy status while minimising the risk of growth and moulting (based on Geffard *et al.*, 2010) and hence bias in the tested responses (e.g. energy, mortality, silver bioconcentration, feeding rate). Leaf discs and water were replaced twice a week to avoid food limitation and changes in water chemistry. All discs were freeze dried and weighed to the nearest



0.01 mg before and after being offered to animals to determine feeding rates. After 15 days, three sets of 10 gammarids from three replicates per treatment were used to assess the effect of food quality on locomotor activity. Ventilatory activity ( $n = 10$ ) was measured on three to four individuals that were randomly chosen among the 10 gammarids collected for determining locomotion activity. The energetic status of the gammarids (glycogen and lipid content) was measured on four replicates composed of eight individuals each.

During the second phase of the experiment, which was designed to evaluate the effect of diet quality on the tolerance of gammarids to episodic metal stress, all organisms from a given treatment were pooled before being randomly redistributed to four new replicates per treatment and exposed to three different concentrations of dissolved Ag for 4 days (20 gammarids per replicate). To limit Ag adsorption on the polypropylene walls of the microcosms during the feeding trials, the microcosms were previously exposed for 24 h to the corresponding Ag solutions prepared in stream water. The target AgNO<sub>3</sub> concentrations were 0, 0.5 and 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  and the measured total Ag concentrations in water at the start of the feeding trial were as follows: below detection limit of 0.1  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 0.14  $\pm$  0.02  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 1 = 0.43  $\pm$  0.02  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectively (mean  $\pm$  SD). These concentrations were chosen based on results obtained by Arce-Funck *et al.* (2013b), and to reflect realistic concentrations in surface waters polluted by silver. Ag solutions were replaced daily and the surviving gammarids counted at the same time. After 4 days, gammarids from each treatment were used to evaluate behavioural and physiological responses to Ag exposure. As in phase 1 of the experiment, three sets of 10 individuals were used to assess locomotor activity. Subsequently, three to four of these gammarids per replicate were used to determine ventilatory activity and osmoregulation. Eight individuals per replicate were used to determine glycogen content and LPO, and three organisms from three replicates were used for Ag bioconcentration measurements.

### Endpoints

Several responses of gammarids (i.e. endpoints) were selected to assess (i) effective exposure of the animals to

Ag (i.e. bioconcentration), (ii) effects on life history and behaviour (survival, feeding rate, ventilation and locomotor activity) and (iii) effects on vital body functions such as haemolymph osmolality, LPO and energy content by measuring body glycogen and lipid contents.

### Ag concentration in water and gammarids

To determine Ag concentrations, 5 mL of water was randomly collected each time before renewal of the water in the microcosms, acidified with 0.25% HNO<sub>3</sub> and analysed by graphite furnace atomic absorption spectrometry (Varian SpectrAA 300, Varian, Palo Alto). Ag in the initial stock solutions was also analysed. Triplicate samples consisting of three individual gammarids each were collected after 96 h of exposure. The gammarids were rinsed with nanopure water, gently dried on filter paper and immediately stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Samples were freeze dried, weighed and digested for 48 h with suprapur HNO<sub>3</sub> at 65  $^{\circ}\text{C}$  (1 mL for 30 mg gammarid dry mass). Final sample and standard solutions were adjusted to 2% HNO<sub>3</sub> by adding 4 mL of nanopure water before Ag quantification using graphite furnace atomic absorption spectrophotometry as above. To prevent any secondary contamination, all labware used for Ag analysis was soaked in 10% HCl, rinsed three times with deionised water and dried in a desiccator sheltered from atmospheric dust.

### Physiological responses and survival

Haemolymph osmolality is considered a sensitive marker of metal stress (Felten *et al.*, 2008a). Individual gammarids were gently blotted between two sheets of filter paper before haemolymph samples were taken by puncturing the telson of the gammarids with a microcapillary (hot-stretched glass tube). A drop of haemolymph was immediately transferred into mineral oil to prevent evaporation. Haemolymph osmolality was subsequently measured in 30-nL samples with a nano-osmometer (Otago Osmometers Ltd, Dunedin) and compared to a standard of 300 mOsm  $\text{kg}^{-1}$ .

Total lipids and glycogen were extracted from the gammarids with chloroform/methanol (1 : 2, v/v) and particles separated by centrifugation (3000  $g$  for 5 min at

Fig. 1 Experimental design to assess interactive effects of leaf-litter conditioning (fungal colonisation and P enrichment) and Ag exposure on *Gammarus fossarum*. At the end of phase 1 of the experiment, survivors of the 15 replicates for each leaf species and conditioning treatment were pooled and then randomly redistributed to the four replicates used in phase 2. NC, sterilised leaves not colonised by aquatic hyphomycetes; P0 to P2, sterilised leaves colonised by aquatic hyphomycetes and subject to no (P0), low (P1) or high (P2) enrichment levels.

6 J. Arce-Funck et al.

4 °C). Concentrations in the supernatant were measured spectrophotometrically according to Gismondi, Beisel & Cossu-Leguille (2012), based on Plaistow, Troussard & C'ezilly (2001). Commercial cholesterol and glucose were used as standards (VWR, Normapur). Lipid and glycogen contents were expressed in  $\mu\text{g mg}^{-1}$  gammarid wet mass.

Lipid peroxidation was estimated with the thiobarbituric reactive species assay (Buege & Aust, 1978), which quantifies a fluorescent substance formed by the reaction of thiobarbituric acid (VWR, Normapur, Radnor, PA) with malondialdehyde (MDA), a degradation product of LPO. Toxic metals produce reactive oxygen species (ROS) (Viarengo *et al.*, 1990), which can react with membrane lipids and thus lead to LPO and MDA formation. Although the assay is not specific, a low MDA content indicates effective antitoxic defence and is related to the level of damage experienced by cells (Cossu *et al.*, 2000).

### Survival

Survival was determined as the percentage of living gammarids at each water renewal (i.e. twice a week during phase 1 and daily during phase 2 of the experiment).

### Behavioural responses

Feeding rates were assumed to correspond to the total mass of leaf discs lost during the experiment per mass of gammarid and day. Ventilatory activity was recorded by observing the frequency of pleopod beats for 1 min (Felten *et al.*, 2008a). Individual gammarids were transferred to a glass tube (length: 25 cm; diameter: 0.75 cm). After 30 s of acclimatisation, pleopod beats were visually counted using a manual cell counter when the animals were resting. Locomotor activity was assessed by placing 10 randomly selected gammarids in an 800-mL tank with a piece of netting added as a resting surface (mesh size 200  $\mu\text{m}$ , 6 cm  $\times$  9.5 cm). Gammarids were acclimated for 5 min before the measurements. The number of moving animals was recorded 35 times for 2 s for each of three replicates. Ventilatory and locomotor activities were measured under similar light conditions and in the absence of noise, always at the same time of day to avoid any effects of circadian rhythms.

### Statistical analyses

All data are reported as means  $\pm$  standard deviations (SD). Responses expressed in per cent (P concentration, survival and locomotion) were arcsine root square

transformed before applying statistical tests. Data that were not expressed as a percentage but failed to meet ANOVA assumptions were  $\log(x + 1)$  transformed. Data were analysed by two-way (phase 1: leaf-litter P concentration and leaf species) or three-way (phase 2: leaf-litter P concentration, Ag concentration and leaf species) ANOVAs followed by *post hoc* Tukey tests. Ag concentrations in gammarids (log-transformed data) were analysed by one-way ANOVA followed by *post hoc* Tukey tests. When the assumptions of ANOVA were not met (Phase 2: osmolality and ventilatory activity), statistical comparisons were performed using PERMANOVA. Correlations between variables were assessed with Pearson's correlation coefficient. All analyses were performed with Statistica 7 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK), except for PERMANOVA (R version 3.2.2, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

## Results

### Effects of stoichiometric resource quality

Addition of P to the culture medium significantly affected leaf-litter P concentrations, although the effect depended on the leaf species (Fig. 2a, Table 1). Except

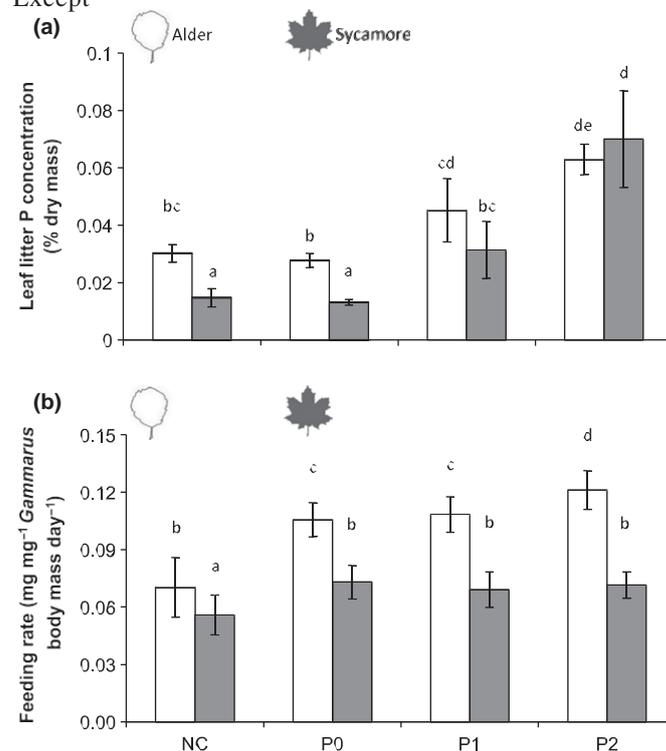


Fig. 2 Mean (TSD) P concentration in alder and sycamore leaf litter (a) and *Gammarus fossarum* feeding rate (b). Treatment codes as in Fig. 1. Responses to treatments sharing the same letter are not significantly different.

Table 1 Results of two-way ANOVAs testing for effects of P treatments and leaf species on nine response variables during phase 1 of the experiment.

Test and source of variation	d.f.	F	P-value
Leaf [C] (N = 3)			
Leaf species	1	30.8	<0.001
Leaf-litter conditioning	3	0.8	n.s.
Leaf species $\times$ leaf-litter conditioning	3	1.1	n.s.
Error	16		
Leaf [N] (N = 3)			
Leaf species	1	1128.7	<0.001
Leaf-litter conditioning	3	2.6	n.s.
Leaf species $\times$ leaf-litter conditioning	3	0.2	n.s.
Error	16		
Leaf [P] (N = 4)			
Leaf species	1	23.1	<0.001
Leaf-litter conditioning	3	64.6	<0.001
Leaf species $\times$ leaf-litter conditioning	3	5.3	<0.05
Error	24		
Survival (N = 15)			
Leaf species	1	2.9	n.s.
Leaf-litter conditioning	3	1.2	n.s.
Leaf species $\times$ leaf-litter conditioning	3	0.8	n.s.
Error	112		
<i>Gammarus fossarum</i> feeding rate (N = 15)			
Leaf species	1	331.1	<0.001
Leaf-litter conditioning	3	61.8	<0.001
Leaf species $\times$ leaf-litter conditioning	3	15.8	<0.05
Error	112		
Ventilation (N = 3)			
Leaf species	1	2.1	n.s.
Leaf-litter conditioning	3	0.2	n.s.
Leaf species $\times$ leaf-litter conditioning	3	0.05	n.s.
Error	16		
Locomotor activity (N = 3)			
Leaf species	1	21.6	<0.001
Leaf-litter conditioning	3	23.1	<0.001
Leaf species $\times$ leaf-litter conditioning	3	1.3	n.s.
Error	16		
Glycogen content (N = 4)			
Leaf species	1	2.2	n.s.
Leaf-litter conditioning	3	12.9	<0.001
Leaf species $\times$ leaf-litter conditioning	3	4.7	<0.001
Error	24		
Lipid content (N = 4)			
Leaf species	1	5.3	<0.05
Leaf-litter conditioning	3	28.9	<0.001
Leaf species $\times$ leaf-litter conditioning	3	35.7	<0.001
Error	24		

for the P2 treatment, the leaf P concentration in sycamore was significantly lower than in alder. P concentrations did not differ between the NC and P0 treatments, but increased by 50 and 108% in alder and by 113 and 376% in sycamore for the P1 and P2 treatments, respectively. C concentration in alder and sycamore averaged 51.7  $\pm$  0.8 and 49.5  $\pm$  1.1%, respectively, and differed significantly between leaf species ( $F_{1,16} = 30.8$ ,  $P \leq 0.001$ ;

data not shown). Leaf P treatment and its interaction with leaf species had no effect (Table 1). Similarly, N concentrations in alder and sycamore averaged 4.1  $\pm$  0.3 and 1.1  $\pm$  0.1%, respectively, and differed significantly between leaf species ( $F_{1,16} = 1128.7$ ,  $P \leq 0.001$ ; data not shown). Neither the P treatment nor its interaction with leaf species produced a significant effect (P effect:  $F_{3,16} = 2.58$ ,  $P = 0.089$ ; interaction:  $F_{3,16} = 0.21$ ,  $P = 0.89$ ; data not shown).

The average survivorship of gammarids feeding for 15 days on different food items was 90.2%. It was affected neither by leaf conditioning nor leaf species (Table 1). The feeding rate of *G. fossarum* was significantly affected by leaf conditioning, leaf species and their interaction (Fig. 2b, Table 1). Fungal colonisation of the litter increased the feeding rate of gammarids by 33–42% (alder) and 19–24% (sycamore) over the NC treatment. The feeding rate was also significantly higher on alder than on sycamore leaves. Increasing litter P concentrations tended to increase feeding rates on alder leaves further, but had no effect on the consumption of sycamore.

The initial glycogen content of gammarids was 0.8  $\pm$  0.1  $\mu\text{g mg}^{-1}$  body wet mass. After 15 days of feeding, leaf conditioning and the interaction between conditioning and leaf species significantly affected glycogen content, whereas no effect was noted for leaf species alone (Fig. 3a, Table 1). Glycogen content of the gammarids was not affected by fungal colonisation alone (NC versus P0), but was significantly increased by increasing litter P concentration of alder, although not of sycamore. The initial lipid content of gammarids was 65  $\pm$  21  $\mu\text{g mg}^{-1}$  body wet mass. After 15 days of feeding, it was significantly affected by leaf conditioning, leaf species and their interaction (Fig. 3b, Table 1). Although not affected by fungal colonisation alone (NC versus P0), lipid content was greatly increased by litter P concentration (P0 versus P1: by >100% for alder and sycamore; P0 versus P2: by 244% for alder), except for the sycamore P2 treatment, where the litter P concentration was reduced by 31%. Gammarids had a 60–78% higher lipid content when feeding on sycamore compared with alder, except for the P2 treatment where the lipid content was reduced by 65%.

The initial locomotor activity of gammarids corresponded to 43  $\pm$  1% of individuals moving during the observation period. After 15 days of feeding, leaf conditioning and leaf species significantly affected locomotor activity, whereas no interactive effect was noted (Fig. 3c, Table 1). Locomotor activity was significantly increased

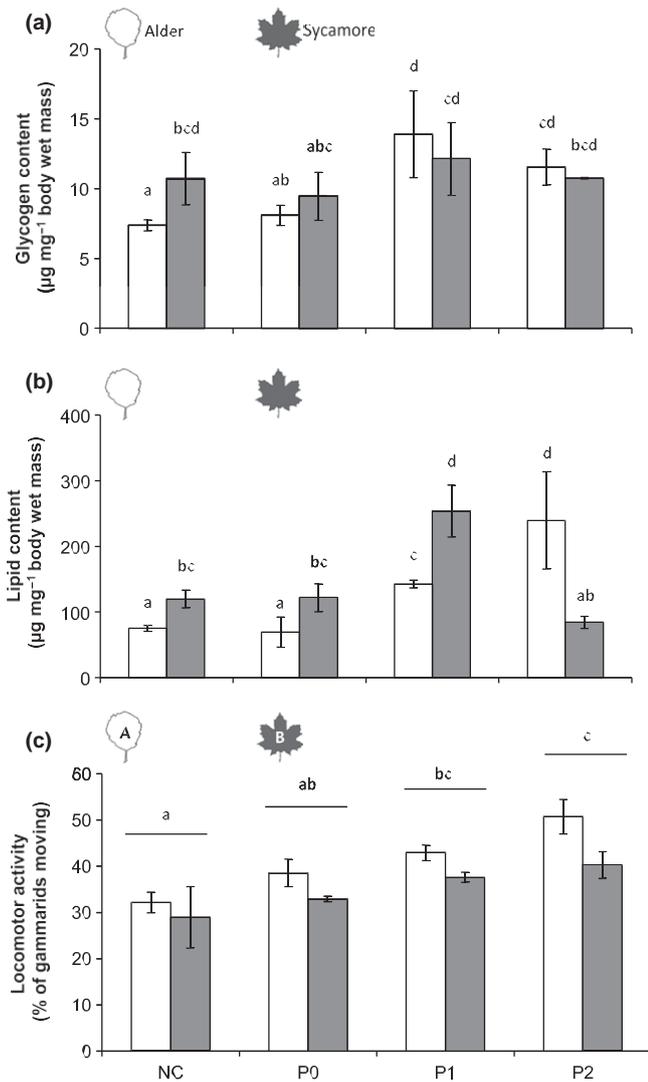


Fig. 3 Mean (TSD) glycogen content (a), lipid content (b) and locomotor activity (c) of *Gammarus fossarum* after 15 days of feeding on different resource qualities. Treatment codes as in Fig. 1. For panels (a) and (b), where significant interactions were found, different lowercase letters indicate significant differences among treatments. For panel (c), since no significant interaction was found for locomotor activity, analyses were restricted to the main effects, different lowercase letters indicating significant differences among leaf conditioning and P treatments and capital letters between leaf species.

by leaf conditioning (NC versus P0: 20% for alder, 14% for sycamore) and leaf-litter P content (P0 versus P2: 32% for alder, 22% for sycamore). Locomotor activity was positively correlated with leaf P concentration ( $r = 0.80$ ;  $P = 0.018$ ;  $n = 8$ ) and feeding rate ( $r = 0.85$ ;  $P = 0.007$ ;  $n = 8$ ). Gammarids feeding on alder had a significantly higher locomotor activity than those feeding on sycamore. Ventilation activity by gammarids before the experiment was  $205.2 \pm 2.7$  pleopod beats  $\text{min}^{-1}$ .

Neither leaf conditioning nor leaf species affected ventilatory activity after 15 days of feeding (Table 1).

#### Interactive effects of stoichiometric resource quality and Ag

The Ag concentration measured in water was negatively correlated with locomotor activity ( $r = -0.46$ ;  $P = 0.025$ ;  $n = 24$ ), ventilation ( $r = -0.81$ ;  $P < 0.0001$ ;  $n = 24$ ) and haemolymph osmolality ( $r = -0.69$ ;  $P < 0.0001$ ;  $n = 24$ ). Ag concentrations in gammarids not exposed to Ag were below the detection limit ( $0.05 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  in water; Fig. 4a,b). Exposure to Ag for 96 h increased the concentrations, whereas no effect of P treatment was apparent (Table 2). Doubling the Ag concentration in the water from  $0.5$  to  $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  further increased the Ag concentrations of gammarids by 133 and 194%, respectively, when alder and sycamore were provided as food. Gammarids previously feeding on alder had significantly higher Ag concentrations in their bodies than those feeding on sycamore. Ag bioconcentration was positively correlated with Ag concentration in water ( $r = 0.87$ ;  $P < 0.0001$ ;  $n = 24$ ), but negatively correlated with ventilation ( $r = -0.75$ ;  $P < 0.0001$ ;  $n = 24$ ) and haemolymph osmolality ( $r = -0.6$ ;  $P = 0.002$ ;  $n = 24$ ).

The haemolymph osmolality in gammarids not exposed to Ag was  $287 \pm 18$  to  $297 \pm 28 \text{ mOsm kg}^{-1}$ , independent of the P treatment (Fig. 4c,d). Increased Ag concentrations in the water reduced haemolymph osmolality by 13% ( $0.5 \text{ } \mu\text{g Ag L}^{-1}$ ) and 16% ( $1 \text{ } \mu\text{g Ag L}^{-1}$ ) compared to the control ( $0 \text{ } \mu\text{g Ag L}^{-1}$ ; PERMANOVA:  $F_{2,71} = 18.13$ ,  $r^2 = 0.34$ ,  $P < 0.01$ ), but no effects of leaf species, leaf conditioning or any interactions were detected. The ventilation activity of gammarids not exposed to Ag ranged from  $165 \pm 9$  to  $172 \pm 8$  pleopod beats  $\text{min}^{-1}$  (Fig. 4e,f). Ag concentration in the exposure medium had a significant effect on ventilation activity, whereas no effects of leaf species, leaf conditioning and interactions were observed (PERMANOVA:  $F_{2,71} = 39.92$ ,  $r^2 = 0.55$ ,  $P < 0.01$ ). Osmolality and ventilation activity were positively correlated ( $r = 0.76$ ;  $P < 0.001$ ;  $n = 24$ ).

Survival of *G. fossarum* was not significantly affected by Ag concentration in the water, leaf conditioning or leaf species (Table 2). However, Ag concentration, leaf conditioning and their interaction had significant effects on locomotion activity, although no effect of leaf species and other interactions was noted (Table 2; Fig. 5a,b). Specifically, in the absence of Ag contamination and as observed in phase 1 of the experiments, locomotor activity was increased (by up to 46% for alder and 77% for sycamore) with increasing leaf-litter P concentration. In

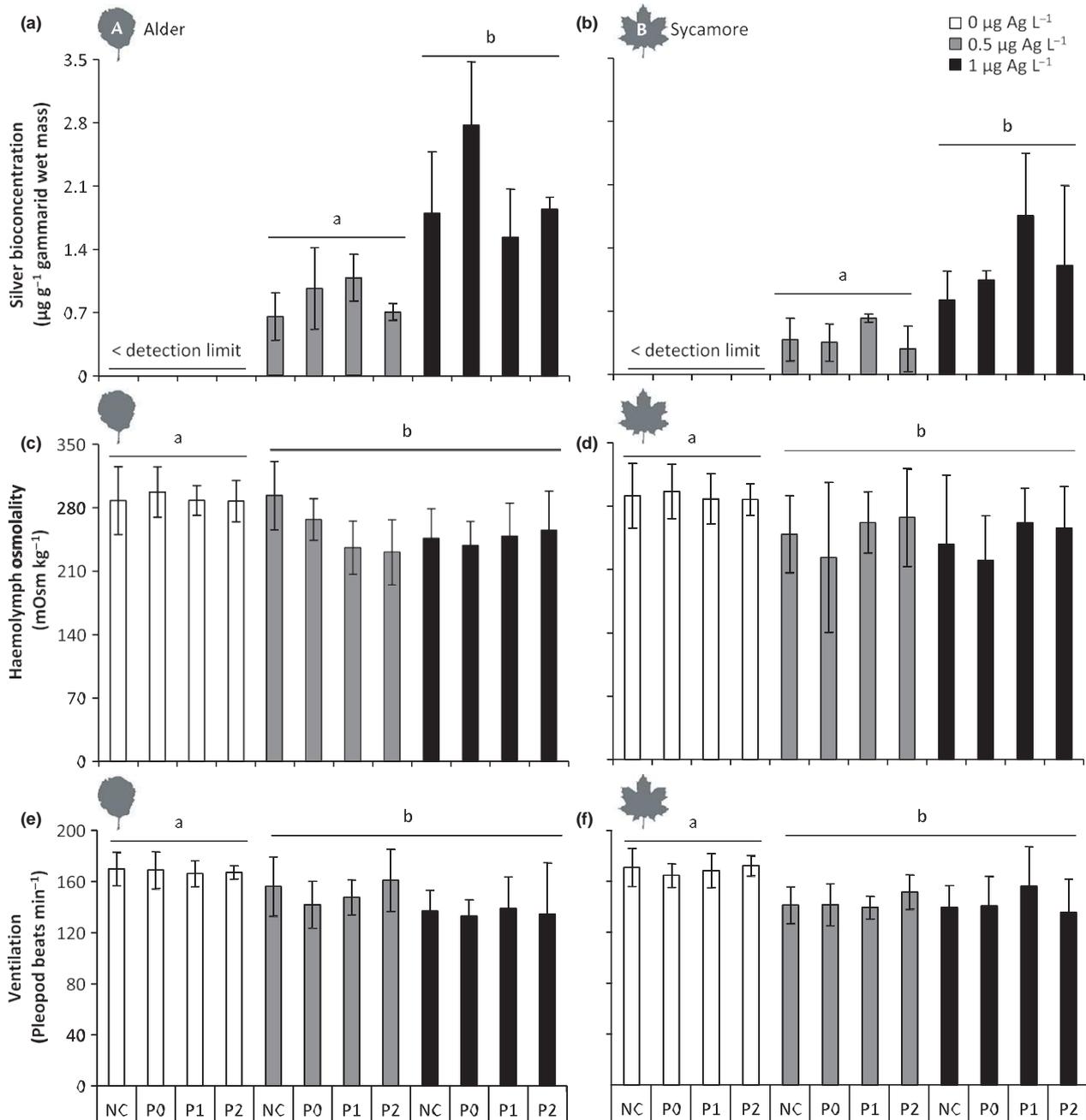


Fig. 4 Mean (TSD) Ag bioconcentration (a, b), haemolymph osmolality (c, d) and ventilation activity of gammarids (e, f) during experimental phase 2. Treatment codes as in Fig. 1. Responses to treatments sharing the same letter are not significantly different. For panels (c, d) and (e, f), where significant interactions were found, different lowercase letters indicate significant differences among treatments. For panels (a, b), since no significant interaction was found for silver bioconcentration, analyses were restricted to the main effects, different lowercase letters indicating significant differences among leaf conditioning and P treatments and capital letters between leaf species.

contrast, the locomotor activity of gammarids exposed to Ag showed no response to leaf conditioning or leaf species. Locomotor activity was positively correlated with ventilation activity ( $r = 0.48$ ;  $P = 0.017$ ;  $n = 24$ ).

Exposure to Ag, leaf conditioning, leaf species and all interactions had significant effects on glycogen content (Table 2, Fig. 5c,d). As observed in phase 1, glycogen content increased with increasing leaf P concentration in

Table 2 Results of three-way ANOVAs testing for effects of P treatments, Ag exposure and leaf species on five response variables determined during phase 2 of the experiment.

Test and source of variation	d.f.	F	P-value
<b>Survival (N = 4)</b>			
Leaf species	1	0.5	n.s.
Leaf-litter conditioning [Ag]	3	2.2	n.s.
	2	1.8	n.s.
Leaf species 9 leaf-litter conditioning	3	0.3	n.s.
Leaf species 9 [Ag]	2	0.5	n.s.
Leaf-litter conditioning 9 [Ag]	6	0.5	n.s.
Leaf species 9 leaf-litter conditioning 9 [Ag]	6	0.1	n.s.
Error	72		
<b>Bioconcentration in gammarids (N = 4)</b>			
Leaf species	1	28.4	<0.001
Leaf-litter conditioning [Ag]	3	2.4	n.s.
	1	66.8	<0.001
Leaf species 9 leaf-litter conditioning	3	2.2	n.s.
Leaf species 9 [Ag]	1	0.1	n.s.
Leaf-litter conditioning 9 [Ag]	3	0.7	n.s.
Leaf species 9 leaf-litter conditioning 9 [Ag]	3	1.5	n.s.
Error	32		
<b>Locomotor activity (N = 3)</b>			
Leaf species	1	0.4	n.s.
Leaf-litter conditioning [Ag]	3	17.9	<0.001
	2	24	<0.001
Leaf species 9 leaf-litter conditioning	3	1.7	n.s.
Leaf species 9 [Ag]	2	0.4	n.s.
Leaf-litter conditioning 9 [Ag]	6	8.6	<0.001
Leaf species 9 leaf-litter conditioning 9 [Ag]	6	2.3	n.s.
Error	48		
<b>Glycogen content (N = 4)</b>			
Leaf species	1	283.4	<0.001
Leaf-litter conditioning [Ag]	3	107.9	<0.001
	2	48	<0.001
Leaf species 9 leaf-litter conditioning	3	12	<0.001
Leaf species 9 [Ag]	2	11	<0.001
Leaf-litter conditioning 9 [Ag]	6	40.6	<0.001
Leaf species 9 leaf-litter conditioning 9 [Ag]	6	27.8	<0.001
Error	72		
<b>Lipid peroxydation (N = 4)</b>			
Leaf species	1	0.42	n.s.
Leaf-litter conditioning [Ag]	3	64.7	<0.001
	2	90.4	<0.001
Leaf species 9 leaf-litter conditioning	3	64.4	<0.001
Leaf species 9 [Ag]	2	8.6	<0.001
Leaf-litter conditioning 9 [Ag]	6	13.4	<0.001
Leaf species 9 leaf-litter conditioning 9 [Ag]	6	33.1	<0.001
Error	72		

the absence of Ag contamination. Glycogen content was also higher in gammarids feeding on alder compared to sycamore. Exposure to Ag significantly reduced the glycogen content of gammarids. However, the effect of

litter P concentration was weakened by Ag exposure because glycogen content was invariably low in these

conditions. Glycogen content and locomotor activity showed a significant positive relationship across all data points collected during the two phases of the experiment ( $r = 0.68$ ;  $P < 0.001$ ;  $n = 32$ ).

Exposure to Ag, leaf conditioning and all interactions had significant effects on LPO, whereas no effect of leaf species was noted (Table 2, Fig. 5e,f). The level of LPO in gammarids not exposed to Ag varied within a relatively narrow range (5.1 T 0.5 and 6.9 T 1.1 ng MDA  $\text{mg}^{-1}$  lipid); no effects of leaf species or conditioning were detected. In contrast, gammarids exposed to Ag tended to show higher LPO. Different patterns were observed between gammarids feeding on alder and sycamore leaves during phase 1. Compared to unexposed gammarids previously feeding on alder, the LPO of gammarids in the alder NC treatment was significantly higher (by 57 and 86% for 0.5 and 1  $\mu\text{g Ag L}^{-1}$ , respectively), similar for alder P0 and P1, and much higher for alder P2 (by 283 and 161% for 0.5 and 1  $\mu\text{g Ag L}^{-1}$ , respectively). In contrast, for sycamore leaves, the LPO of gammarids was similar in the P1 and P2 treatments, and higher in P0 (by 157 and 36% for 0.5 and 1  $\mu\text{g Ag L}^{-1}$ , respectively), whereas in the NC treatment, LPO was higher for gammarids exposed to 0.5  $\mu\text{g Ag L}^{-1}$  (by 80%), but similar following exposure to 1  $\mu\text{g Ag L}^{-1}$ .

## Discussion

### *Effects of stoichiometric resource quality*

Although numerous studies have evaluated the influence of food quantity on the energetic reserves of animals (i.e. glycogen or lipids), little if any information is available on the effect of food elemental concentrations, especially in detritus-based ecosystems. The results of our study, where aquatic detritivores were offered food *ad libitum*, show that glycogen and lipid storage by gammarids was positively related to leaf P concentration. The slightly higher feeding rates on P-enriched leaves we observed are, by themselves, insufficient to explain the observed differences in energy storage, especially for gammarids feeding on sycamore litter. Therefore, our results provide evidence that in addition to food quantity, resource stoichiometry can affect energy storage by consumers.

Energy storage was also independent of fungal leaf-litter conditioning (NC versus other treatments). This finding differs from the results of Zubrod *et al.* (2011), where lipid content was lowered when gammarids fed

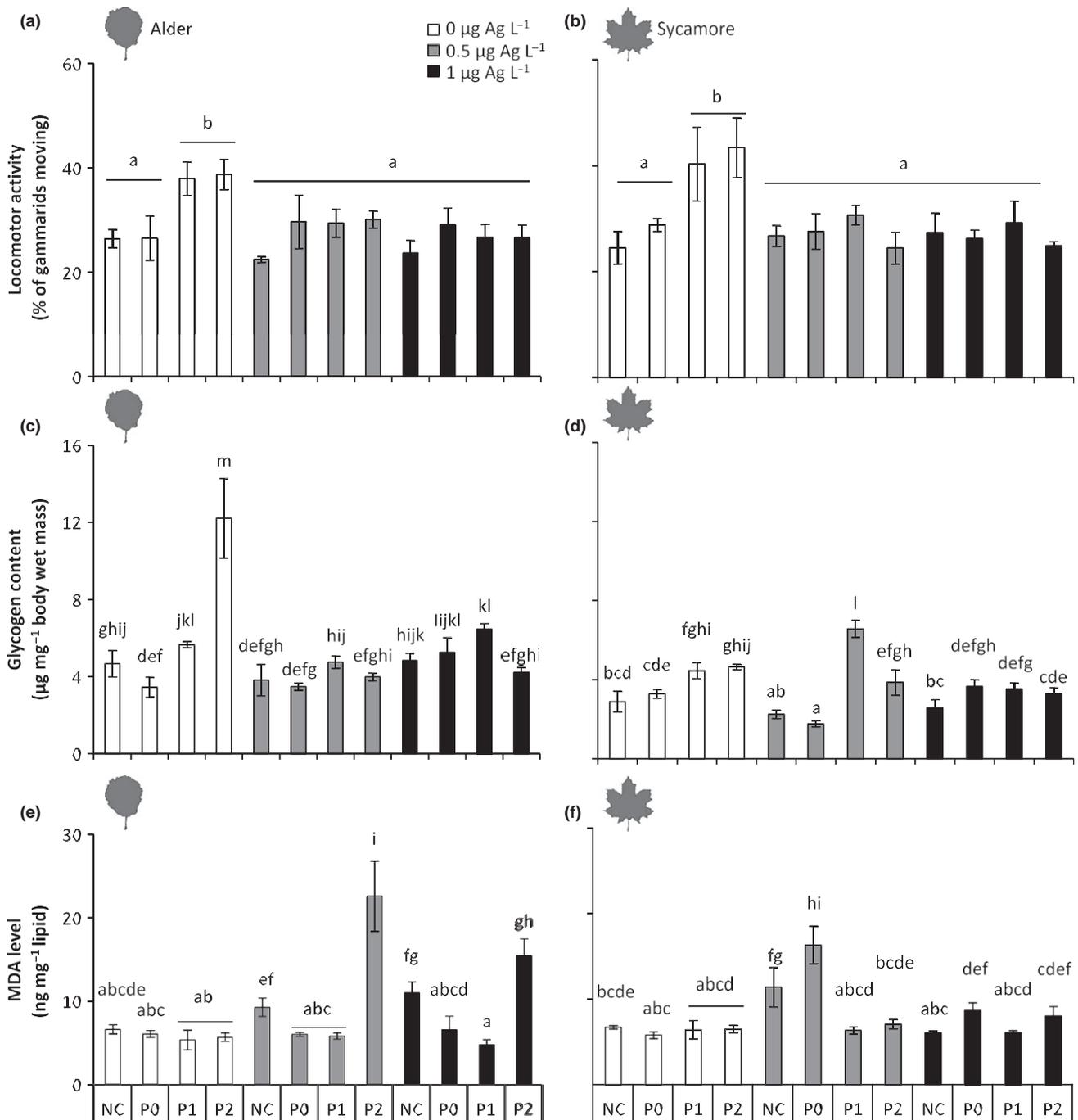


Fig. 5 Mean (TSD) proportion of gammarids moving (a, b) and glycogen (c, d) and lipid peroxidation (e, f) of gammarids during phase 2 of the experiment. Treatment codes as in Fig. 1. Responses to treatments sharing the same letter are not significantly different.

on leaves exposed to a fungicide that reduced fungal biomass. However, since no other endpoints were evaluated in that study, the lowered lipid content they observed could have been correlated with reduced leaf P concentrations. In this study, effects of leaf P

concentration on energy storage by gammarids also depended on leaf species, and was less pronounced for sycamore than for alder, especially for lipids. These differences between leaf-litter species might be explained by many factors, including differences in leaf-litter C

quality or contents of other important elements. In particular, since enzymes needed to digest food and to store energy are particularly rich in nitrogen (Sterner & Elser, 2002; Arrigo, 2005), the difference observed between leaf species might be at least partly due to the large difference in N concentrations of sycamore and alder leaves, although this hypothesis still needs to be tested.

Another important result of our study is the observed positive effect of resource quality (i.e. fungal colonisation and increased leaf P concentration) on *G. fossarum* locomotor activity, which was positively correlated with the glycogen content of gammarids. Locomotor activity depends on energy and most animals can reduce or halt energy-consuming processes such as movement (Hervant *et al.*, 1997), prey capture (Nandini & Sarma, 1999) or mate guarding (Becker *et al.*, 2013), when food is scarce (Koop *et al.*, 2011). Our result on *G. fossarum* suggests that resource quality in terms of P availability can have similar effects. Furthermore, since *G. fossarum* plays an important role in the breakdown of leaf litter in streams (Felten *et al.*, 2008b) and as a prey species of fish (Welton, 1979), such behavioural effects on the species might propagate to the ecosystem level, leading to slower leaf-litter breakdown, lower invertebrate secondary production and hence reduced energy and nutrient transfer to top predators.

Although gammarids consumed significantly more leaf litter colonised by fungi (NC) than non-conditioned leaves (P0, P1 and P2), the effect of P enrichment on feeding rates was restricted to a slight increase for alder leaves at the highest P enrichment level. Previous studies have found contradictory results, with some reporting compensatory feeding (i.e. increased consumption rate of low-quality food; e.g. Flores, Larranaga & Elo-segi, 2014), whereas others did not (e.g. Gergs & Rothhaupt, 2008). We cannot rule out that P addition modified properties of leaf litter other than P concentration, despite the short duration (3 days) of our study. For example, although leaf-litter N and C contents were unaffected by P enrichment, factors such as shifts in fungal community structure or activity also could have influenced the feeding activity of gammarids, as has been found in other studies (Arsuffi & Suberkropp, 1989; Danger *et al.*, 2012).

#### *Interactive effects of resource stoichiometry and Ag stress*

We hypothesised that feeding on stoichiometrically high-quality resources would enhance the physiological state of consumers, which would increase the tolerance of gammarids to episodic Ag stress. Our results do not

fully support this hypothesis, since the higher energetic content of gammarids we observed was not systematically associated with higher Ag tolerance. Instead, the responses of gammarids were more complex. In particular, high food quality failed to alleviate the reduction in ventilation or locomotion activity caused by exposure to Ag, suggesting that Ag stress was too strong for the gammarids to maintain these body functions at normal levels even under conditions of favourable food supply. Exposure to stress commonly reduces gammarid ventilation and locomotor activity (acidification: Macedo-Sousa *et al.*, 2008; Felten *et al.*, 2008c; Cd: Felten *et al.*, 2008a; Ag: Arce-Funck *et al.*, 2013b). In *Gammarus duebeni* exposed to metal stress, such decreases were attributed to a reduction in available energy or to a redirection from muscle to detoxification activities (i.e. production of metallothioneins, stress proteins and antioxidant defence enzymes; Lawrence & Poulter, 1998). These expectations are consistent with the reduced glycogen content of gammarids exposed to Ag in our study. Glycogen is generally the first compound to be mobilised in organisms exposed to stress (Dutra *et al.*, 2009), suggesting that a decline reflects increased energy costs associated with the activation of tolerance mechanisms to counter Ag stress. In addition, since locomotion is required to escape predation and to find food and mates, any pollutant interfering with this activity is likely to reduce fitness and thus impact population persistence and the ecosystem processes driven by the affected species (Scott & Sloman, 2004).

Ag accumulates primarily in the gills and hepatopancreas of crustaceans (Bury *et al.*, 2002) and causes ion- and osmoregulation failure related to the inhibition of gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, leading to losses of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  and, thus, to a reduction in haemolymph osmolality (*G. fossarum*: Arce-Funck *et al.*, 2013b). Our results show, again, that higher initial levels of lipids and glycogen in gammarids fed with high-P leaf litter were insufficient to maintain normal levels of osmoregulation. Similarly, despite significant bioconcentration during exposure of gammarids to Ag, we found no significant effect of gammarid energetic content on Ag bioconcentration. These results indicate that effects of resource quality on physiological performance were too subtle to be observed on organisms facing acute Ag stress at the concentrations tested here.

In contrast to the endpoints discussed above, LPO activity of gammarids induced by Ag was significantly modulated by leaf P concentration, as indicated by a negative correlation with LPO activity, except for gammarids feeding on alder leaves of the highest quality

(P2). Ag has been shown to stimulate membrane LPO because of ROS production (Arce-Funck *et al.*, 2013b). Cells can limit toxic effects of ROS by inducing antioxidative defence reactions (e.g. by Se-glutathione peroxidase) and synthesis of metallothioneins, which bind heavy metals (Viarengo *et al.*, 2000; Arce-Funck *et al.*, 2013b). Since such defence mechanisms require energy, energy storage facilitated by the ingestion of P-rich food could mitigate oxidative stress on consumers. However, opposite results were found for alder leaf litter at the highest P concentration, a result resembling the negative impact of resource elemental quality on *Daphnia* exposed to an organic pollutant (Hansen *et al.*, 2008). Although the first phase of our experiment was short enough to prevent moulting of the gammarids during the feeding phase, the highest growth rates was likely to occur in the alder P2 treatment, as found by Danger *et al.* (2013). Since organisms are most sensitive to pollutants during moulting (McCahon & Pascoe, 1988), it is plausible that during the second phase of the experiment gammarids in the alder P2 treatment were closer to moulting (e.g. moulting stage D, *sensu* Geffard *et al.*, 2010), as observed in another experiment (unpublished results). Hence, gammarids fed the highest-quality food would have been more sensitive to Ag than those fed low-quality food, which could explain the high LPO levels observed in the former.

### Acknowledgments

We thank A. Tlili and M. Gessner for the invitation to contribute to this special issue. This work was supported by the Young Researcher programme of the Region Lorraine to VF and MD, the Zone Atelier Moselle, the ICARE EC2CO programme to MD, the ANR P2N MESONNET and the French National Research Agency through the national programme “Investissement d’avenir” (reference ANR-10-LABX-21-RESSOURCES21). We are grateful to P. Rousselle for chemical analyses and to A. Tlili, M. Gessner and two anonymous reviewers for their constructive comments on an earlier draft of the manuscript.

### References

Alonso A., Garcia-Johansson V., De Lange H.J. & Peeters E.T.H.M. (2010) Effects of animal starvation on the sensitivity of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* to cadmium. *Chemistry and Ecology*, 26, 233–242.

Andersen T., Elser J.J. & Hessen D.O. (2004) Stoichiometry and population dynamics. *Ecology Letters*, 7, 884–900.

Arce-Funck J., Clivot H., Felten V., Rouselle P., Guérol F. & Danger M. (2013a) Phosphorus availability modulates the toxic effect of silver on aquatic fungi and leaf litter decomposition. *Aquatic Toxicology*, 144–145, 199–207.

Arce-Funck J., Danger M., Gismondi E., Cossu-Leguille C., Guérol F. & Felten V. (2013b) Behavioural and physiological responses of *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda) exposed to silver. *Aquatic Toxicology*, 142–143, 73–84.

Arrigo K.V. (2005) Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature*, 437, 349–355.

Arsuffi T.L. & Suberkropp K. (1989) Selective feeding by shredders on leaf-colonizing stream fungi: comparison of macroinvertebrate taxa. *Oecologia*, 79, 30–37.

Becker J., Ortmann C., Wetzel M.A., Winkelmann C. & Koop J.H.E. (2013) Mate guarding in relation to seasonal changes in the energy reserves of two freshwater amphipods (*Gammarus fossarum* and *G. pulex*). *Freshwater Biology*, 58, 372–381.

Beketov M.A. & Liess M. (2012) Ecotoxicology and macroecology – time for integration. *Environmental Pollution*, 162, 247–254.

Blaser S.A., Scheringer M., MacLeod M. & Hungerbühler K. (2008) Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: contribution of nano-functionalized plastics and textiles. *Science of the Total Environment*, 390, 396–409.

Buege J.A. & Aust S.D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52, 302–310.

Bundschuh M., Bundschuh M., Seitz F., Rosenfeldt R.R. & Schulz R. (2016) Effects of nanoparticles in fresh waters – risks, mechanisms and interactions. *Freshwater Biology*, doi:10.1111/fwb.12701, in press.

Bundschuh M., Zubrod J.P., Kosol S., Maltby L., Stang C., Duester L. *et al.* (2011) Fungal composition on leaves explains pollutant-mediated indirect effects on amphipod feeding. *Aquatic Toxicology*, 104, 32–37.

Bury N.R., Shaw J., Glover C. & Hogstrand C. (2002) Derivation of a toxicity-based model to predict how water chemistry influences silver toxicity to invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 133, 259–270.

Cossu C., Doyotte A., Babut M., Exinger A. & Vasseur P. (2000) Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45, 106–121.

Cross W.F., Wallace J.B. & Rosemond A.D. (2007) Nutrient enrichment reduces constraints on material flows in a detritus-based food web. *Ecology*, 88, 2563–2575.

Danger M., Arce-Funck J., Devin S., Heberle J. & Felten V. (2013) Phosphorus content in detritus controls life-history traits of a detritivore. *Functional Ecology*, 27, 807–815.

- Danger M., Cornut J., Elger A. & Chauvet E. (2012) Effects of burial on leaf litter quality, microbial conditioning and palatability to three shredder taxa. *Freshwater Biology*, 57, 1017–1030.
- Dangles O., Gessner M.O., Gu'eroald F. & Chauvet E. (2004) Impacts of stream acidification on litter breakdown: implications for assessing ecosystem functioning. *Journal of Applied Ecology*, 41, 365–378.
- Dutra B.K., Fernandes F.A., Lauffer A.L. & Oliveira G.T. (2009) Carbofuran-induced alterations in the energy metabolism and reproductive behaviors of *Hyalella castroi* (Crustacea, Amphipoda). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149, 640–646.
- Felten V., Charmantier G., Charmantier-Daures M., Aujoulat F., Garric J. & Geffard O. (2008c) Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* exposed to acid stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 147, 189–197.
- Felten V., Charmantier G., Charmantier-Daures M., Garric J. & Geffard O. (2008a) Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea Amphipoda) exposed to Cadmium. *Aquatic Toxicology*, 83, 413–425.
- Felten V., Tixier G., Gu'eroald F., De Billy V.D.C. & Dangles O. (2008b) Quantification of diet variability in a stream amphipod: implications for ecosystem functioning. *Fundamental and Applied Limnology*, 170, 303–313.
- Flores L., Larranaga A. & Elosegı E. (2014) Compensatory feeding of a detritivore alleviates the effects of poor food quality when enough food is supplied. *Freshwater Science*, 33, 134–141.
- Frossard V., Millet L., Verneaux V., Jenny J.-P., Arnaud F., Magny M. *et al.* (2014) Depth-specific responses of a chironomid assemblage to contrasting anthropogenic pressures: a palaeolimnological perspective from the last 150 years. *Freshwater Biology*, 59, 26–40.
- Gaedke U., Hochst€ader S. & Straile D. (2002) Interplay between energy limitation and nutritional deficiency: empirical data and food web models. *Ecological Monographs*, 2, 251–270.
- Geffard O., Xuereb B., Chaumot A., Geffard A., Biagianti S., Néd C. *et al.* (2010) Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: application for reproductive toxicity assessment. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 29, 2249–2259.
- Geranio L., Heuberger M. & Nowack B. (2009) The behavior of silver nanotextiles during washing. *Environmental Science and Technology*, 43, 8113–8118.
- Gergs R. & Rothhaupt K.-O. (2008) Feeding rates, assimilation efficiencies and growth of two amphipod species on biodeposited material from zebra mussels. *Freshwater Biology*, 53, 2494–2503.
- Gismondi E., Beisel J.N. & Cossu-Leguille C. (2012) Influence of gender and season on reduced glutathione concentration and energy reserves of *Gammarus roeseli*. *Environmental Research*, 118, 47–52.
- González A.L., Romero G.Q. & Srivastava D.S. (2014) Detrital nutrient content determines growth rate and elemental composition of bromeliad-dwelling insects. *Freshwater Biology*, 59, 737–747.
- Gottschalk F., Sonderer T., Scholz R.W. & Nowack B. (2009) Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. *Environmental Science and Technology*, 43, 9216–9222.
- Gulati R. & DeMott W. (1997) The role of food quality for zooplankton: remarks on the state-of-the-art, perspectives and priorities. *Freshwater Biology*, 38, 753–768.
- Hansen L.K., Frost P.C., Larson J.H. & Metcalfe C.D. (2008) Poor elemental food quality reduces the toxicity of fluoxetine on *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, 86, 99–103.
- Hervant F., Mathieu J., Barré H., Simon K. & Pinon C. (1997) Comparative study on the behavioral, ventilatory, and respiratory responses of hypogean and epigean crustaceans to long-term starvation and subsequent feeding. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 118, 1277–1283.
- Hladyz S., Gessner M.O., Giller P.S., Pozo J. & Woodward G. (2009) Resource quality and stoichiometric constraints on stream ecosystem functioning. *Freshwater Biology*, 54, 957–970.
- Kooijman S.A.L.M., Baas J., Bontje D. & Broerse M. (2009) Ecotoxicological applications of dynamic energy budget theory. In: *Ecotoxicology Modeling* (Ed. J. Devillers), pp. 2237–2259. Emerging Topics in Ecotoxicology: Principles, Approaches and Perspectives, Vol. 2. Springer, New York, NY.
- Koop J.E., Winkelmann C., Becker J., Hellmann C. & Ortman C. (2011) Physiological indicators of fitness in benthic invertebrates: a useful measure for ecological health assessment and experimental ecology. *Aquatic Ecology*, 45, 547–559.
- Laskowski R., Bednarska A.J., Kramarz P.E., Loureiro S., Scheil V., Kudlek J. *et al.* (2010) Interactions between toxic chemicals and natural environmental factors – a meta-analysis and case studies. *Science of the Total Environment*, 408, 3763–3774.
- Lawrence J.A. & Poulter C. (1998) Development of a sublethal pollution bioassay using the estuarine amphipod *Gammarus duebeni*. *Water Research*, 32, 569–578.
- Lessard C.R. & Frost P.C. (2013) Phosphorus nutrition alters herbicide toxicity on *Daphnia magna*. *Science of the Total Environment*, 421–422, 124–128.
- Lindeman R.L. (1942) The trophic-dynamic aspect of ecology. *Ecology*, 23, 399–418.
- Macedo-Sousa J.A., Gerhardt A., Brett C.M.A., Nogueira A.J.A. & Soares A.M.V.M. (2008) Behavioural responses of indigenous benthic invertebrates (*Echinogammarus meridionalis*, *Hydropsche pellucidula* and *Choroterpes picteti*)

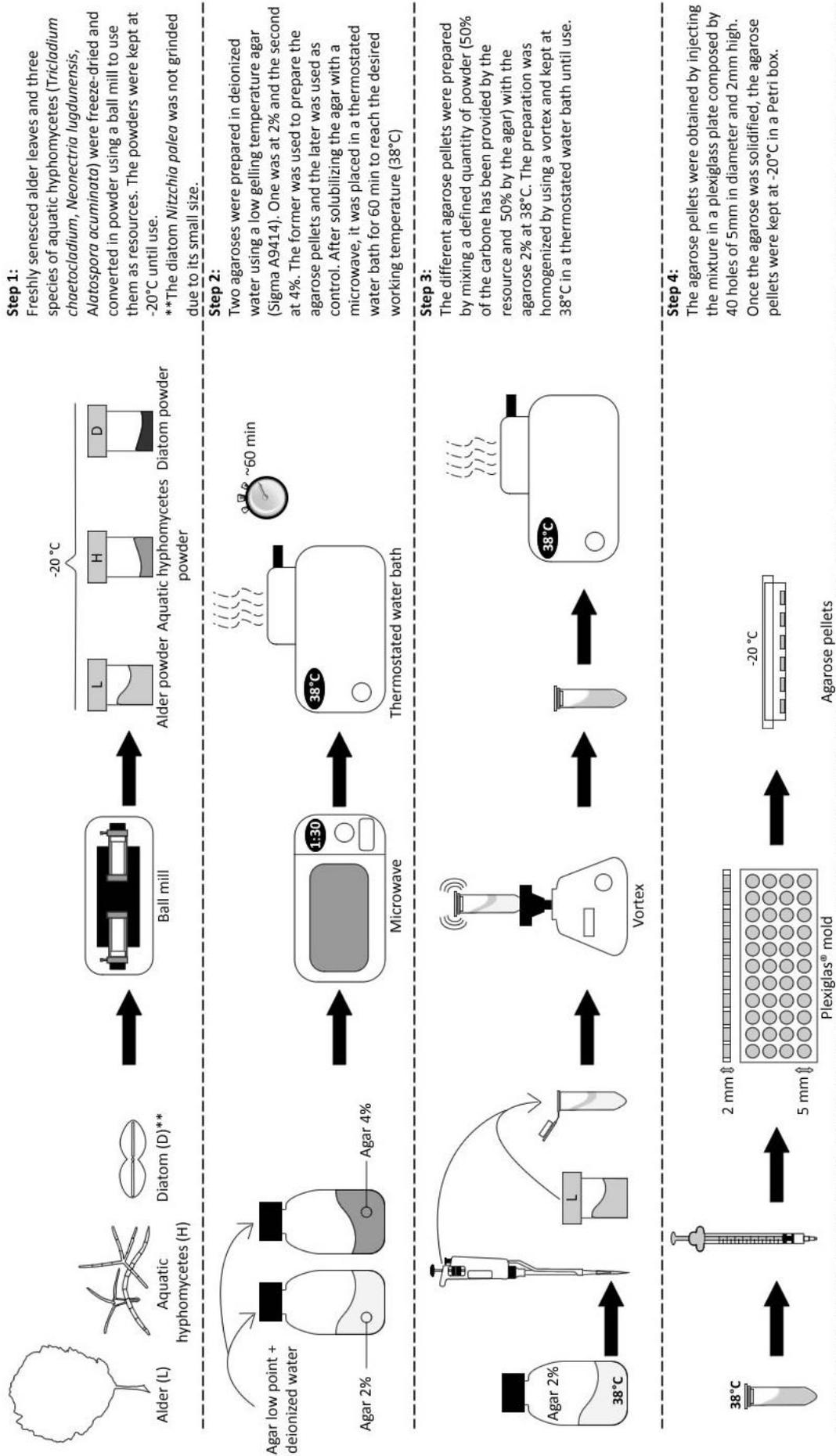
- to a pulse of acid mine drainage: a laboratorial study. *Environmental Pollution*, 156, 966–973.
- McCahon C.P. & Pascoe D. (1988) Cadmium toxicity to the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) during the moult cycle. *Freshwater Biology*, 19, 197–203.
- Nandini S. & Sarma S.S.S. (1999) Effect of starvation time on the prey capture behaviour, functional response and population growth of *Asplanchna sieboldi* (Rotifera). *Freshwater Biology*, 42, 121–130.
- Pieters B., Jager T., Kraak M.S. & Admiraal W. (2006) Modeling responses of *Daphnia magna* to pesticide pulse exposure under varying food conditions: intrinsic versus apparent sensitivity. *Ecotoxicology*, 15, 601–608.
- Plaistow S.J., Troussard J.-P. & C'ezilly F. (2001) The effect of the acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis* on the lipid and glycogen content of its intermediate host *Gammarus pulex*. *International Journal of Parasitology*, 31, 346–351.
- Rose R.M., Warne M.S.J. & Lim R.P. (2002) Food concentration affects the life history response of *Ceriodaphnia cf. dubia* to chemicals with different mechanisms of action. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 51, 106–114.
- Scott G.R. & Sloman K.A. (2004) The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology*, 68, 369–392.
- Sterner R.W. & Elser J.J. (2002) *Ecological Stoichiometry: The Biology of Elements From Molecules to the Biosphere*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Sundbom M. & Vrede T. (1997) Effects of fatty acid and phosphorus content of food on the growth, survival and reproduction of *Daphnia*. *Freshwater Biology*, 38, 665–674.
- Vanni M.J. (2002) Nutrient cycling by animals in freshwater ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33, 341–370.
- Viarengo A., Canesi L., Pertica M., Poli G., Moore M.N. & Orunesu M. (1990) Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 97C, 37–42.
- Viarengo A., Burlando B., Ceratto N. & Panfoli I. (2000) Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cellular and Molecular Biology*, 46, 407–417.
- Wagner N.D., Hillebrand H., Wacker A. & Frost P.C. (2013) Nutritional indicators and their uses in ecology. *Ecology Letters*, 16, 535–544.
- Welton J.S. (1979) Life-history and production of the amphipod *Gammarus pulex* in a dorset chalk stream. *Freshwater Biology*, 9, 263–275.
- Whitehead P.G. & Crossman J. (2011) Macronutrient cycles and climate change: key science areas and an international perspective. *Science of the Total Environment*, 434, 13–17.
- Zubrod J.P., Bundschuh M., Flecker A., Englert D. & Schulz R. (2011) Ecotoxicological impact of the fungicide tebuconazole on an aquatic decomposer-detritivore system. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30, 2718–2724.

### Supporting Information

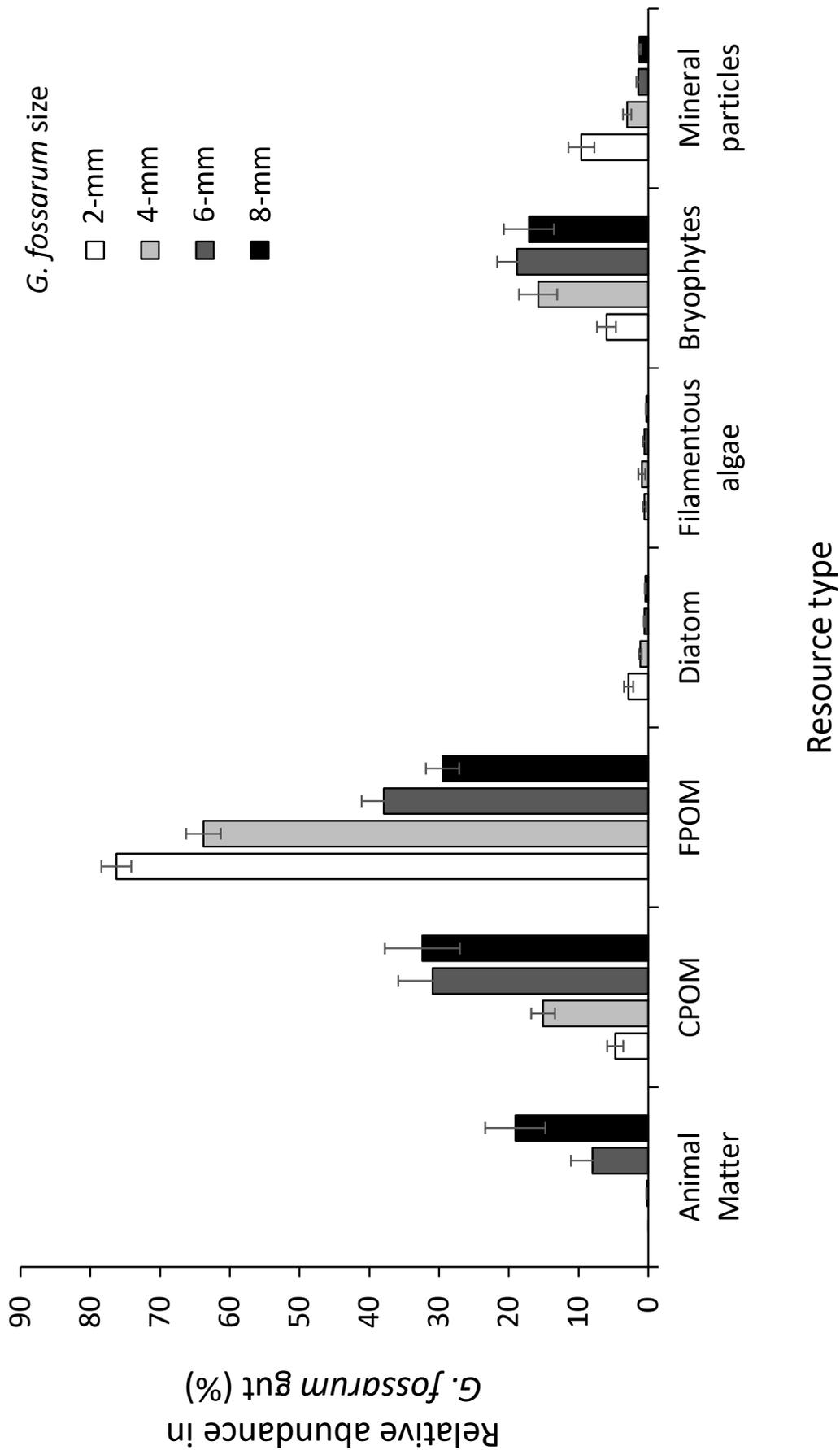
Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Procedures to manipulate the nutrient stoichiometry of leaf litter used in feeding trials.

(Manuscript accepted 11 May 2016)



Supplementary information S1: Schematic explanation of the preparation of agarose pellets



**Supplementary information S2:** Relative abundance (as a percentage of the area occupied by the item on the microscope slide) of the different food items found in the foregut of *Gammarus fossarum* organisms collected in the forested headwater stream, La Maix (north-eastern France), as a function of their size. FPOM (Fine Particulate Organic Matter) corresponds to fine amorphous detritus, and CPOM (Coarse Particulate Organic Matter) corresponds to coarse leaf detritus-woody debris. Error bars represent standard deviations.





## Résumé

Les cours d'eau de tête de bassin versant, malgré leurs tailles réduites, jouent des rôles importants pour le fonctionnement des milieux situés en aval, et rendent de nombreux services écologiques. Depuis l'émergence du *River Continuum Concept*, le fonctionnement de ces cours d'eau est considéré comme reposant principalement sur les apports allochtones de matière organique détritique par opposition aux écosystèmes aval de plus grande taille dans lesquels la production primaire autochtone est considérée comme prépondérante. Bien que les détritus soient, par définition, des ressources de moindre qualité pour leurs consommateurs que les végétaux vivants, le rôle des facteurs qui limitent la production biologique et les processus fonctionnels dans ces écosystèmes détritiques reste encore peu exploré. Par exemple la carence en éléments minéraux essentiels (notamment en azote et en phosphore) dans les détritus peut limiter le développement des organismes vivants dans les cours d'eau. De ce fait, la disponibilité en éléments minéraux dans la colonne d'eau, en stimulant la croissance, l'activité des décomposeurs et la qualité élémentaire des ressources par le processus d'immobilisation microbienne, pourrait contrôler pour partie les processus écologiques en jeu dans ces écosystèmes. En étudiant *in situ* la réponse des communautés microbiennes aux nutriments le long d'un gradient d'occupation des sols, nos travaux ont mis en évidence un effet positif des éléments dissous (N et P) sur la décomposition des litières et les activités enzymatiques des décomposeurs, et ce même pour les niveaux en nutriments les plus élevés du gradient, pour lesquels des effets inverses étaient attendus. Indépendamment, dans des cours d'eau anciennement soumis à de forts dépôts acidifiants, nous avons pu observer une récupération du processus de décomposition des litières. Néanmoins, cette restauration s'accompagnant d'un appauvrissement marqué en N, des perturbations du fonctionnement de ces cours d'eau pourrait se manifester à terme. Le rôle de la production primaire dans les cours d'eau de tête de bassin versant a ensuite été questionné. En effet, bien qu'étant mineur quantitativement, l'apport de carbone de forte qualité pourrait jouer un rôle non négligeable sur le fonctionnement des cours d'eau de tête de bassin versant. En particulier, l'importance et le rôle des apports en acides gras polyinsaturés (AGPI) via les biofilms phototrophes ont été questionnés. En se basant sur un suivi de terrain sur 15 cours d'eau des Vosges le long d'un gradient d'acidification, nos recherches ont tout d'abord pu mettre en évidence la présence de biofilms diatomiques riches en AGPI, malgré le caractère très forestier de ces cours d'eau. Dans un second temps, une expérience en conditions contrôlées a permis d'observer le rôle positif des apports, mêmes faibles, de ressources diatomiques sur la croissance et la survie du crustacé amphipode *Gammarus fossarum*. Sans cet apport, ces organismes se sont avérés incapables de maintenir leurs niveaux internes d'AGPI, suggérant qu'une consommation de producteurs primaires autochtones était indispensable à ces organismes détritiques. Nos résultats ont ainsi pu mettre en évidence les rôles fondamentaux que peuvent jouer la disponibilité en éléments dissous (N et P) et la qualité du carbone dans les ressources sur la production biologique et sur le processus de décomposition des litières dans les cours d'eau de tête de bassin versant. Ces résultats appellent désormais à investiguer plus profondément les interactions entre ces deux facteurs limitants, et à comprendre dans quels contextes l'un des facteurs pourrait suppléer l'autre. En particulier, il sera intéressant de rechercher comment diverses perturbations anthropiques (xénobiotiques, réchauffement climatique etc...) pourraient affecter l'intensité ou la nature de ces limitations.

**Mots-clés :** Ecologie fonctionnelle, stœchiométrie écologique, acides gras polyinsaturés, producteurs primaires, macroinvertébrés déchetiers, décomposition.

---

## Abstract

Despite their reduced sizes, headwater streams play important roles in the functioning of downstream ecosystems and provide numerous ecological services. Since the River Continuum Concept, the functioning of these streams has been considered as mainly relying on allochthonous supplies of detrital organic matter for their functioning, in contrast with downstream ecosystems of larger size where primary production is considered to be predominant. Despite that detritus represent, by definition, a resource of lower quality for its consumers than living plants, the nature of the factors limiting the biological production and functional processes in these detrital ecosystems remains sparsely explored. First, the lack of essential elements (in particular nitrogen and phosphorus) in detritus could be a major constraint for the development of living organisms in streams. As a result, the availability of mineral elements in the water column, by stimulating the growth and activity of decomposers, but also by increasing the elemental quality of resources through microbial immobilization, could control ecological processes in a higher extent than previously believed in these ecosystems. By studying *in situ*, the response of microorganisms to nutrients availability along a land-use gradient, our results have shown a positive effect of the dissolved elements (N and P) on the decomposition of leaf litters and the enzymatic activities of the decomposers, even for the highest nutrient levels of the gradient, for which adverse effects were expected. Independently, in streams formerly subjected to acidification, we observed a recovery of the process of leaf litter decomposition. Nevertheless, this recovery was accompanied by a marked N reduction in the ecosystem, huge changes in stream functioning might be expected in the medium to long term. The role of autochthonous primary production was then questioned. Indeed, while being quantitatively minor, this contribution of high quality carbon may play a significant role in the functioning of headwater streams. In particular, the importance and role of polyunsaturated fatty acid (PUFA) intakes via phototrophic biofilms was questioned. Based on a field survey of 15 rivers in the Vosges Mountains along an acidification gradient, our results first showed the presence of diatomic biofilms rich in PUFA, despite these streams are clearly in a forested context. In a second step, an experimentation carried out under controlled conditions permitted to observe the positive role of diatomic resources, even in low concentrations, on the growth and survival of the crustacean amphipod *Gammarus fossarum*. Without this input, these organisms were unable to maintain their internal levels of PUFAs, suggesting that the consumption of autochthonous primary producers might be essential for these detritivore organisms. All our results permit to highlight the fundamental roles that can be played by the availability of dissolved elements (N and P) and the carbon quality of the resources on the biological production and on leaf litter decomposition in headwater streams. These results stress the need for more profound investigation of the interactions between these two limiting factors, and for understanding in which contexts one factor could supplement the other. In particular, it will be interesting to investigate to what extent various anthropogenic disturbances (xenobiotics, global warming, etc...) could affect the intensity or the nature of these limitations.

**Keywords:** Functional ecology, ecological stoichiometry, polyunsaturated fatty acids, primary producers, shredders macroinvertebrates, leaf litter breakdown.