

---

# Thermie et processus microbiens dans le Rhône

---

**Programme Microtherm 2011-2013**

**Rapport final**

**(version 4 – juin 2013)**

S. Pesce<sup>1</sup>, A.S. Lambert<sup>1,2</sup>, A. Foulquier<sup>1,2</sup>, B. Volat<sup>1</sup>, M. Neyra<sup>1</sup>, B. Montuelle<sup>2</sup>

1. Irstea, UR MALY, Lyon, France

2. INRA, UMR CARTELL, Thonon-les-bains, France

# Sommaire

<b>Sommaire .....</b>	<b>1</b>
<b>Résumé.....</b>	<b>2</b>
<b>Liste des abbréviations .....</b>	<b>4</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>5</b>
1.1. Contexte et objectifs	
1.2. Effets de hausses thermiques sur les communautés microbiennes aquatiques	
1.3. Communautés microbiennes du fleuve Rhône	
1.4. Stratégie scientifique	
<b>2. Matériel et méthodes.....</b>	<b>10</b>
2.1. Prélèvement initial des communautés naturelles du Rhône	
2.2. Schéma expérimental	
2.3. Prélèvement des communautés dans les microcosmes	
2.4. Analyses physico-chimiques	
2.5. Analyses microbiennes	
2.5.1. <i>Biomasse</i>	
2.5.2. <i>Caractérisation des communautés phototrophes des biofilms périphytiques</i>	
2.5.3. <i>Densité bactérienne</i>	
2.5.4. <i>Structure génétique de la communauté bactérienne</i>	
2.5.5. <i>Activités bactériennes</i>	
2.5.6. <i>Potentiel génétique de dénitrification</i>	
2.6. Traitement des données et analyses statistiques	
<b>3. Résultats.....</b>	<b>17</b>
3.1. Caractérisation et comparaison des communautés benthiques du Haut-Rhône et du Bas-Rhône	
3.1.1. <i>Variations spatio-temporelles des conditions physico-chimiques</i>	
3.1.2. <i>Caractérisation structurale et fonctionnelle des communautés périphytiques prélevées dans le Rhône</i>	
3.1.3. <i>Caractérisation structurale et fonctionnelle des communautés sédimentaires prélevées dans le Rhône</i>	
3.2. Etudes des effets potentiels d'un rejet thermique sur les communautés benthiques	
3.2.1. <i>Influence de la température sur les conditions physico-chimiques dans les microcosmes</i>	
3.2.2. <i>Effets de la température sur les communautés phototrophes périphytiques</i>	
3.2.3. <i>Effets de la température sur les communautés hétérotrophes périphytiques</i>	
3.2.4. <i>Effets de la température sur les communautés hétérotrophes sédimentaires</i>	
<b>4. Discussion .....</b>	<b>35</b>
<b>5. Conclusion synthétique.....</b>	<b>40</b>
<b>6. Références.....</b>	<b>40</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>42</b>

## Résumé

L'objectif de cette étude était d'évaluer les effets potentiels d'une augmentation de la température des eaux sur les processus et la dynamique des communautés microbiennes benthiques (biofilms et sédiments) échantillonnées dans le fleuve Rhône dans un contexte estival, en évaluant cet effet sur la structure des communautés phototrophes et hétérotrophes et en appréhendant les conséquences fonctionnelles sur la production primaire et le recyclage de l'azote. Ce travail reposait sur :

- i) une synthèse bibliographique concernant les effets connus de la thermie sur les communautés microbiennes aquatiques, notamment dans le fleuve Rhône (voir rapport Pesce et al., 2013),
- ii) une approche en microcosmes de laboratoire permettant de simuler différents niveaux d'une hausse thermique engendrée par des rejets de CNPE en période estivales, afin d'en évaluer leurs effets potentiels sur les communautés microbiennes du Rhône.

Compte tenu des caractéristiques spécifiques du Rhône, fleuve à fond majoritairement sédimentaire, deux types de communautés benthiques ont été étudiées: les communautés périphytiques (biofilms), qui sont généralement dominées par des microorganismes phototrophes (microalgues et cyanobactéries), et les communautés sédimentaires, qui présentent principalement des propriétés hétérotrophes du fait de la dominance des communautés bactériennes. Les approches expérimentales en microcosmes ont été réalisées avec des communautés microbiennes respectivement collectées en amont du CNPE du Bugey et en amont du CNPE de Tricastin afin de prendre en compte les différences entre la zone du Haut-Rhône et celle du Bas-Rhône. De plus, deux séries d'expériences ont été programmées en considérant des communautés prélevées au début (juillet) puis à la fin (septembre) de l'été afin de considérer également la variabilité temporelle.

Les effets de la température ont été évalués à moyen terme, en caractérisant en laboratoire et pendant trois semaines l'évolution des conditions physico-chimiques de l'eau ainsi que la dynamique et la réponse fonctionnelles des communautés microbiennes phototrophes et hétérotrophes soumises à de fortes hausses thermiques (allant jusqu'à +16°C) par rapport à la température du milieu lors de leur prélèvement initial (températures comprises alors entre 18,9°C et 23,4°C).

La caractérisation initiale des conditions physico-chimiques de l'eau et des communautés microbiennes périphytiques et sédimentaires lors des prélèvements effectués en juillet et septembre sur les deux sites d'études a permis de révéler des différences notables entre les échantillons, confirmant ainsi l'intérêt d'avoir réalisé deux séries d'expérimentations en microcosmes, en considérant pour chacune d'elle des communautés provenant de deux sites distincts. En effet, dans le contexte de cette étude, cela a ainsi permis de tester l'influence de la thermie dans des situations contrastées, offrant ainsi une vision plus large des effets potentiels d'une hausse thermique sur des communautés naturelles complexes.

Ainsi, si l'analyse multiparamétrique des effets associés aux différents niveaux de hausse thermique a mis en évidence une influence forte de la température sur les communautés périphytiques et sédimentaires, tant d'un point de vue structural que fonctionnel, les résultats observés paramètre par paramètre ont montré que la réponse des communautés microbiennes est variable suivant l'origine des échantillons et la date de l'expérience.

Cette étude montre que le changement le plus net des conditions physico-chimiques et microbiennes est induit entre 32°C et 35°C, pouvant traduire un effet de seuil. Au niveau des paramètres microbiens, cette différence plus marquée à 35°C est principalement observée sur la diversité génétique bactérienne (périphyton et sédiments), l'activité photosynthétique (périphyton), le potentiel de dénitrification (périphyton et sédiments) et l'abondance et la proportion de gène *nirK* dans les communautés bactériennes périphytiques, ces différents paramètres fonctionnels étant significativement inhibés à ce niveau thermique.

Cependant, l'augmentation graduelle de 20°C à 32°C engendre également une évolution progressive des communautés microbiennes périphytiques et sédimentaires. Au sein des biofilms périphytiques, la hausse thermique engendre ainsi un effet significatif sur la structure des communautés, favorisant ainsi le développement des cyanobactéries et des chlorophycées, au détriment des diatomées, sans toutefois affecter fortement la biomasse chlorophyllienne. D'un point de vue fonctionnel, la hausse thermique entraîne une inhibition du potentiel photosynthétique mais celle-ci n'est détectable qu'à 35°C. L'activité potentielle de dénitrification par les biofilms est également affectée à la baisse par la hausse thermique mais ces effets restent limités du fait du niveau très faible de cette activité dans le compartiment périphytique. Au sein du compartiment sédimentaire, les températures supérieures à 30°C engendrent une diminution significative du nombre de copies du gène ADNr 16S qui traduit une diminution de l'abondance bactérienne. Une diminution de l'activité dénitrifiante est également observée à 35°C, celle-ci s'expliquant notamment par une diminution significative de l'abondance de gènes *nirK* dans la communauté sédimentaire pour des températures supérieures ou égales à 30°C. La confrontation des résultats obtenus en terme d'abondance de gènes *nirK*, du potentiel de dénitrification des sédiments et que des concentrations en nitrates dans l'eau montrent que l'effet de la température a été perceptible pour la fonction de dénitrification au niveau du potentiel génétique, du potentiel fonctionnel et de l'activité réelle dans les microcosmes.

En conclusion, les résultats obtenus ont donc montré une incidence significative de la thermie, à la fois sur la physico-chimie mais aussi sur les communautés phototrophes (algues et cyanobactéries) et bactériennes, tant au niveau de leur structure que de leur potentiel fonctionnel (diminution des capacités de photosynthèse, de respiration et de dénitrification, augmentation des capacités de méthanisation). Cependant, les variations ont été très variables suivant l'origine et la période de prélèvement des communautés microbiennes. De plus, la plupart des effets significatifs n'ont été observés qu'à partir de températures supérieures ou égales à 30°C (i.e. 30°C, 32°C et 35°C), traduisant un possible effet de seuils thermiques à partir desquels des modifications structurales et fonctionnelles du compartiment microbien benthique peuvent être détectés.

## Liste des abréviations

ADNr : acide désoxyribonucléique ribosomique

ARISA : Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis

ARN : acide ribonucléique

chl *a* : chlorophylle *a*

CNPE : Centre Nucléaire de Production d'Electricité

COD : carbone organique dissous

MS : matière sèche

MSSC : matière sèche sans cendre

OTU : operational taxonomic unit (unité taxonomique opérationnelle)

PAM : Pulse Amplitude Modulation

(q)PCR : Quantitative (real-time) Polymerase Chain Reaction

# 1. Introduction

## 1.1. Contexte et objectifs

Les rejets des eaux de refroidissement des CNPE sont susceptibles de générer un réchauffement localisé des eaux des milieux récepteurs. Si les conséquences de ce rejet thermique ont fait et font l'objet de nombreuses études sur différentes populations (poissons, invertébrés, ..) et en particulier dans le cadre de l'étude thermique Rhône initiée en 1999, les communautés microbiennes sont par contre moins étudiées dans ce contexte de réchauffement des eaux. A la suite d'une étude réalisée sur la Garonne (programme GolFilm), menée dans le cadre d'un partenariat entre EDF et le laboratoire EcoLab UMR 5245 (CNRS-UPS-INPT), le comité de pilotage de l'Etude Rhône Phase 4 (Etude Thermique) a souhaité acquérir des connaissances concernant l'effet de la thermie sur le compartiment microbien du Rhône, dont la dynamique est très différente de la Garonne. L'objectif principal visé consistait notamment à évaluer l'effet de rejets thermiques comparables à ceux observés en période estivales dans les veines de rejets des CNPE du Rhône sur les communautés microbiennes périphytiques (biofilms) et sédimentaires de ce fleuve.

Ces communautés, à dominante phototrophe dans les biofilms périphytiques et à dominante hétérotrophe dans le sédiment, se trouvent à la base de nombreux processus écologiques et ils contribuent au bon fonctionnement des écosystèmes aquatiques du fait de leur rôle prépondérant dans les cycles biogéochimiques. Ils contribuent en effet à la production primaire, au recyclage des nutriments et à la reminéralisation de la matière organique. De plus, du fait de leurs temps de génération courts, ces communautés microbiennes sont capables de répondre plus rapidement que les communautés de macroorganismes (macrophytes aquatiques, faune invertébrée) à des changements environnementaux et elles possèdent, de ce fait, un fort potentiel de bioindication (indicateurs d'état ou d'effet).

Dans ce contexte, l'objectif du présent projet est donc d'évaluer les effets potentiels d'une augmentation de la température des eaux dans un contexte estival sur les processus et la dynamique des communautés microbiennes benthiques (biofilms et sédiments) échantillonnées dans le fleuve Rhône, en évaluant cet effet sur la structure des communautés phototrophes et hétérotrophes et en appréhendant les conséquences fonctionnelles sur la production primaire et le recyclage de l'azote. Ce travail repose sur :

- i) une synthèse bibliographique concernant les effets connus de la thermie sur les communautés microbiennes aquatiques, notamment dans le fleuve Rhône,
- ii) une approche en microcosmes de laboratoire permettant de simuler différents niveaux d'une hausse thermique engendrée par des rejets de CNPE en période estivales, afin d'en évaluer leurs effets potentiels sur les communautés microbiennes du Rhône.

## **1.2. Effets de hausses thermiques sur les communautés microbiennes aquatiques**

L'état actuel des connaissances quant aux effets de hausses thermiques sur les communautés microbiennes aquatiques a été détaillé dans un rapport bibliographique faisant partie des livrables du programme Microtherm (Pesce et al., 2013).

De manière synthétique, la plupart des résultats rassemblés dans ce rapport mettent en évidence l'influence directe de la température sur la structure, la diversité et les fonctions des communautés microbiennes aquatiques phototrophes et hétérotrophes. Au niveau fonctionnel, la température exerce à la fois un contrôle distal, qui influence à moyen et long terme la structure de la communauté (et donc conditionne la taille relative des populations impliquées dans les différentes activités microbiennes), et un contrôle proximal qui affecte à court terme l'intensité de l'activité métabolique (Boulêtreau et al., 2010). Quand les températures ne dépassent pas l'optimum thermique des organismes, le contrôle proximal engendre généralement une stimulation des différentes activités microbiennes lorsque les températures s'élèvent. Cependant, les résultats issus du programme GolFilm (2008-2010), qui visait à évaluer les effets d'augmentations de température *in situ* de l'ordre de 2,5°C en moyenne journalière, au droit des rejets thermiques de la centrale de Golfech, sur les communautés microbiennes de biofilms de la Garonne, ont montré que le contrôle distal de la température serait supérieur au contrôle proximal. Cela confirme la complexité de réponse des assemblages microbiens et la nécessité d'étudier leur dynamique dans ce genre d'étude (Boulêtreau et al., 2010).

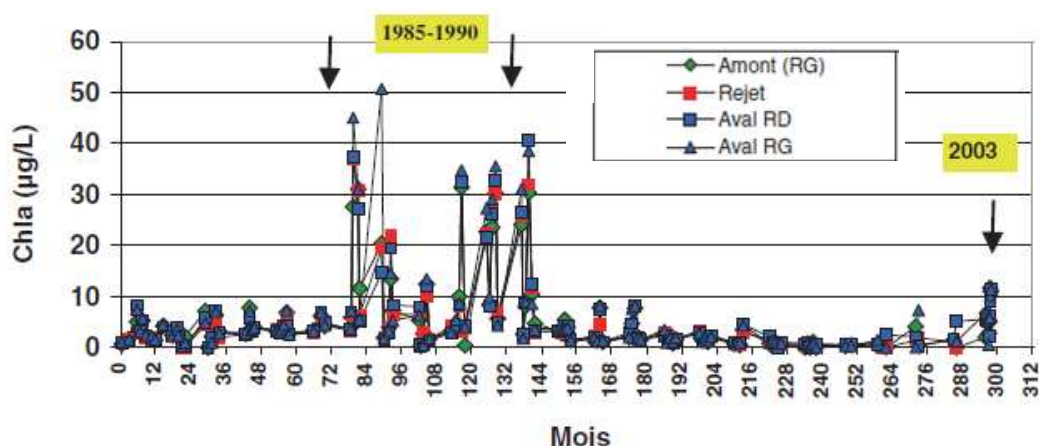
La réponse aux variations thermiques (à court, moyen ou long terme) est variable suivant les processus microbiens considérés, et ceci peut, à terme, engendrer des déséquilibres de cycles biogéochimiques en milieu aquatique (Yvon-Durocher et al., 2010 ; Demars et al., 2011). Si la plupart des activités microbiennes sont directement conditionnées par la température, certaines d'entre elles sont également interdépendantes, ce qui entraîne des conséquences indirectes des modifications thermiques par effet cascade (Veraart et al., 2011). Pour réellement appréhender l'effet d'une hausse thermique sur les processus microbiens, il s'avère donc important d'étudier différents types d'activités et de considérer à la fois les communautés phototrophes et hétérotrophes.

Au regard des études disponibles, il apparaît clairement que les effets de la thermie sont en interactions fortes avec les conditions environnementales chimiques (nutriments, toxiques) et physiques (ex. lumière). Par exemple, plusieurs auteurs ont mis en évidence un effet synergique positif entre température et nutriments sur les processus microbiens, quand ces deux facteurs ne sont pas en conditions limitantes (ex. Berggren et al., 2010 ; Villanueva et al., 2011). La réponse microbienne à une hausse des températures peut donc varier en fonction des conditions physico-chimiques du milieu et il est donc primordial de prendre en compte ces aspects dans les études visant à caractériser les effets *in situ* de la thermie sur ces communautés.

### 1.3. Communautés microbiennes du fleuve Rhône

Le Rhône est un fleuve totalement aménagé pour la production hydro-électrique et la navigation. Au cours des trois dernières décennies, le régime thermique du Rhône a été affecté par le changement climatique. Il s'est traduit par un échauffement moyen d'environ 1,5 °C sur le Haut-Rhône et de 3,0 °C sur le Bas-Rhône. Dans cette dérive générale des températures, sur les quinze dernières années les échauffements résiduels moyens cumulés liés aux rejets thermiques des centres nucléaires de production d'électricité (CNPE) sont estimés de l'ordre de 0,6°C à 1,4°C suivant les zones concernées (Khalanski et al., 2008). Si les suivis chroniques réalisés depuis plus de 25 ans semblent indiquer que les modifications constatées sur les peuplements de macro-invertébrés et de poissons s'expliquent en premier lieu par les effets du changement climatique, sans influence notable des rejets thermiques des CNPE (Khalanski et al., 2008), les connaissances concernant les communautés microbiennes de ce fleuve sont beaucoup plus limitées. Elles sont issues, pour la plupart, de suivis réalisés en zone estuarienne (delta du Rhône) et côtière (Méditerranée), afin de suivre dans ces secteurs l'influence du panache fluvial sur les communautés microbiennes planctoniques (Bianchi et al., 1994; Omnes et al., 1996 ; Naudin et al., 2001; Troussellier et al., 2002; Pujon-Pay et al., 2006; Christaki et al., 2009; Joux et al., 2009).

La chronique des concentrations en chlorophylle *a* (chl *a*) planctonique, mesurées pendant 25 ans (1979-2003) dans le haut-Rhône (secteur du Bugey), fait apparaître trois périodes distinctes dans l'évolution de la biomasse phytoplanctonique (Khalanski et al., 2008 ; Fig. 1). Ces trois périodes sont respectivement caractérisées par i) de faibles concentrations en chl *a* (entre 1979 et 1984), ii) des concentrations plus élevées (entre 1985 et 1990) puis iii) un retour aux faibles concentrations initiales (à partir de 1991). D'après les auteurs, ces variations temporelles sont principalement liées à l'évolution des teneurs en nutriments et au développement d'organismes phytoplanctonophages (le bivalve *Corbicula fluminea*) sans influence notable de la hausse générale des températures ou des rejets thermiques du CNPE du Bugey (Khalanski et al., 2008).



**Fig. 1** Chronique de la biomasse du phytoplancton (chlorophylle *a*, en µg/L) dans le Rhône sur le site de Bugey; d'après Khalanski et al. (2008)



De même, un suivi de huit années (1987-1994) réalisé dans le moyen-Rhône, dans le secteur de Péage-de-Roussillon, a également permis de mettre en évidence une évolution temporelle forte de la biomasse phytoplanctonique et de la structure taxonomique des communautés algales planctoniques et benthiques sur toute la période d'étude (Fruget et al., 2001). Contrairement aux conclusions de Khalanski et al. (2008), cette évolution semble être majoritairement conditionnée dans ce secteur par les conditions hydrologiques (débit) et thermiques, puis, dans une moindre mesure, par les conditions nutritives qui influencent principalement les communautés périphytiques. Cependant, et malgré la grande quantité de données récoltées au cours de ce suivi, les auteurs ont souligné la difficulté de discerner les effets associés aux rejets thermiques du CNPE de Saint-Alban à ceux liés à l'ensemble des variations environnementales observées sur le site d'étude, soulignant ainsi la nécessité de mettre en œuvre des suivis à long-terme, s'appuyant sur une solide stratégie d'échantillonnage, tant d'un point de vue temporel que spatial (Fruget et al., 2001).

A notre connaissance, les autres données disponibles dans la littérature sont issues de prélèvements réalisés ponctuellement sur différents sites du Rhône. Fauvet et al. (2001) ont ainsi étudié le développement de communautés périphytiques algales dans le moyen-Rhône en plaçant pendant 7 jours des substrats artificiels en verre sur le lit du fleuve dans le secteur de Pierre-Bénite. Leurs résultats ont mis en évidence des concentrations en chl *a* assez faibles, comprises en moyenne entre 2 et 6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  suivant le site de prélèvement, avec une augmentation de la biomasse algale dans les sections caractérisées par des teneurs plus riches en nitrates. De même, les travaux de Claret et Fontvieille (1997) ont montré que la croissance algale à la surface de sédiments situés dans le haut-Rhône (secteur de Chautagne) était fortement conditionnée par les concentrations en nutriments, mais aussi par les conditions hydrodynamiques. La biomasse globale des biofilms présentait également de fortes variations temporelles, liées notamment aux variations des teneurs en carbone organique dissous dans le milieu. Ces variations saisonnières sont particulièrement visibles pour le compartiment hétérotrophe pour lequel l'abondance cellulaire et le niveau d'activité sont principalement influencés par les conditions thermiques (Claret et Fontvieille, 1997, Claret et al., 1998). Ainsi, en saison chaude (température moyenne proche de 18°C), l'activité bactérienne au sein de biofilms sédimentaires de ce secteur peut augmenter la consommation d'oxygène et le taux de décomposition de la matière organique, entraînant alors le relargage de fortes quantités de nitrates dans le milieu (Claret et al., 1998). Cependant, une élévation trop importante de la température peut conduire à une surconsommation d'oxygène et stimuler alors des processus de dénitrification qui engendrent une diminution des teneurs en nitrates (Claret et al., 1998). Netto (2007) a également caractérisé des communautés bactériennes de sédiments prélevés en avril 2004 dans la Drôme, sur un site situé en amont de la confluence du Doux sur le Rhône. Elle a ainsi mis en évidence une concentration bactérienne de l'ordre de  $7,4 \cdot 10^9$  cellules par gramme de sédiment sec associée à des activités de dénitrification et de déshydrogénase respectivement proches de 113  $\mu\text{g N-N}_2\text{O}/\text{h/g}$  et de 3418  $\mu\text{g}$  formazan formé/24h/g de sédiment sec. Cependant ce travail ne donne pas d'indication quant aux variations saisonnières et à l'influence de la température sur ces paramètres microbiens.

Au regard de cette synthèse des travaux existants, il apparaît donc clairement que :

- les connaissances sur la structure et le fonctionnement des communautés microbiennes benthiques du Rhône (sédiments et biofilms périphytiques) sont très limitées,
- les effets de la thermie sur les microorganismes de cet écosystème ont été peu abordés et les travaux réalisés jusqu'alors n'ont pas permis d'appréhender clairement l'effet des variations de températures sur ce compartiment biologique,
- quand elles existent, les conclusions concernant l'influence de la température sur la dynamique des communautés microbiennes phototrophes du Rhône sont fragiles et parfois contradictoires, illustrant ainsi les limites des approches *in situ* réalisées sans une stratégie d'échantillonnage robuste (prenant en compte l'hétérogénéité spatiale et temporelle) dans des écosystèmes aussi complexes.

#### **1.4. Stratégie scientifique**

Compte tenu de l'état de l'art et de la méconnaissance des caractéristiques des communautés microbiennes benthiques dans le fleuve Rhône, il a été choisi de privilégier dans le programme Microtherm une approche en microcosmes, afin d'évaluer les effets potentiels de rejets thermiques sur ces communautés, en simulant différents niveaux de hausses thermiques, comparables à celles engendrées en période estivale par les rejets des CNPE. Ce type d'approche, réalisée en conditions contrôlées, permet de décrire finement les effets de la température, en s'affranchissant notamment des incertitudes découlant des différents facteurs environnementaux qui varient sur le terrain (débit, éclairage, contexte chimique...) et influencent notablement les dynamiques microbiennes (Villeneuve et al., 2010). Pour ce type d'étude, qui vise à évaluer l'effet d'un stress (ici un stress thermique) sur la structure et le fonctionnement des communautés naturelles, il est nécessaire d'utiliser des communautés non exposées au préalable au stress étudié, afin de réellement appréhender son effet potentiel. En conséquence, il a été choisi de réaliser ces travaux avec des communautés prélevées en amont de CNPE et d'étudier leur réponse à de fortes hausses thermiques, comparables à celles observées dans les veines chaudes en aval immédiat de centrales.

Ces approches expérimentales ont été réalisées avec des communautés microbiennes respectivement collectées en amont du CNPE du Bugey et en amont du CNPE de Tricastin afin de prendre en compte les différences entre la zone du Haut-Rhône et celle du Bas-Rhône (de façon très simplifiée du fait du caractère exploratoire de ce programme). De plus, deux séries d'expériences ont été programmées en considérant des communautés prélevées au début (début juillet) puis à la fin (début septembre) de l'été afin de considérer également la variabilité temporelle.

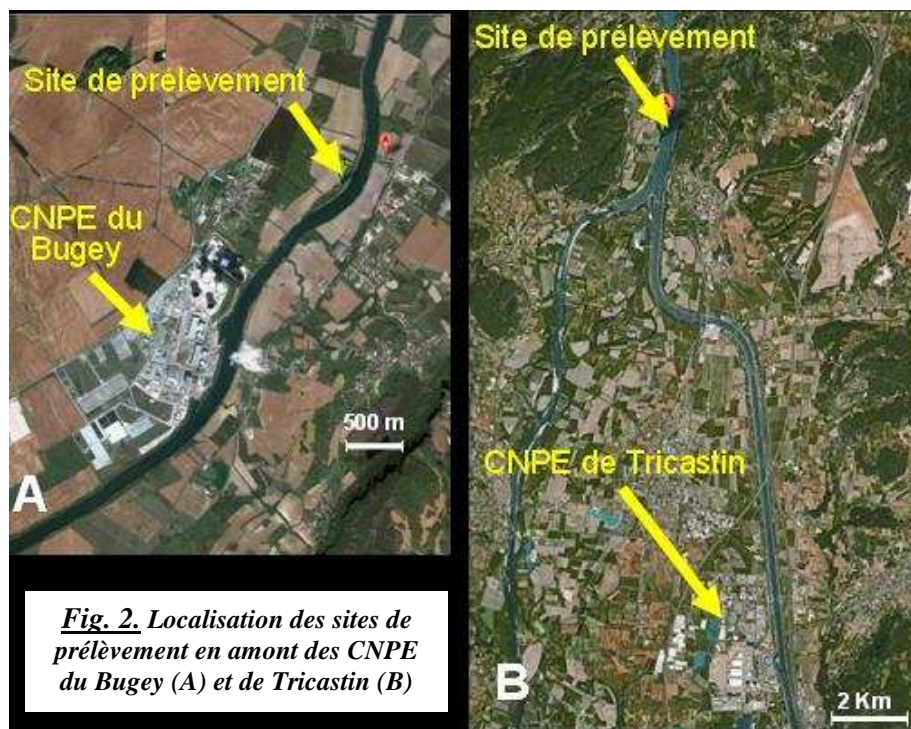
Au regard des résultats issus du programme Golfilm, qui ont montré que la température exerce un contrôle distal important sur les communautés microbiennes, nous avons choisi de suivre les effets de la température à moyen terme, en caractérisant la dynamique et la réponse fonctionnelles des communautés phototrophes et hétérotrophes soumises à de fortes hausses thermiques (+5 à +15°C)

pendant trois semaines. Compte tenu des caractéristiques spécifiques du Rhône, fleuve à fond majoritairement sédimentaire, deux types de communautés benthiques sont étudiées dans le programme Microtherm : les communautés périphytiques (biofilms), considérées seules dans le programme Golfilm et qui sont généralement dominées par des microorganismes phototrophes (microalgues et cyanobactéries), et les communautés sédimentaires, qui présentent principalement des propriétés hétérotrophes du fait de la dominance des communautés bactériennes.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Prélèvement initial des communautés naturelles du Rhône

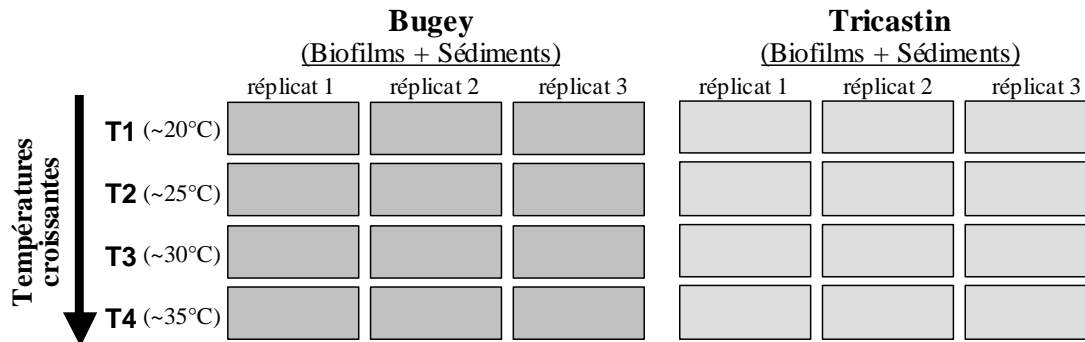
Les expériences en microcosmes sont réalisées à partir de communautés benthiques naturelles initialement prélevées sur des cailloux et dans des sédiments localisés sur la rive droite en amont des CNPE du Bugey (N45°48.685' E5°17.238') et de Tricastin (N44°27.295' E4°41.803') (Fig. 2). Sur chaque site de prélèvement, 350 L d'eau (pour remplir les microcosmes), environ 50 cailloux et 40 L de sédiments de surface (0-3 cm, tamisage à 2 mm) ont été collectés pour permettre la caractérisation initiale des communautés et la mise en place du dispositif expérimental.



### 2.2. Schéma expérimental

Deux expériences, d'une durée de trois semaines chacune (durée de croissance identique à celle considérée dans le programme Golfilm), ont été respectivement programmées au début (11 juillet-3 août 2012) et à la fin (12 septembre-3 octobre 2012) de la période estivale. Pour ces deux expériences, 24 aquariums (20L) sont répartis dans 4 bacs (250L) remplis d'eau et régulés thermiquement afin de contrôler les températures d'incubation.

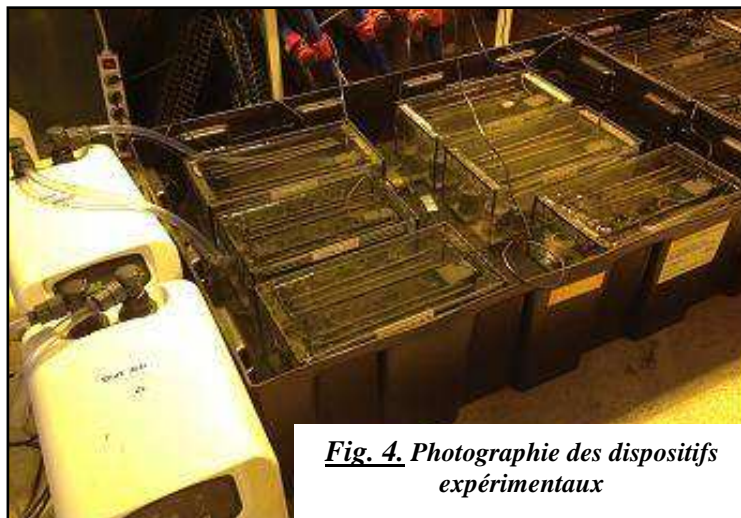
Pour chaque température, 6 aquariums indépendants sont mis en place : 3 aquariums contenant chacun des biofilms et des sédiments de Bugey et 3 aquariums contenant chacun des biofilms et des sédiments de Tricastin (Fig. 3). Ce type de schéma expérimental, basé sur l'utilisation de triplicats, permet de réaliser une comparaison statistique entre les différents contextes thermiques, afin d'évaluer les réponses structurelles et fonctionnelles des communautés périphytiques et sédimentaires à la hausse thermique et les conséquences globales sur l'évolution de la qualité physico-chimique de l'eau (sans distinction entre l'influence des biofilms et celle des sédiments, du fait de la présence simultanée de ces deux compartiments dans les microcosmes).



***Fig. 3. Schéma expérimental des approches en microcosmes de laboratoire***

Les aquariums (Fig. 4) sont constitués de :

- 20L d'eau prélevés aux stations décrites précédemment et renouvelés intégralement chaque semaine par de l'eau fraîchement prélevée en amont de chacun des sites (Bugey ou Tricastin),
- 12 colonnes cylindriques en PVC (hauteur 10 cm ; diamètre 4,5 cm) remplies de sédiments de surface collectés dans le Rhône et placées sur le fond,
- 60 lames de verre (longueur 10 cm ; largeur 2 cm) suspendues près de la surface pour servir de supports pour la colonisation et la croissance des biofilms.



***Fig. 4. Photographie des dispositifs expérimentaux***

Pour faciliter et accélérer le développement des biofilms, des communautés périphtiques ont été initialement prélevées sur des galets collectés dans le Rhône, remises en suspension et ajoutées dans les microcosmes afin de servir d'inoculum. Dans le but de pouvoir comparer les résultats entre Bugey et Tricastin, des dilutions ont été réalisées à partir des suspensions de biofilms afin d'ajouter une biomasse algale similaire (sur la base de la concentration en chlorophylle qui représente dans les échantillons prélevés 8% à 20% de la matière sèche sans cendre, voir ch. 3.1.2) dans les deux types de milieux. La biomasse algale ajoutée dans chaque aquarium (concentration finale = 75 µg de chlorophylle par litre) a donc été identique, quelle qu'ait été l'origine du biofilm (Bugey et Tricastin) et la date du prélèvement initial (juillet et septembre).

### **2.3. Prélèvement des communautés dans les microcosmes**

Les communautés benthiques sont prélevées dans les microcosmes et analysées hebdomadairement pendant 3 semaines (T1 à T3). A chaque temps de prélèvement, 15 lames de verre et 3 supports en PVC sont collectés de manière aléatoire dans chaque microcosme. Les biofilms sont décollés des lames, remis en suspension dans l'eau du site d'origine et homogénéisés avant analyses. De même, les sédiments sont prélevés à la surface des trois cylindres de PVC (0-3 cm) avant d'être homogénéisés pour les analyses ultérieures. Le choix de suivre les effets de la thermie sur les différentes phases de formation des biofilms (colonisation, croissance et maturation) est principalement justifié par la volonté de pouvoir comparer nos résultats à ceux obtenus dans la cadre de l'étude du contrôle distal de la température du programme Golfech (Boulêtreau et al., 2010). D'autre part, il a été montré que l'effet thermique est plus marqué durant les premières phases de croissance du biofilm (ex. Villanueva et al., 2011).

### **2.4. Analyses physico-chimiques**

L'évolution hebdomadaire des conditions physico-chimiques de l'eau sur les deux sites de prélèvements et dans les microcosmes (avant renouvellement d'eau) est suivie à partir des mesures des paramètres suivants: température, pH, oxygène, conductivité, nutriments principaux (phosphates, nitrates, nitrites, ammonium, silice), carbone organique dissous (COD). Toutes les mesures sur sites ont été réalisées en milieu de matinée (11h ± 1h).

L'analyse des composés azotés permet notamment de suivre en parallèle l'évolution du potentiel microbien de dénitrification et celle des concentrations des éléments chimiques concernés dans les aquariums. Cette confrontation entre données chimiques et mesures d'activités n'est cependant pas réalisable concernant la méthanisation, du fait du type de produit formé (un gaz, le méthane) et de la diversité des sources de carbone qui peuvent être utilisées pour ce processus.

Il est également à noter que l'évolution des concentrations des différentes substances minérales dépend d'une balance entre consommation et production (suivant les différents cycles biochimiques) et l'estimation de la part de chacun de ces processus n'est pas envisageable dans les travaux proposés ici.

Dans les microcosmes, la température de l'eau et l'intensité de l'éclairage (basé sur un cycle jour/nuit « naturel », de type 14h de lumière/8h d'obscurité) sont enregistrées en continu (toutes les deux heures) à l'aide de capteurs immergés. L'intensité lumineuse à la surface des microcosmes est de l'ordre de 2500 lux sans différence notable entre les différents contextes et les deux expériences.

Les conditions thermiques mesurées sont décrites dans le Tableau 1. Pour les trois températures les plus faibles (20°C, 25°C et 30°C), les relevés mettent en évidence des valeurs relativement stables (écarts-types inférieurs à 0,5°C) et des moyennes proches de l'attendu durant l'ensemble du suivi (écart maximum <2% de la valeur théorique). En revanche, les systèmes de régulation thermique utilisés n'ont pas permis de maintenir la température à 35°C lors de l'expérience réalisée en juillet, les enregistrements révélant alors une valeur moyenne inférieure de plus de 3°C à l'attendu (31,68°C ± 0,63). Cependant, ce problème a été résolu lors de l'expérience réalisée en septembre, grâce à la mise en œuvre d'une double régulation thermique et à l'utilisation d'un isolant en surface du bac d'incubation, dont les effets combinés ont permis de maintenir une température moyenne proche de 35°C sur l'ensemble de l'expérience (35,49°C ± 0,67).

Températures théoriques	Températures mesurées	
	Juillet	Septembre
20°C	20,25 ± 0,21	19,59 ± 0,30
25°C	25,03 ± 0,50	24,82 ± 0,26
30°C	29,82 ± 0,26	30,21 ± 0,37
35°C	31,68 ± 0,63	35,49 ± 0,67

**Tableau 1.** Conditions thermiques mesurées dans les microcosmes (moyennes et écarts-types des valeurs enregistrées toutes les deux heures durant toute la durée des expériences)

## 2.5. Analyses microbiennes

L'évolution structurale et fonctionnelle des communautés microbiennes est suivie de manière hebdomadaire à partir des descripteurs suivants (en fonction du type de compartiment considéré):

- Biomasse : matière sèche (MS), matière sèche sans cendre (MSSC) et chlorophylle a (chl\_a),
- Potentiel photosynthétique et répartition des classes algales : mesures de fluorescence (Fluorimétrie : Phytopam),
- Densité Bactérienne : dénombrements par cytométrie en flux et quantification du nombre de copies du gène ADNr 16S par PCR quantitative en temps réel (qPCR),
- Structure génétique de la communauté bactérienne (analyse par PCR-ARISA<sup>1</sup>),
- Activités bactériennes : respiration, dénitrification et méthanisation (par chromatographie en phase gazeuse). Il est à noter que les mesures d'activités effectuées ne sont que des mesures d'activités "potentielles", effectuées dans des conditions standardisées et favorables et qu'elles ne permettent pas d'estimer l'activité "réelle" des communautés dans le milieu (ou dans le cas présent, dans les microcosmes),

<sup>1</sup> Polymerase Chain Reaction - Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis

- Potentiel génétique de dénitrification : par quantification de l'abondance du gène *nirK* par PCR quantitative en temps réel (qPCR).

### **2.5.1. Biomasse**

La biomasse totale et la biomasse organique n'ont été quantifiées que sur les biofilms, et non sur les sédiments (techniques non disponibles au laboratoire au moment des essais). Elles sont respectivement estimées par mesure de la matière sèche (MS) et de la matière sèche sans cendre (MSSC), rapportés à la surface des lames grattées. Le poids sec est déterminé après séchage des échantillons à 70-90° C (étuve) pendant 24 h. Ensuite, la totalité de la matière organique est brûlée à 500°C (four) durant 1 h afin d'obtenir la MSSC en soustrayant le poids des cendres au poids sec obtenu précédemment.

### **2.5.2. Caractérisation des communautés phototrophes des biofilms périphytiques**

La quantité de chl *a*, la répartition des principales classes algales (diatomées, algues vertes et cyanobactéries) et l'activité photosynthétique potentielle (rendement photosynthétique) des communautés phototrophes des biofilms sont estimées à l'aide un fluorimètre de type Phyto-PAM (Pulse Amplitude Modulation, Heinz Walz) présentant 4 longueurs d'ondes d'excitation (470 nm, 520 nm, 645 nm, 665 nm) (Schmitt-Jansen et Altenburger, 2008).

### **2.5.3. Densité bactérienne**

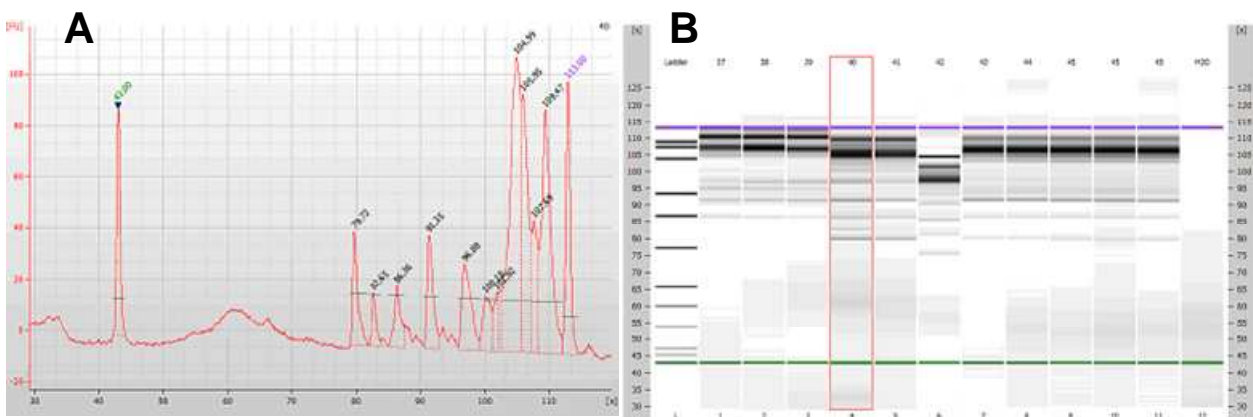
La densité bactérienne dans les biofilms et les sédiments est estimée à partir de dénombrements cellulaires par cytométrie en flux (FACScan flow cytometer, BD Biosciences). Immédiatement après les prélèvements, les échantillons de biofilms et de sédiments sont fixés au formol (4% final) et stockés à 4°C jusqu'à analyse. Après détachement des cellules par traitement chimique (pyrophosphate de sodium, concentration finale 10 mM) et physique (sonication, 3 cycles de 1 min) selon le protocole optimisé par Duhamel et Jacquet (2006), les bactéries sont marquées au SYBR Green et dénombrées par cytométrie en flux selon le protocole décrit par Sime-Ngando et al.(2008).

### **2.5.4. Structure génétique de la communauté bactérienne**

La structure génétique des communautés bactériennes des biofilms et des sédiments est analysée à l'aide d'une méthode d'empreinte moléculaire (fingerprint): la PCR-ARISA (Polymerase Chain Reaction - Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis).

L'extraction d'ADN est réalisée à partir d'échantillons congelés (2 ml de suspension de biofilms et 500 mg de sédiments frais) en utilisant le kit Fast DNA Spin (MPBiomedicals) par lyse mécanique et passages successifs de différents tampons dans une colonne d'élution, suivant les instructions du fabricant. La région intergénique localisée entre la petite (16S) et la grande (23S) sous unité du gène ADNr est ensuite amplifiée avec les amorces forward S-D-Bact-1522-b-S-20 (16S) et reverse L-D-Bact-132-a-A-18 (23S) d'après le protocole de Ranjard et al. (2001), légèrement modifié (Tlili et al., 2011).

Les analyses ARISA sont effectuées avec le système Bioanalyzer 2100 (Agilent) à partir du kit DNA 1000 permettant de séparer l'ADN à l'aide d'un système d'électrophorèse capillaire miniaturisée et automatisée. Les résultats peuvent être visualisés sous la forme d'électrophorégrammes (Fig. 5A) ou de gels reconstitués numériquement par le programme Agilent 2100 Expert (Fig. 5B). L'analyse est ensuite effectuée à partir des gels reconstitués et les profils de bandes ainsi obtenus sont analysés avec le logiciel GelCompar II (Applied Maths) afin d'obtenir une matrice basée sur l'intensité relative des différentes bandes présentes. Cette intensité relative (qui traduit l'aire relative de chaque pic sur l'électrophorégramme) est proportionnelle à l'abondance relative de l'unité taxonomique opérationnelle (OTU) qu'elle représente. L'abondance relative a donc été la variable prise en considération pour la comparaison des différents échantillons par analyses statistiques (cf. § 2.5.8.).



**Fig. 5.** Exemple d'un profil électrophorétique (A) et d'un gel reconstitué numériquement (B) après analyse ARISA, avec le système Bioanalyzer 2100 (Agilent).

### 2.5.5. Activités bactériennes

Les activités potentielles de respiration (production de CO<sub>2</sub>), de dénitrification (production de N<sub>2</sub>O) et de méthanisation (production de CH<sub>4</sub>) sont mesurées à partir de dosages par chromatographie en phase gazeuse (M200, MTI Analytical Instrument) après 3 et 6 heures d'incubation des échantillons périphytiques (10 mL de biofilms remis en suspension) ou sédimentaires (10 ml de sédiments) dans un milieu enrichi (en fonction de l'activité mesurée), en enceinte thermostatée (incubation à 25°C pour tous les échantillons) et à l'obscurité.

Pour les mesures de respiration, 10 ml d'une solution nutritive (7,5g/L glucose + 7,34 g/L acide glutamique) sont ajoutés aux échantillons avant bouchage des flacons et incubation. La solution nutritive utilisée pour les mesures de production de CH<sub>4</sub> est identique, mais chaque flacon est désoxygéné avant incubation par remplacement de l'atmosphère par de l'hélium (gaz inerte). Pour les mesures de dénitrification, la solution nutritive est supplémentée en nitrate de potassium (solution complète= 7,5g/L glucose + 7,34 g/L acide glutamique + 2,16 g/L KNO<sub>3</sub>), chaque flacon est désoxygéné par remplacement de l'atmosphère par de l'hélium puis 15ml d'hélium sont ensuite remplacés par 15ml d'acétylène (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>), inhibiteur de la N<sub>2</sub>O réductase. Ce protocole est sensiblement identique à celui utilisé dans le programme Golfilm (Boulêtreau et al., 2010), et réalisé en routine au laboratoire.



Chaque prélèvement est réalisé dans la phase gazeuse à l'aide d'une seringue étanche au gaz et la production gazeuse est ensuite rapportée à la surface (cm<sup>2</sup>) ou à la biomasse de biofilm introduite dans chaque flacon (g MSSC) et au poids sec pour le sédiment (g).

### **2.5.6. Potentiel génétique de dénitrification**

Le potentiel génétique de dénitrification des communautés bactériennes périphytiques et sédimentaires est appréhendé à partir de la quantification d'un gène codant pour l'enzyme nitrite reductase impliquée dans la dénitrification (NO<sub>2</sub><sup>-</sup> → NO) : le gène *nirK*. A partir des ADN extraits, une qPCR a été réalisée pour chaque échantillon. L'extraction d'ADN a été réalisée comme indiquée précédemment en utilisant le kit Fast DNA Spin (MPBiomedicals), suivant les instructions du fabricant.

Les séquences des amorces utilisées pour cibler ce gène sont identiques à celles utilisées dans le programme GolFilm. Il s'agit de l'amorce *forward nirK876f* (5'-ATY GGC GGV CAY GGC GA-3') et de l'amorce *reverse nirK1040r* (5'-GCC TCG ATC AGR TTR TGG TT-3') (Henry et al., 2004). Les PCR en temps réel sont réalisées dans un volume réactionnel de 20 µL contenant 1X de Taq PCR Mastermix (Qiagen), de la ligase T4 (20 ng final), les deux amorces (1 µM final) et 5 ng d'ADN.

L'amplification est réalisée dans le thermocycleur StepOne plus (Applied Biosystems) à l'aide du programme suivant :

- dénaturation initiale 95°C, 15 min
- dénaturation 95°C, 15 sec
- hybridation « touchdown » 63 – 58°C, 30 sec (6 cycles avec diminution de 1°C)
- élongation 72°C, 30 sec
- dénaturation 95°C, 15 sec
- hybridation 58°C, 30 sec (40 cycles)
- élongation 72°C, 30 sec

L'acquisition des données de fluorescence et l'analyse sont effectuées selon les instructions du fabricant. La quantification du nombre de copies d'ADN est réalisée à partir de courbes standards établies à l'aide de plasmides contenant un insert correspondant à la séquence de gène *nirK* ciblée.

Afin de pouvoir rapporter la quantité de copies du gène *nirK* à celle du gène ADNr 16S (permettant de faire un estimatif des abondances bactériennes), celui-ci est amplifié et quantifié à l'aide des amorces 341f (5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3') et 534r (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') (Muyzer et al. 1993). Le mélange réactionnel utilisé est identique à celui décrit pour le gène *nirK* à l'exception de la ligase T4, remplacée ici par de la BSA (*bovine serum albumin*, 5 µg final). Le programme d'amplification est composé des étapes suivantes :

- dénaturation initiale 95°C, 15 min
- dénaturation 95°C, 15 sec
- hybridation 60°C, 30 sec (30 cycles)
- élongation 72°C, 30 sec

## 2.6. Traitement des données et analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques est réalisé avec le logiciel R (version 2.11.0). L'effet de la température sur chaque paramètre biologique dans les expériences en microcosmes est évalué à partir d'une analyse de la variance à mesures répétées, qui permet de tenir compte des variations temporelles au cours du suivi et des interactions entre ce facteur et les conditions thermiques. En cas de différence significative sur l'ensemble du suivi ( $p < 0,05$ ), un test post-hoc de Tukey a été réalisé afin d'identifier les différences significatives entre traitements thermiques à chaque temps de prélèvement.

L'effet de la thermie sur les conditions physico-chimiques a été testé indépendamment pour chaque temps à partir d'une ANOVA à un facteur du fait du renouvellement intégral de l'eau chaque semaine. Avant d'être analysées, les données quantitatives ont subi une transformation logarithmique ( $\log_{10}(X+1)$ ) et les données relatives (ex. répartition des classes algales) ont subi une transformation arcsinus ( $\arcsin(\text{racine carrée } X)$ ) afin de répondre à l'hypothèse de normalité des données.

La comparaison, entre les différents échantillons, de la structure de la communauté bactérienne obtenue par PCR-ARISA, a été réalisée à l'aide d'une analyse en composante principale (ACP) sur les valeurs d'abondances relatives des OTU.

## 3. Résultats

### 3.1. Caractérisation et comparaison des communautés benthiques du Haut-Rhône et du Bas-Rhône

#### 3.1.1. Variations spatio-temporelles des conditions physico-chimiques

Les caractéristiques physico-chimiques de l'eau prélevée sur les deux sites d'échantillonnage et utilisée pour l'alimentation hebdomadaire des microcosmes durant les expériences de juillet et août sont décrites dans le tableau 2 (et détaillées dans les annexes 1 et 2).

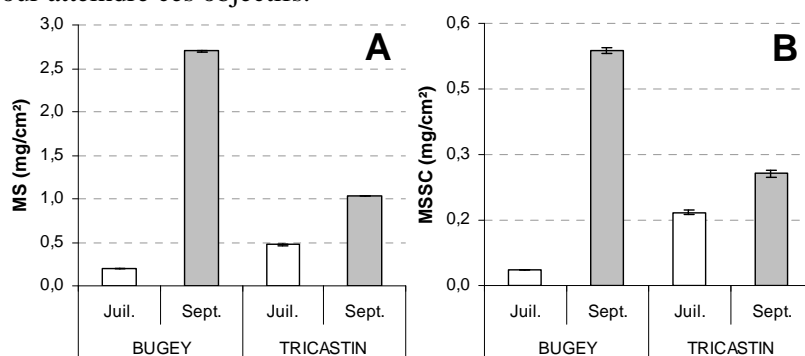
Paramètres	Unité	Bugey		Tricastin	
		Juillet	Septembre	Juillet	Septembre
Température	°C	18,8 ± 0,3	18,7 ± 2,1	21,9 ± 0,8	21,7 ± 1,5
pH		8,0 ± 0,1	8,0 ± 0,3	8,3 ± 0,1	8,1 ± 0,2
Conductivité	µS/cm	312,1 ± 8,7	297,5 ± 7,3	391,7 ± 13,5	446,1 ± 11,1
Oxygène dissous	mg/L	7,8 ± 1,5	7,1 ± 0,8	7,1 ± 0,8	6,6 ± 1,2
COD	mg/L	1,73 ± 0,01	1,85 ± 0,24	2,15 ± 0,11	2,05 ± 0,19
NO <sub>3</sub>	mg/L	2,85 ± 0,45	2,59 ± 0,16	4,89 ± 0,22	4,69 ± 0,31
NO <sub>2</sub>	mg/L	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,01
NH <sub>4</sub>	mg/L	0,06 ± 0,02	0,05 ± 0,03	0,04 ± 0,02	0,06 ± 0,03
PO <sub>4</sub>	mg/L	0,12 ± 0,08	0,07 ± 0,02	0,13 ± 0,04	0,12 ± 0,03
SiO <sub>2</sub>	mg/L	1,30 ± 0,43	1,61 ± 0,38	3,27 ± 0,12	3,38 ± 0,24

**Tableau 2.** Caractéristiques physico-chimiques de l'eau prélevée sur les deux sites d'échantillonnage et utilisée pour les renouvellements d'eau hebdomadaires dans les microcosmes (valeurs moyennes et écart-types des trois prélèvements réalisés au cours de chaque expérience)

Pour un site d'échantillonnage donné, les résultats mettent en évidence une stabilité temporelle assez forte pour l'ensemble des paramètres physico-chimiques mesurés, mis à part pour l'oxygène dissous (coefficient de variation de 12 à 22%), tant à l'échelle hebdomadaire pendant la durée de chaque expérience (au regard des faibles écart-types), qu'à l'échelle saisonnière entre le début et la fin de l'été (pas de différences significatives entre les valeurs mesurées en juillet et celles mesurées en septembre). A contrario, la comparaison inter-site fait apparaître des différences assez marquées entre la zone du Bas-Rhône (amont du CNPE de Tricastin) et celle du Haut-Rhône (amont du CNPE du Bugey). Elles s'expriment principalement au niveau de la température de l'eau (+3°C environ à Tricastin en juillet et en septembre) et de la conductivité, ainsi que pour les teneurs en COD, nitrates et silice, significativement plus élevées dans le Bas-Rhône.

### **3.1.2. Caractérisation structurale et fonctionnelle des communautés périphytiques prélevées dans le Rhône**

La caractérisation structurale et fonctionnelle des communautés périphytiques et sédimentaires prélevées sur chaque site lors des deux campagnes d'échantillonnage a pour objectif principal de décrire précisément l'état initial des communautés utilisées dans les dispositifs expérimentaux. Elle n'a pas vocation à décrire la diversité spatiale *in situ* des sites ni à dresser une comparaison spatio-temporelle des communautés microbiennes du Rhône, la stratégie d'échantillonnage n'ayant pas été dimensionnée pour atteindre ces objectifs.

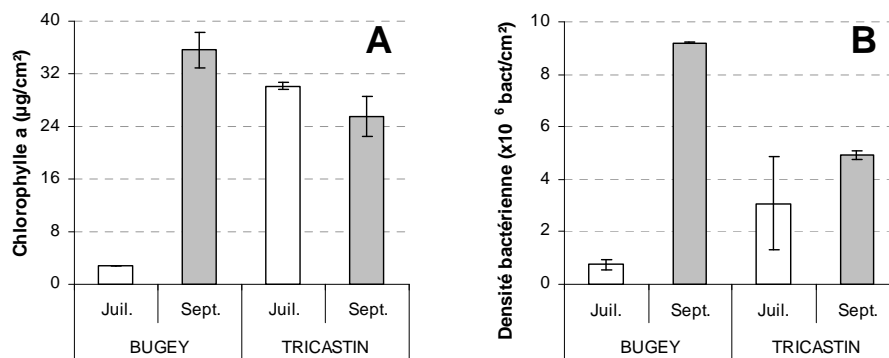


**Fig. 6. Biomasses des communautés périphytiques exprimées en matière sèche (MS, A) et en matière sèche sans cendre (MSSC, B)**

Il est cependant intéressant de constater que d'un point de vue quantitatif, les communautés périphytiques semblent beaucoup plus stables entre juillet et septembre sur le site de Tricastin que sur celui du Bugey. Cela se vérifie notamment au niveau de la biomasse totale du biofilm, qui fluctue peu dans le Bas-Rhône, tant en terme de MS (0,5 à 1 mg/cm² ; Fig 6A) que de MSSC (0,21 à 0,26 mg/cm² ; Fig 6B) alors qu'elle est multipliée environ par 14 à Bugey entre juillet (0,2 mg MS/cm² et 0,04 mg MSSC/cm²) et septembre (2,7 mg MS/cm² et 0,54 mg MSSC/cm²). La tendance est identique pour la concentration en chl *a* proche de 30 µg/cm² à Tricastin quelle que soit la date d'échantillonnage (Fig. 7A), alors qu'elle augmente d'un facteur 13 au Bugey entre juillet (2,8 µg/cm²) et septembre (35,6 µg/cm²) et pour la densité bactérienne (Fig. 7B) qui varie entre 3.10<sup>6</sup> et

5.10<sup>6</sup> bactéries/cm<sup>2</sup> à Tricastin et augmente d'un facteur 12 dans le Haut-Rhône entre juillet (7.10<sup>5</sup> bactéries/cm<sup>2</sup>) et septembre (9.10<sup>6</sup> bactéries/cm<sup>2</sup>).

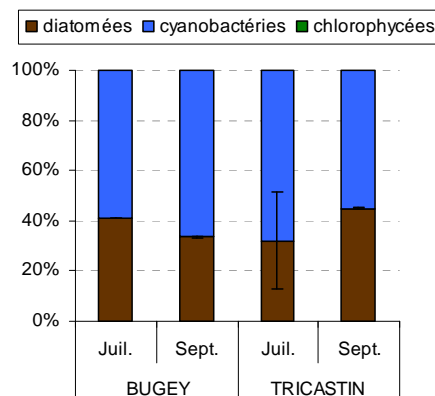
Cette forte variabilité temporelle observée uniquement à Bugey ne peut s'expliquer au regard des conditions physico-chimiques mesurées lors des échantillonnages et relativement similaires en juillet et en septembre (Tableau 2). Elle est à considérer au regard des forts changements de la biomasse périphytique. Il est envisageable qu'elle soit liée, au moins pour partie, aux contraintes hydrologiques beaucoup plus fluctuantes dans le secteur du Haut-Rhône en raison des lâcher de barrages qui peuvent conditionner fortement la dynamique des biofilms périphytiques en favorisant leur décrochage dans les périodes de débits importants.



**Fig. 7.** Concentration en chlorophylle (A) et densité bactérienne (B) dans les communautés périphytiques

Malgré ces différences, la composition globale de la communauté photosynthétique (à l'échelle des principaux groupes algaux et des cyanobactéries) est assez constante au niveau des deux stations d'échantillonnage, avec une dominance des cyanobactéries (55% à 68%) et une forte représentation des diatomées, les autres groupes (et notamment les chlorophycées) étant trop minoritaires (<2%) pour être détectés à partir d'une analyse en fluorimétrie avec le PhytoPAM (Fig. 8).

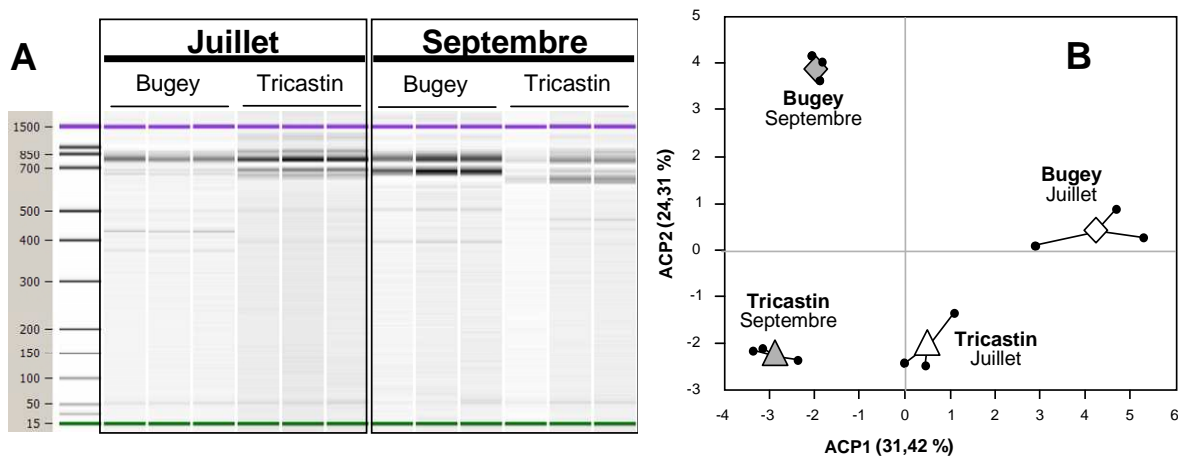
Il est cependant à noter que cette analyse de la structure de la communauté phototrophe s'appuie sur une caractérisation très globale basée uniquement sur des grandes classes qui peuvent regrouper une diversité spécifique importante, non explorée ici. Il n'est donc pas à exclure qu'une variabilité spatiale et/ou temporelle puisse exister au niveau de la diversité algale et cyanobactérienne des échantillons récoltés.



**Fig. 8.** Répartition des différentes classes algales dans les communautés phototrophes périphytiques

En parallèle, la structure des communautés bactériennes périphytiques a été appréhendée par une méthode d'empreinte moléculaire (la PCR-ARISA). Celle-ci permet de caractériser les échantillons en fonction de l'abondance relative des unités taxonomiques opérationnelles (théoriquement au niveau de l'espèce) les plus représentées dans la communauté bactérienne (>1% de l'ADN amplifié total; Hewson et Fuhrman, 2004). La comparaison de la structure des communautés bactériennes périphytiques collectées dans le Rhône a été effectuée à l'aide d'une ACP (Fig. 9B), à partir des profils moléculaires (Fig. 9A).

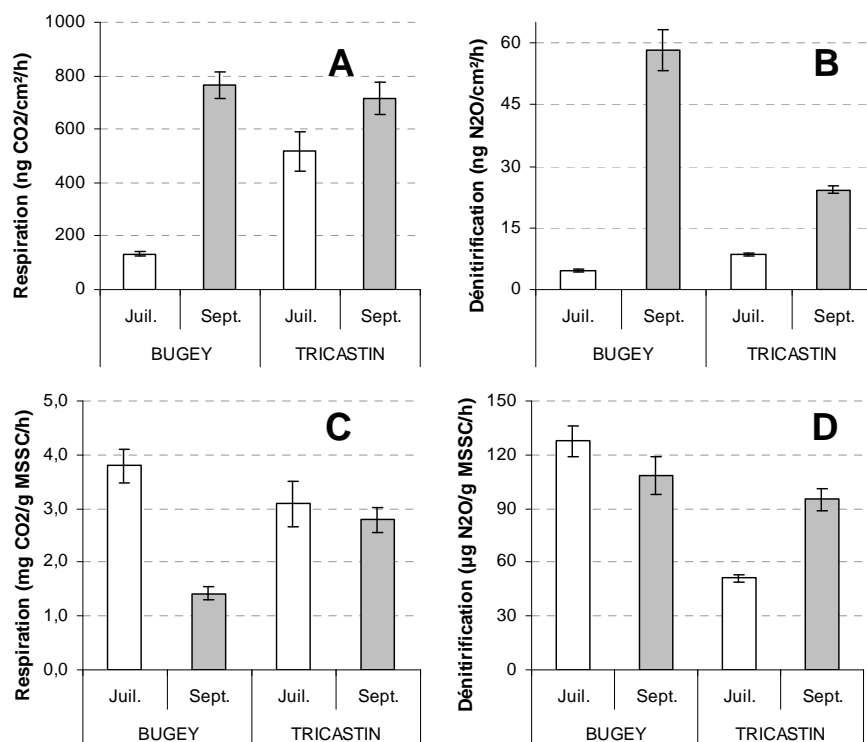
Les deux axes de l'ACP expliquent plus de 55% de la variance avec une séparation temporelle (juillet vs septembre) assez marquée selon l'axe 1 et une dissociation des sites suivant l'axe 2. Comme pour les paramètres quantitatifs (biomasse et densité bactérienne), on retrouve une séparation très nette des échantillons respectivement prélevés en juillet et en septembre au Bugey, tant sur l'axe 1 que sur l'axe 2. Cela suggère donc une évolution assez forte de la structure des communautés bactériennes périphytiques entre ces deux dates, alors qu'elle reste beaucoup plus stable pour Tricastin, comme le montre la proximité des profils qui présentent notamment des coordonnées assez constantes sur l'axe 2 quelle que soit la période d'échantillonnage (Fig. 9B).



**Fig. 9.** Profils génétiques (par PCR-ARISA) des communautés bactériennes périphytiques (A) et comparaison spatio-temporelle (B) réalisée par une analyse en composantes principales (ACP) en considérant l'abondance relative de chaque unité taxonomique opérationnelle (OTU). Les points illustrent la dispersion des réplicats autour du barycentre représenté par un symbole.

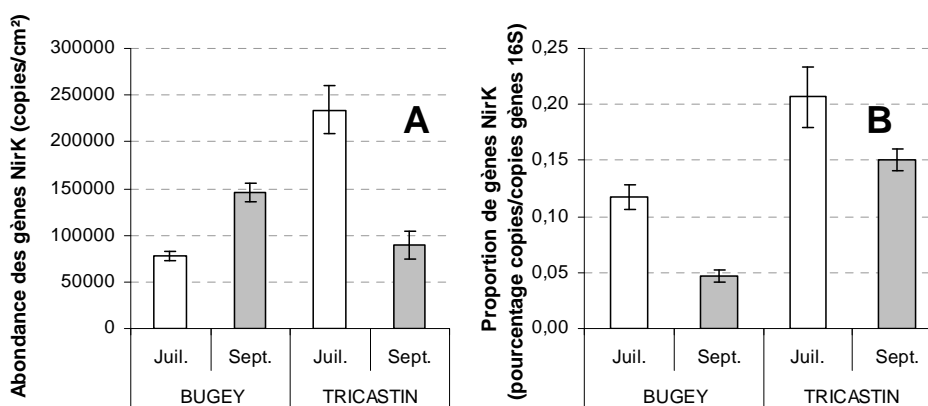
Les mesures de production de CO<sub>2</sub> par respiration (Fig. 10A) et de N<sub>2</sub>O par dénitrification (Fig. 10B) montrent que le niveau de ces activités par unité de surface (cm<sup>2</sup>) est directement liée à la biomasse périphytique et, plus vraisemblablement à la densité bactérienne (corrélation positive linéaire significative ( $p < 0,05$ ) avec la respiration :  $R^2 = 0,76$  et la dénitrification :  $R^2 = 0,89$ , données non montrées). Les variations spatiales (Bugey/Tricastin) et temporelles (juillet/septembre) de ces fonctions sont donc similaires à celles décrites précédemment pour ces deux paramètres (biomasse périphytique et densité bactérienne).

Cependant, si les taux de production de CO<sub>2</sub> et de N<sub>2</sub>O sont normalisés en fonction de la biomasse organique (MSSC ; Fig 10C et 10D), les tendances restent identiques à Tricastin alors qu'elles s'inversent à Bugey, en particulier pour l'activité potentielle de respiration qui s'avère alors plus élevée en juillet qu'en septembre (Fig. 10C).



**Fig. 10.** Production par unité de surface (A, B par cm<sup>2</sup>) et par unité de biomasse (C, D en g MSSC) de CO<sub>2</sub> par respiration (A, C) et de N<sub>2</sub>O par dénitrification (B, D) par les communautés périphtiques

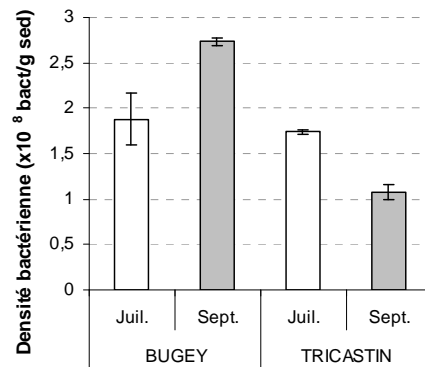
Le nombre de copies de gène *nirK* par cm<sup>2</sup> est compris entre 0,7.10<sup>5</sup> et 2,5.10<sup>5</sup> selon la station d'échantillonnage et le mois de prélèvement avec un ratio par rapport au nombre de gène ADNr 16S inférieur à 0,25% (Fig. 11B).



**Fig. 11.** Abondance des gènes *nirK* (A, en nombre de copies par cm<sup>2</sup>) et proportion par rapport au nombre de copies de gène ADNr 16S (B, en %) dans les communautés bactériennes périphtiques

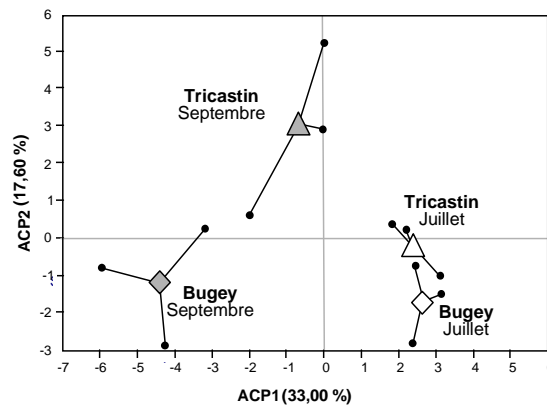
### 3.1.3. Caractérisation structurale et fonctionnelle des communautés sédimentaires prélevées dans le Rhône

Compte tenu de la prédominance marquée des communautés hétérotrophes dans les milieux sédimentaires, seul le compartiment bactérien a été étudié dans ce type d'échantillons. Les dénombrements bactériens effectués par cytométrie en flux font apparaître une stabilité du nombre de cellules bactériennes, compris entre  $1.10^8$  et  $3.10^8$  bactéries par gramme de sédiment, quels que soient le lieu d'échantillonnage et la date de prélèvement (Fig. 12).



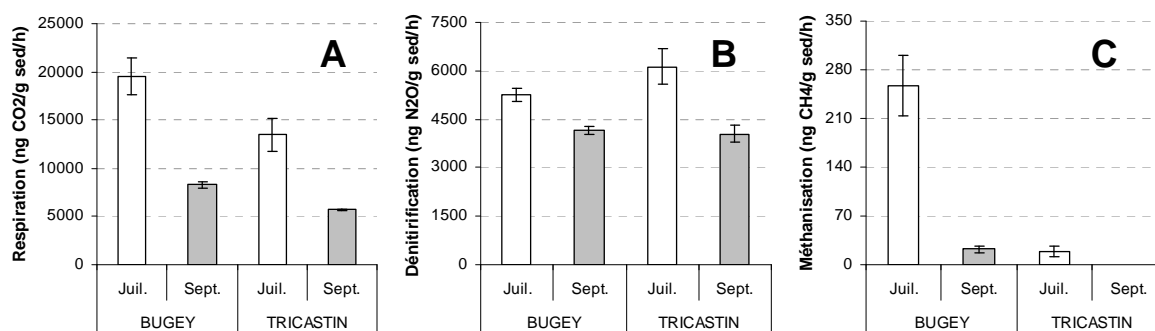
**Fig. 12.** Densité bactérienne dans les communautés sédimentaires

L'analyse de la diversité bactérienne par PCR-ARISA (Fig. 13) révèle une structure assez proche entre les communautés de Bugey et de Tricastin lors de l'échantillonnage réalisé en juillet. Une évolution temporelle significative est observée entre juillet et septembre suivant l'axe 1 de l'ACP (qui explique 33% de la variance observée) avec une distinction nette entre les deux stations suivant l'axe 2 (17,6% de la variance) en septembre.



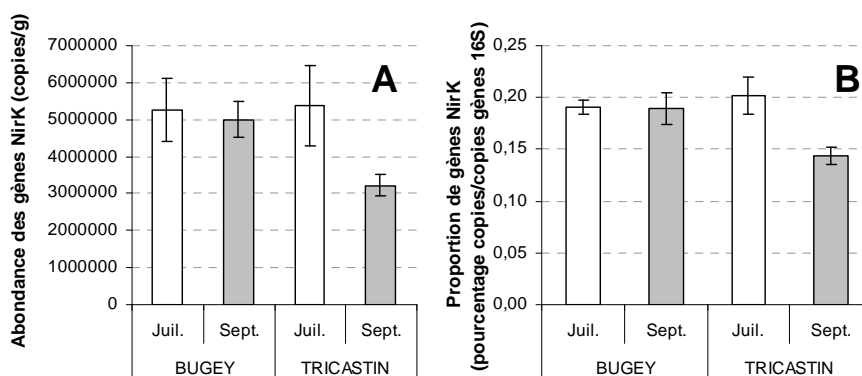
**Fig. 13.** Comparaison spatio-temporelle réalisée par une analyse en composantes principales (ACP) en considérant l'abondance relative de chaque unité taxonomique opérationnelle (OTU) obtenus sur les profils de PCR-ARISA des communautés bactériennes sédimentaires. Les points illustrent la dispersion des répliqués autour du barycentre représenté par un symbole.

Les activités potentielles de respiration (Fig. 14A) et de dénitrification (Fig. 14B) mesurées dans les sédiments révèlent également une évolution temporelle, avec des niveaux de production de  $CO_2$  et de  $N_2O$  plus élevés en juillet ( $>115000$  ng  $CO_2/g/h$  et  $> 5000$  ng  $N_2O/g/h$ ) qu'en septembre ( $< 9000$  ng  $CO_2/g/h$  et  $> 4500$  ng  $N_2O/g/h$ ), sans différence majeure en fonction de l'origine des échantillons.



**Fig. 14.** Production de CO<sub>2</sub> par respiration (A), de N<sub>2</sub>O par dénitrification (B) et de CH<sub>4</sub> par méthanisation (C) par les communautés sédimentaires

La proportion de copies du gène *nirK* par rapport au nombre de copies du gène de l'ARNr 16S (Fig.15B) est comparable à celle observée dans les communautés périphtiques puisqu'elle est comprise entre 0,14% et 0,22% avec une abondance totale variant de 3.10<sup>6</sup> à 6,5.10<sup>6</sup> copies par gramme de sédiment (Fig. 15A). Les plus fortes différences en terme d'activité entre les échantillons sont observées pour la méthanisation, qui a une production moyenne de 258 ng CH<sub>4</sub>/g/h par les communautés sédimentaires prélevées à Bugey en juillet alors que cette production est très faible (<25 ng CH<sub>4</sub>/g/h) voire non détectable avec les autres échantillons (Fig. 14C).



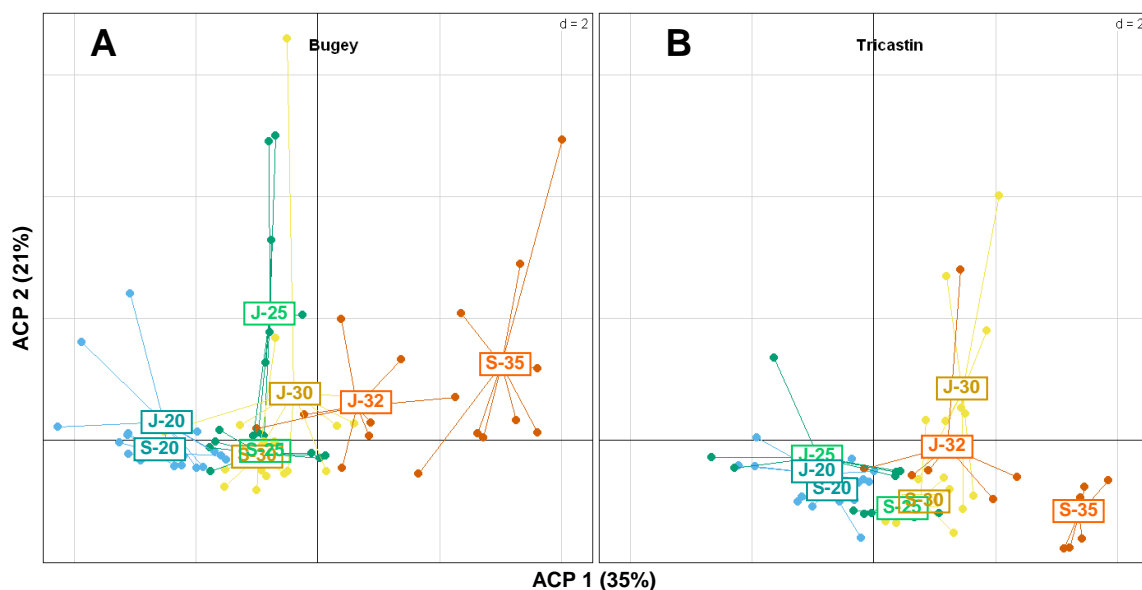
**Fig. 15.** Abondance des gènes *NirK* (A, en nombre de copies par g) et proportion par rapport au nombre de copies de gène d'ADNr 16S (B, en %) dans les communautés bactériennes sédimentaires

### 3.2. Etudes des effets potentiels d'un rejet thermique sur les communautés benthiques

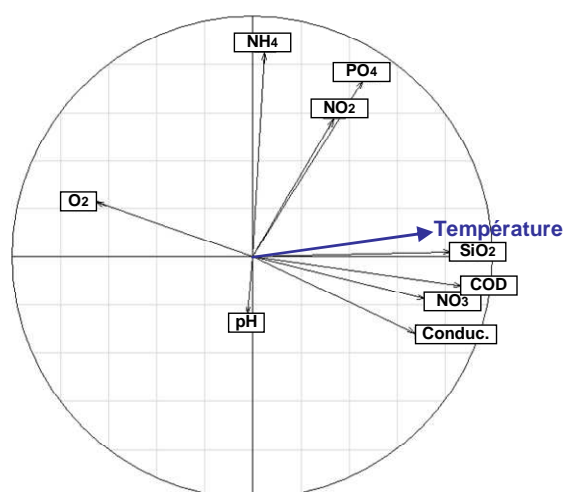
#### 3.2.1. Influence de la température sur les conditions physico-chimiques dans les microcosmes

L'influence (directe ou indirecte) de la température sur l'évolution des conditions physico-chimiques dans les microcosmes est évaluée à partir de mesures effectuées chaque semaine, avant le renouvellement de l'eau. Toutes les données physico-chimiques mesurées sont présentées en annexes 1 et 2. Elles ont été compilées dans une analyse en composante principale (ACP), afin d'identifier les paramètres les plus influencés par les conditions thermiques. Les deux axes principaux de l'ACP expliquent 56% de la variance totale avec une forte discrimination des échantillons en fonction de la température suivant l'axe 1 et ce quelle que soit la saison (juillet et septembre) et l'origine des échantillons (Bugey, Fig 16A et Tricastin, Fig 16B), avec une séparation plus marquée des échantillons issus des microcosmes présentant les températures les plus élevées en septembre (i.e. 35°C vs 32°C en juillet).



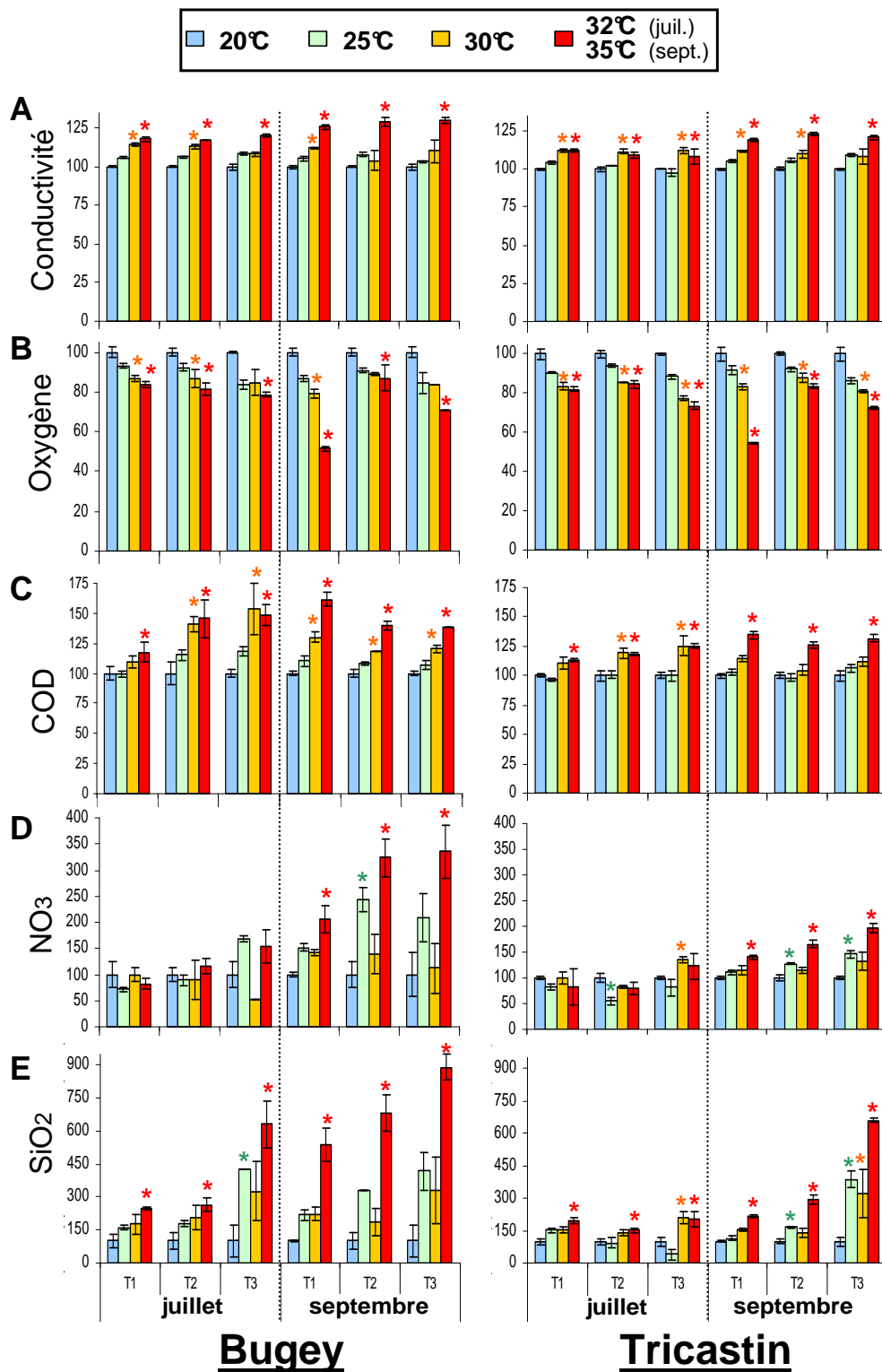


**Fig. 16.** Analyse en composantes principales (ACP) des données physico-chimiques mesurées lors des deux expériences en microcosmes réalisées avec les échantillons provenant de Bugey (A) et de Tricastin (B). Les points illustrent la dispersion autour du barycentre représenté par l'étiquette (mois-température).



**Fig. 17.** Cercle des corrélations obtenu par ACP avec toutes les données physico-chimiques mesurées lors des deux expériences en microcosmes. Les axes 1 et 2 représentent respectivement 35% et 21% de la variance totale. La température a été projetée comme variable supplémentaire (non explicative)

Le cercle des corrélations obtenu à partir de cette ACP (Fig. 17) montre que le COD, la conductivité, la silice et les nitrates sont positivement corrélés à l'axe 1 alors que la concentration en oxygène dissous est négativement corrélée à celui-ci. Cela met donc en évidence une influence forte de la température sur ces différents paramètres. Si l'amplitude et la significativité des effets est variable en fonction des expériences, les résultats présentés dans la figure 18 confirme la diminution (logique) de l'oxygène dissous (Fig. 18B) et l'augmentation de la conductivité (Fig. 18A) et des concentrations en COD (Fig. 18C), nitrates (Fig. 18D) et silice (Fig. 18E) lorsque la température s'élève. La plupart des différences avec le témoin (20°C) ne sont perceptibles qu'à partir de 30°C ou 32°C suivant les paramètres.

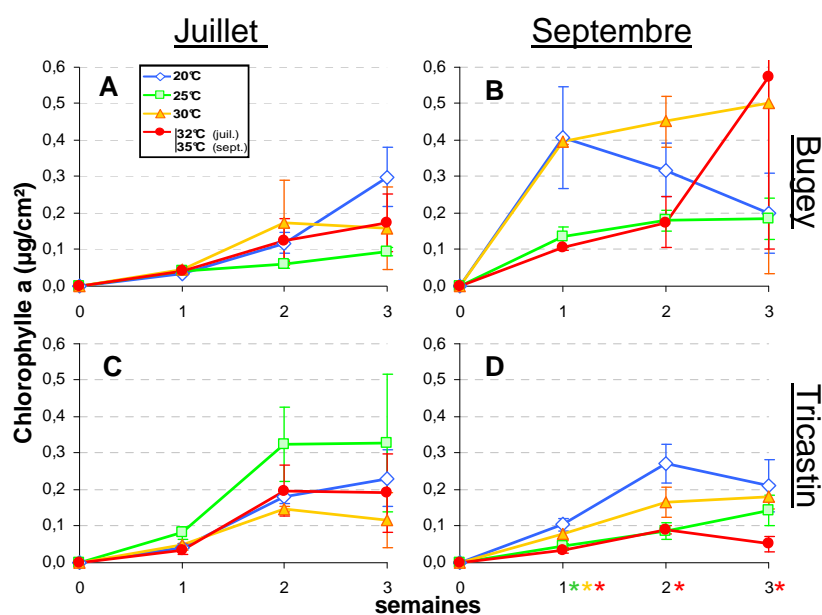


**Fig. 18** Evolution relative (pourcentage par rapport au contrôle à 20°C) de la conductivité (A), de l'oxygène dissous (B), du carbone organique dissous (COD; C), des nitrates (NO<sub>3</sub>; D) et de la silice (SiO<sub>2</sub>; E) dans les différents microcosmes. Les astérisques identifient les valeurs significativement différentes (p < 0,05) au contrôle (20°C).

### 3.2.2. Effets de la température sur les communautés phototrophes périphytiques

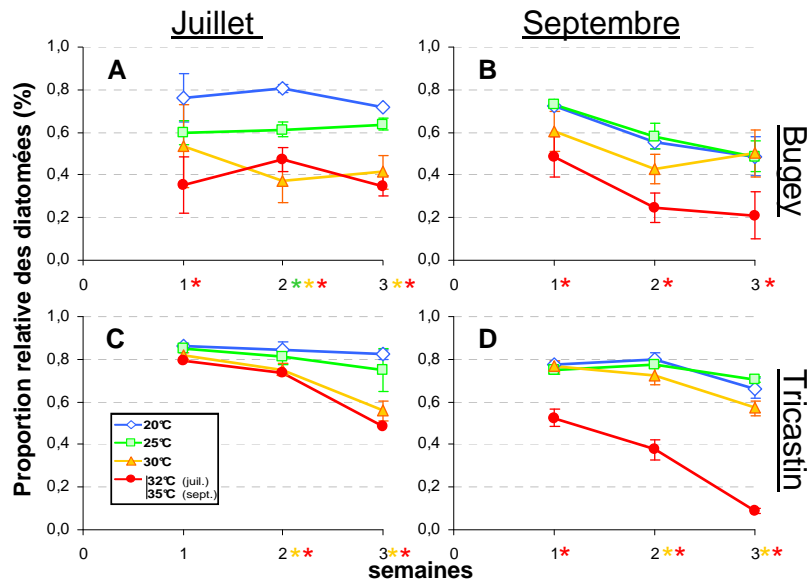
#### Biomasse et structure des communautés

L'évolution des concentrations en chl *a* dans les différents contextes (Fig. 19) illustre le développement des biofilms phototrophes sur les substrats artificiels répartis dans les microcosmes. Les dynamiques de croissance des communautés issues de Bugey sont assez variables, avec des différences assez marquées entre les réplicats, ce qui engendre des écart-types importants ne permettant pas de mettre en évidence l'influence des températures (Fig. 19A et 19B). Avec les communautés de Tricastin, les dynamiques observées en juillet (Fig. 19C) et septembre (Fig. 19D) révèlent une phase de croissance rapide pendant les deux premières semaines (colonisation) avant une période de stabilisation correspondant à la maturation des communautés. Si la température n'a pas d'effet significatif sur les concentrations en chl *a* lors de l'expérience réalisée en juillet (Fig. 19C), l'analyse statistique met en évidence un effet négatif de la hausse thermique sur ce paramètre en septembre (Fig. 19D). Cet effet est transitoire à 25°C (1 semaine) et 30°C (1 et 2 semaines) mais il perdure sur toute la durée de l'expérience lorsque la température est maintenue à 35°C.

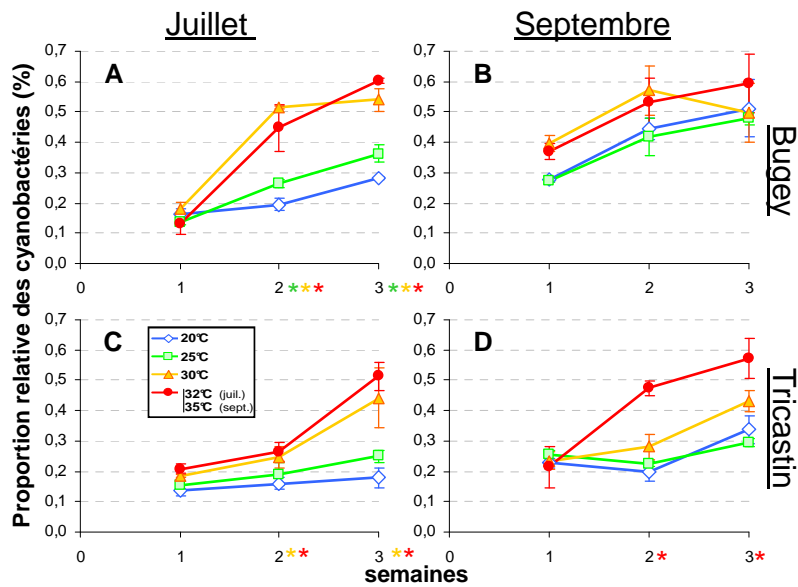


**Fig. 19.** Evolution de la concentration en chlorophylle *a* ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) dans les différentes expériences en microcosmes (A : Bugey juillet ; B : Bugey septembre ; C : Tricastin juillet ; D : Tricastin septembre). Les astérisques indiquent pour chaque semaine les valeurs significativement différentes ( $p < 0,05$ ) au contrôle (20°C) en suivant le code couleur décrit dans la légende.

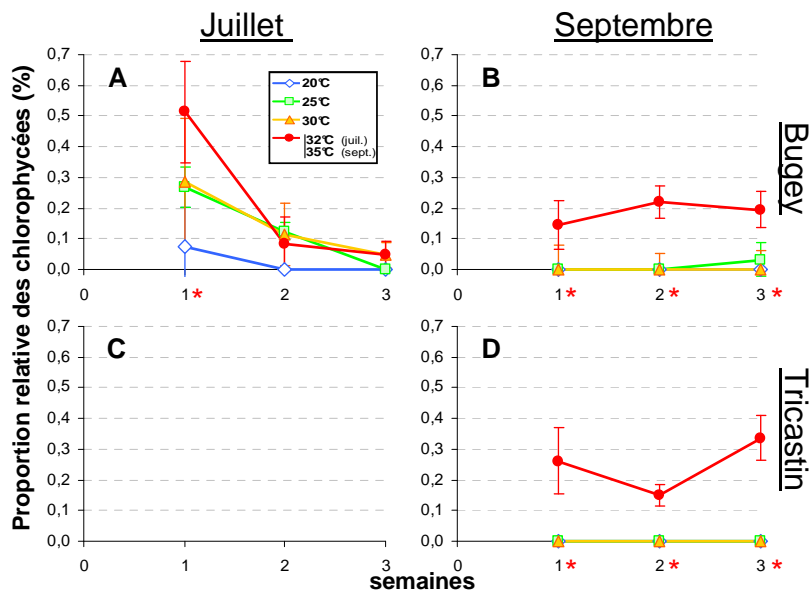
Au sein de la communauté phototrophe, c'est le groupe des diatomées qui est le plus négativement affecté par la hausse thermique (Fig. 20). Ainsi, si la proportion de diatomées est comprise entre 45% et 85% (moyenne 75% pour l'ensemble des échantillons) dans les microcosmes maintenus à 20°C, elle diminue significativement lorsque la température s'élève. Les effets les plus marqués sont observés en fin de suivi, lorsque le biofilm est mature, avec des différences significatives avec le contrôle (20°C) pour les températures supérieures (tous les échantillons) ou égales (Bugey juillet, Tricastin juillet et septembre) à 30°C (pourcentages réduits de 2 à 7 fois suivant les expériences).



**Fig. 20.** Evolution de la proportion de diatomées (%) dans les différentes expériences. (voir Fig. 19 pour le détail de la légende)



**Fig. 21.** Evolution de la proportion de cyanobactéries (%) dans les différentes expériences. (voir Fig. 19 pour le détail de la légende)



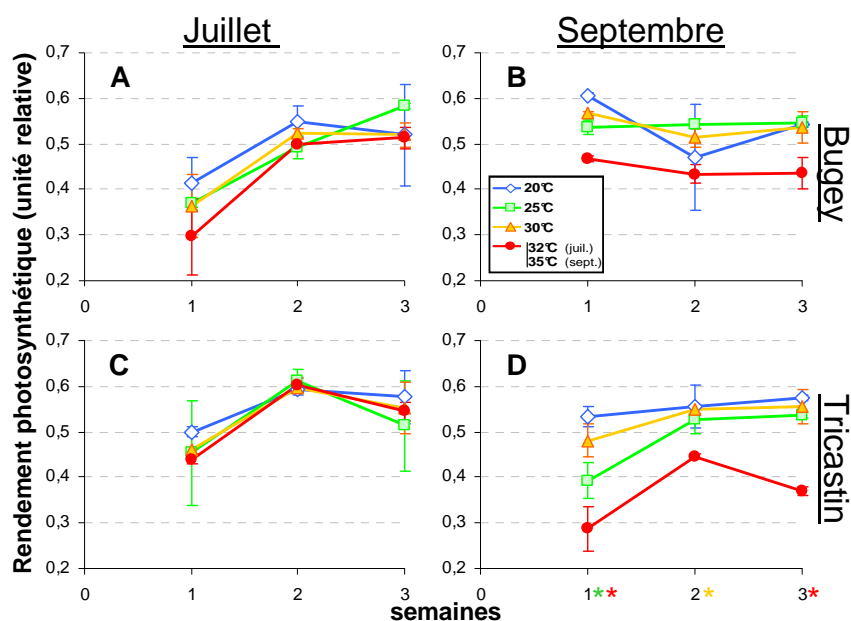
**Fig. 22.** Evolution de la proportion de chlorophycées (%) dans les différentes expériences. (voir Fig. 19 pour le détail de la légende)

La tendance est inversée pour les cyanobactéries dont les proportions augmentent lorsque la température s'élève. Cette augmentation est significative à partir de 2 semaines en juillet pour les échantillons de Bugey (à partir de 25°C ; Fig. 21A) et de Tricastin (à partir de 30°C ; Fig. 21C) et en septembre pour ceux de Tricastin uniquement (35°C ; Fig. 21D).

Lorsqu'elles sont présentes (ou suffisamment représentées pour être détectées par fluorimétrie à l'aide du PhytoPam), les chlorophycées voient également leur proportion augmenter significativement lorsque la température est supérieure à 30°C (Fig. 22). Si l'effet positif de la thermie sur ce groupe algal est transitoire (Bugey ; Fig 22A) ou imperceptible (Tricastin ; Fig. 22C) lors de l'expérience réalisée en juillet, il est observé sur l'ensemble du suivi lors de l'expérience de septembre, dans tous les microcosmes maintenus à 35°C (Fig. 22B et 22D). Dans ce contexte, les chlorophycées représentent ainsi en moyenne 22% ( $\pm 7\%$ ) de la biomasse phototrophe alors qu'elles sont absentes ou très minoritaires (<10%) pour les températures inférieures ou égales à 30°C.

### Activité phototrophe

Le potentiel photosynthétique des communautés n'est pas affecté par la température lors de l'expérience de juillet (Fig. 23A et 23C), même dans les conditions les plus chaudes (32°C). Cependant, une inhibition significative de ce potentiel d'activité (avec une diminution d'environ 35% en fin de suivi), est enregistrée pour les biofilms de Tricastin soumis à des conditions thermiques de 35°C en septembre (Fig. 23D). Une tendance similaire (non confirmée par les statistiques du fait d'écart-types importants dans les contrôles) est observée dans les mêmes conditions pour les communautés de Bugey, qui voient leur potentiel photosynthétique diminuer d'environ 20% à 35°C en fin de suivi (Fig. 23B).

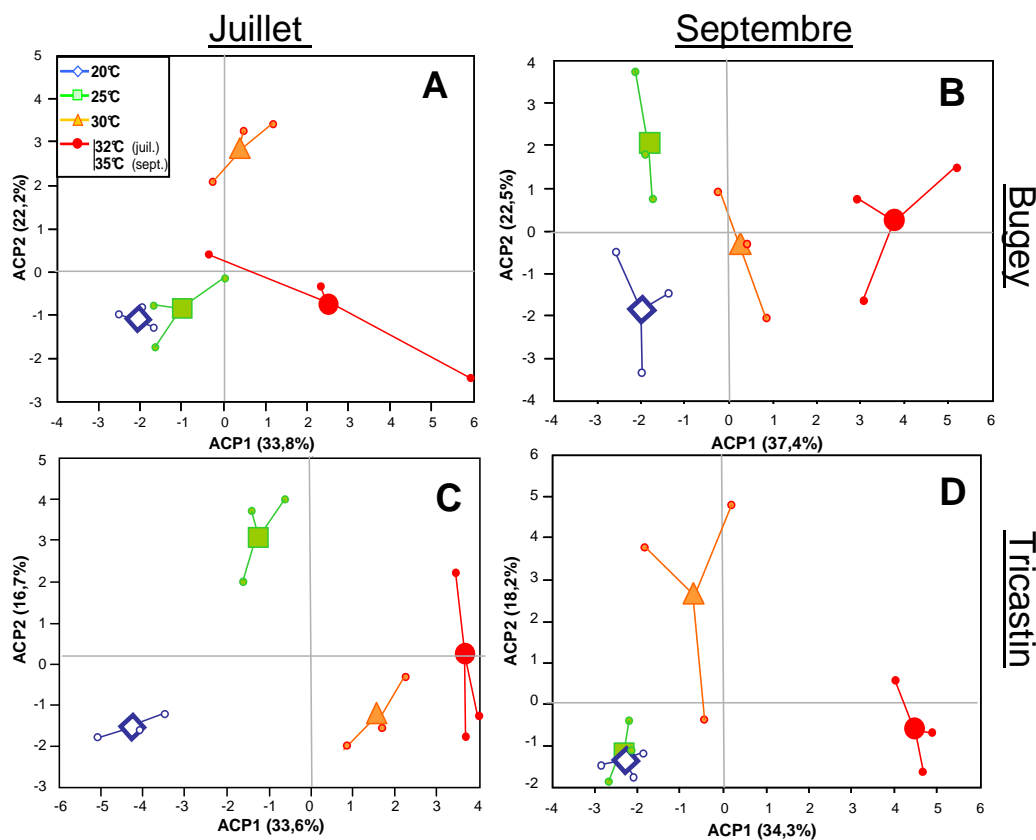


**Fig. 23.** Evolution du rendement photosynthétique (unité relative) dans les différentes expériences. (voir Fig. 19 pour le détail de la légende)

### 3.2.3. Effets de la température sur les communautés hétérotrophes périphytiques

#### Abondance et structure des communautés bactériennes périphytiques

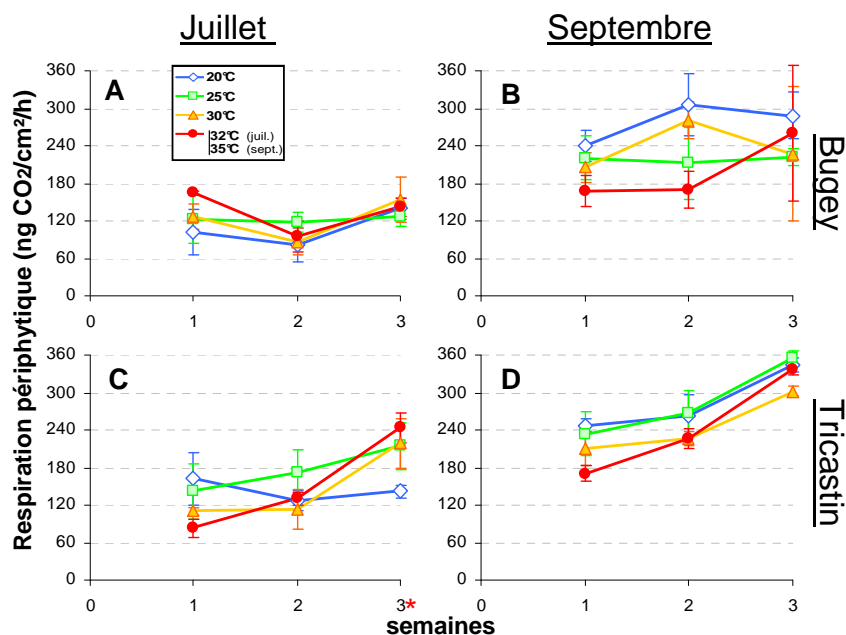
Les mesures d'abondance bactérienne dans les communautés périphytiques, effectuées par cytométrie en flux et par qPCR en ciblant le gène codant pour l'ARNr 16S, ne révèlent pas d'effet significatif de la température sur ce paramètre (résultats non présentés). Cependant, les ACP obtenues à partir de l'analyse des profils de PCR-ARISA révèlent un effet de la hausse thermique sur la structure des communautés bactériennes (Fig. 24). En effet, quelle que soit l'origine des communautés et la date du prélèvement initial, une séparation est observée selon l'axe principal de l'ACP (qui explique environ 1/3 de la variance observée) en fonction des conditions thermiques testées.



**Fig. 24.** Analyses en composantes principales (ACP) des profils génétiques (PCR-ARISA) des communautés bactériennes périphytiques en considérant l'abondance relative de chaque unité taxonomique opérationnelle (OTU). Les points illustrent la dispersion des réplicats autour du barycentre.

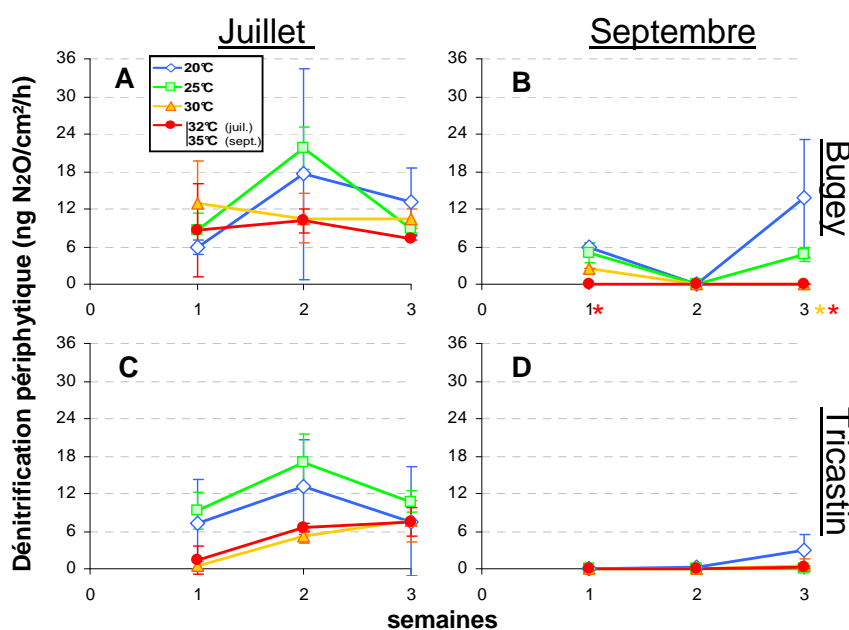
#### Activité hétérotrophes périphytiques

Les mesures du potentiel de respiration des biofilms mettent en évidence une évolution temporelle avec une augmentation plus ou moins marquée au cours de chacune des expériences (Fig. 25). Cependant, cette évolution semble être peu influencée par la température, l'analyse statistique révélant uniquement une stimulation significative de la respiration à 32°C lors de la fin de l'expérience réalisée en juillet avec les échantillons de Tricastin (Fig. 25C).

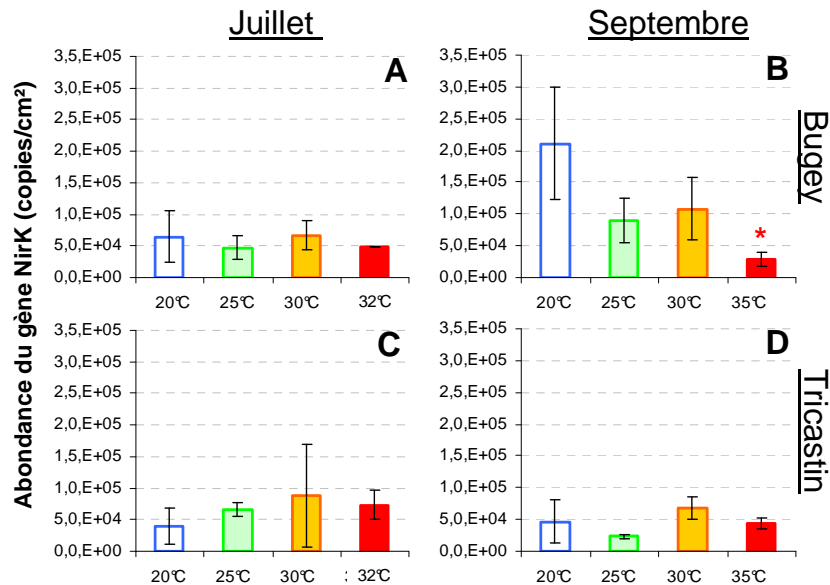


**Fig. 25.** Evolution de la production de CO<sub>2</sub> par respiration (ng CO<sub>2</sub>/cm<sup>2</sup>/h) par les biofilms dans les différentes expériences. (voir Fig. 19 pour le détail de la légende)

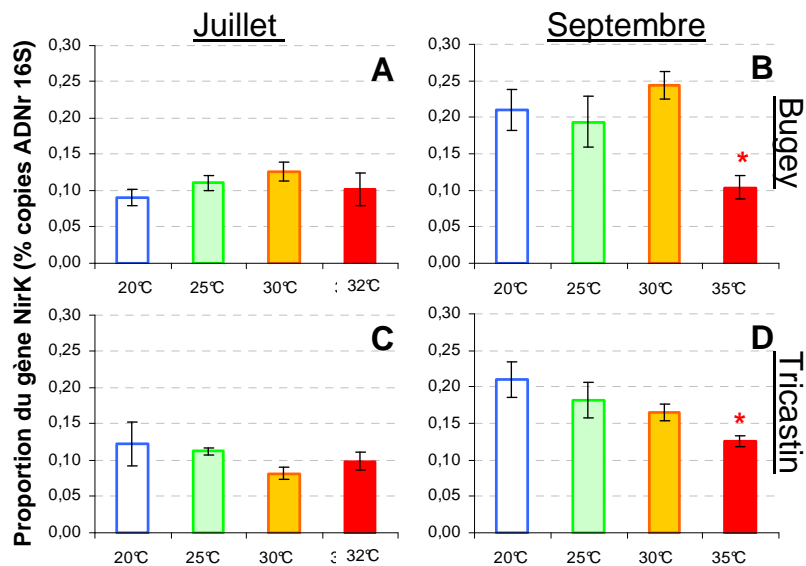
Il en est de même pour le potentiel de dénitrification des communautés périphytiques (Fig. 26), uniquement impacté négativement à la température de 35°C lors de l'expérience réalisée en septembre avec les communautés de Bugey (Fig. 26B). Cette baisse d'activité s'explique (au moins en partie) par une diminution du potentiel génétique fonctionnel des communautés bactériennes, illustrée par la réduction de l'abondance de gène *nirK* au sein de la communauté, tant en valeur absolue (nombre de copies de gènes par cm<sup>2</sup> ; Fig. 27B) qu'en valeur relative (% NirK/16S ; Fig. 28B). La proportion de gène *nirK* est également réduite significativement à 35°C en septembre pour les échantillons de Tricastin (Fig. 28D) mais les taux de production de N<sub>2</sub>O mesurés au cours de cette expérience sont trop faibles pour percevoir les effets de la température sur ce paramètre (Fig. 26D).



**Fig. 26.** Evolution de la production de N<sub>2</sub>O par dénitrification (ng N<sub>2</sub>O/cm<sup>2</sup>/h) par les biofilms dans les différentes expériences. (voir Fig. 19 pour le détail de la légende)



**Fig. 27.** Abondance du gène NirK (nombre de copies/cm<sup>2</sup>) dans les communautés périphytiques après 3 semaines dans les différentes expériences.



**Fig. 28.** Proportion relative du gène NirK (% NirK/16S) dans les communautés périphytiques après 3 semaines dans les différentes expériences.

### 3.2.4. Effets de la température sur les communautés hétérotrophes sédimentaires

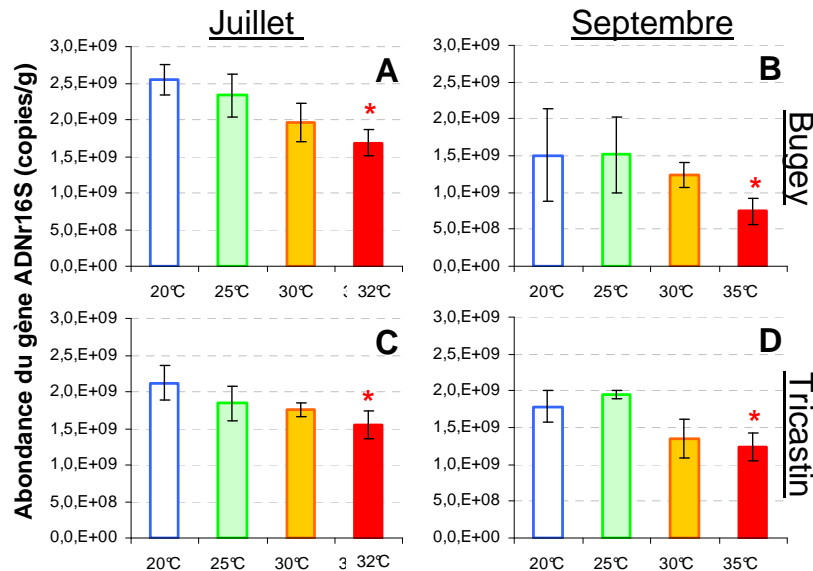
#### Abondance et structure des communautés bactériennes sédimentaires

Comme pour les bactéries périphytiques, les comptages effectués par cytométrie en flux ne révèlent pas d'effet de la température sur l'abondance bactérienne. Avec cette méthode, celle-ci est estimée à un niveau compris entre  $0,6 \cdot 10^8$  et  $2,5 \cdot 10^8$  bactéries par gramme de sédiment sur l'ensemble des expériences en microcosmes, sans différence significative entre les différentes conditions thermiques (résultats non présentés).

Cependant, l'analyse de l'abondance bactérienne sur la base du dénombrement par qPCR de l'abondance de copies de l'ADNr 16S après trois semaines d'incubation dans les microcosmes révèle une diminution significative du nombre de cellules à la température la plus élevée (32°C ou 35°C) quelle que soit l'origine des échantillons ou la date du prélèvement initial (Fig. 29).

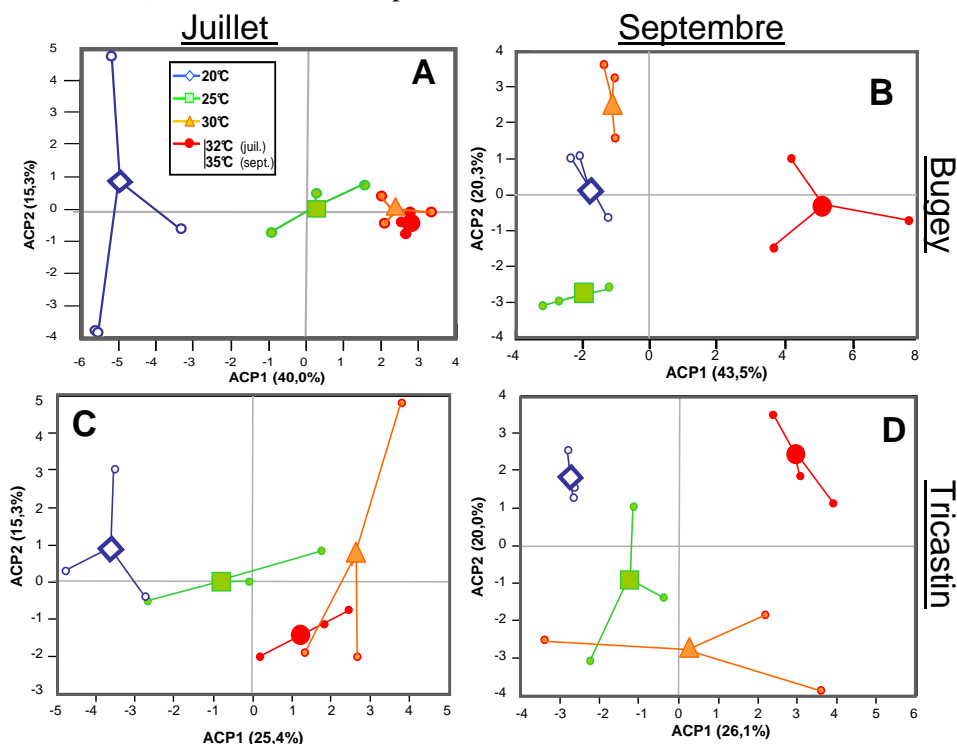


L'absence d'effet visible à partir des dénombrements en cytométrie en flux semble que suggérer que le protocole utilisé dans cette étude pour dissocier les cellules bactériennes et les séparer des particules sédimentaires n'ait pas été complètement efficace. En effet, la corrélation positive observée entre le potentiel de respiration hétérotrophe et l'abondance de gènes ADNr 16S dans les sédiments (n=48 ;  $R^2=0,39$  ;  $p<0,05$  ; résultats non présentés) semble renforcer la pertinence de l'approche par qPCR.



**Fig. 29.** Abondance bactérienne estimée par quantification du gène codant pour l'ARNr 16S (nombre de copies/g) dans les communautés sédimentaires après 3 semaines dans les différentes expériences.

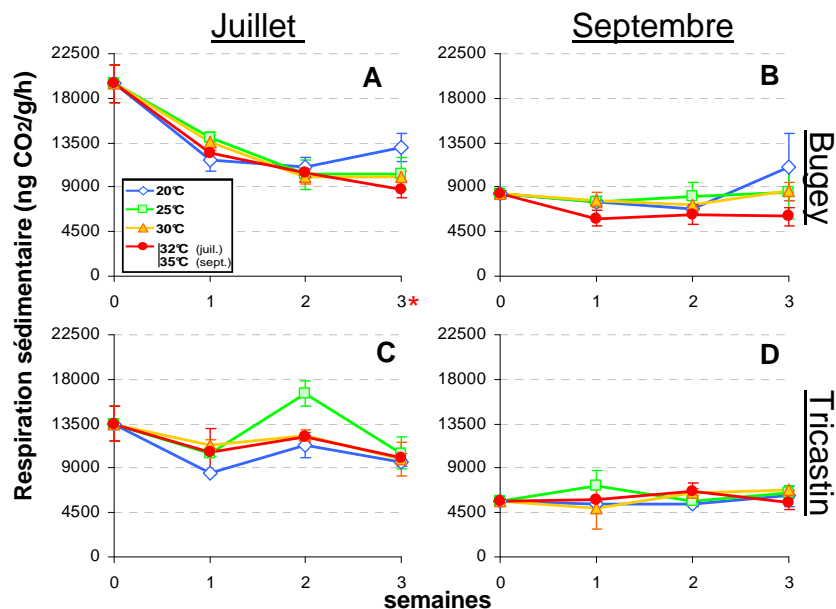
L'effet de la température sur la structure des communautés bactériennes sédimentaires (Fig. 30) est assez comparable à celui décrit précédemment avec les communautés bactériennes périphtiques (Fig. 24). Les profils génétiques obtenus sont ainsi séparés suivant l'axe 1 des ACP (qui explique 25,4% à 43,5% de la variance) en fonction des températures testées.



**Fig. 30.** Analyses en composantes principales (ACP) des profils génétiques (PCR-ARISA) des communautés bactériennes sédimentaires en considérant l'abondance relative de chaque OTU. Les points illustrent la dispersion des répliquats autour du barycentre.

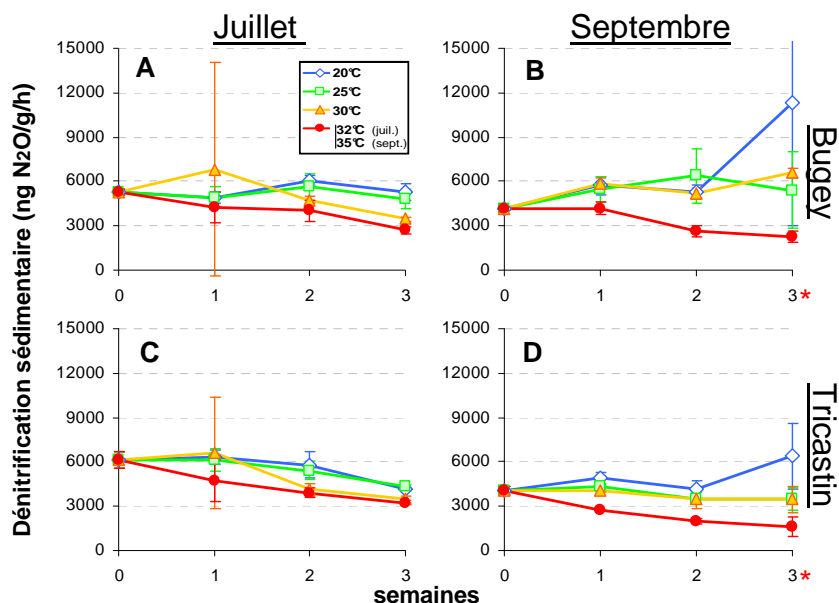
### Activité des communautés bactériennes sédimentaires

Comme pour les biofilms, l'augmentation de la température ne semble pas affecter de manière notable le potentiel de respiration des communautés sédimentaires. En effet, l'analyse statistique des résultats fait apparaître un effet négatif significatif de la température uniquement pour les sédiments du Bugey, après 3 semaines d'incubation à 32°C durant l'expérience de juillet (Fig. 31A).



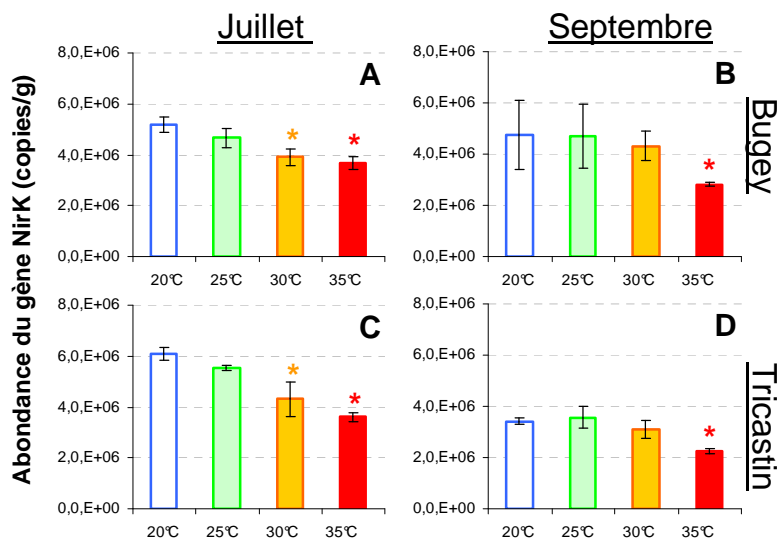
**Fig. 31.** Evolution de la production de CO<sub>2</sub> par respiration (ng CO<sub>2</sub>/cm<sup>2</sup>/h) par les sédiments dans les différentes expériences (voir Fig. 19 pour le détail de la légende).

Par contre, une inhibition assez nette du potentiel de dénitrification est observée en septembre pour les communautés sédimentaires de Bugey (Fig. 32B) et de Tricastin (Fig. 32D) soumises à des conditions thermiques de 35°C. Cette inhibition est perceptible dès la fin de la première semaine avec des effets plus marqués en fin de suivi, où elle est alors de l'ordre d'un facteur de 4. Une tendance similaire est également observée à partir de 2 semaines en juillet pour les échantillons maintenus à 30°C et 32°C (Fig. 32A et 32C) même si l'analyse statistique ne révèle pas de différence significative avec la production de N<sub>2</sub>O dans les microcosmes maintenus à 20°C.



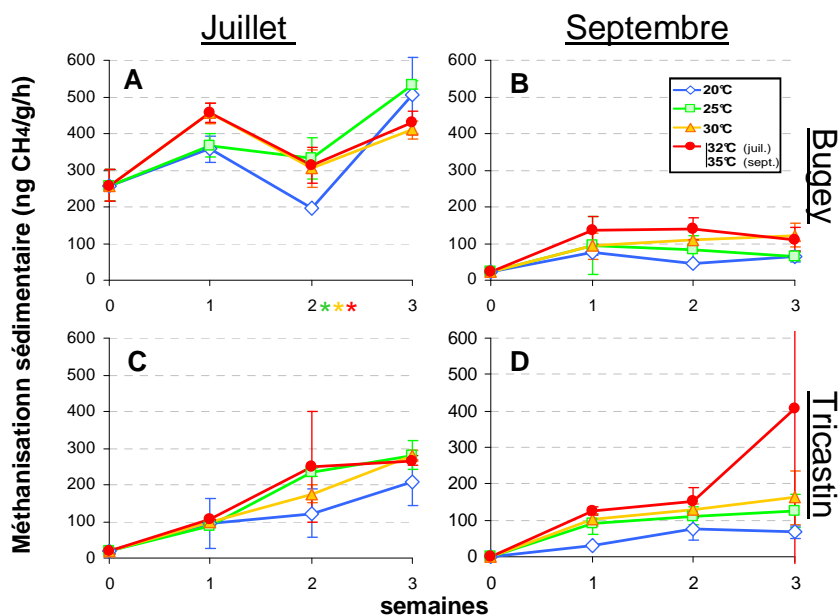
**Fig. 32.** Evolution de la production de N<sub>2</sub>O par dénitrification (ng N<sub>2</sub>O/g/h) par les sédiments dans les différentes expériences (voir Fig. 19 pour le détail de la légende).

Cette inhibition de l'activité dénitrifiante semble être principalement due à une réduction de l'abondance de la population dénitrifiante lorsque la température s'élève comme le montrent les résultats issus de la quantification du gène *nirK* dans les communautés sédimentaires (Fig. 33). En effet, une diminution significative du nombre de copies de gène *nirK* est observée en fin de suivi à partir de 30°C en juillet (Fig. 33A et 33C) et de 35°C en septembre (Fig. 33B et 33D) et ce quelle que soit l'origine des sédiments. Cependant la proportion de gènes *nirK*/ADNr16S, comprise entre 0,20% et 0,45% suivant les expériences, ne présente pas de variation significative en fonction du contexte thermique considéré (résultats non présentés).



**Fig. 33.** Abondance du gène NirK (nombre de copies/g) dans les communautés sédimentaires après 3 semaines dans les différentes expériences.

Contrairement à la dénitrification, la méthanisation semble être très peu influencée par les conditions thermiques dans les microcosmes (Fig. 34), puisque seul un effet positif transitoire de la température est observé en juillet sur les sédiments originaires de Bugey (Fig. 34A).



**Fig. 34.** Evolution de la production de CH<sub>4</sub> par méthanisation (ng CH<sub>4</sub>/g/h) par les sédiments dans les différentes expériences. (voir Fig. 19 pour le détail de la légende)

#### 4. Discussion et conclusions

L'objectif de cette étude était d'appréhender dans des systèmes contrôlés (microcosmes de laboratoire) les effets potentiels de hausses thermiques comparables à celles engendrées localement, en période estivale, par les rejets thermiques des CNPE du Rhône sur les communautés microbiennes de ce fleuve. Une des originalités de ce travail réside dans la prise en compte de deux compartiments microbiens (biofilm périphytique et sédiment) qui présentent des particularités et des rôles écologiques différents, en fonction notamment de la dominance de leur composante phototrophe (biofilms) ou hétérotrophe (sédiments). Afin d'avoir une vision assez large de l'effet potentiel des rejets thermiques dans le Rhône en période estivale, les effets ont été évalués à l'aide de différents paramètres permettant d'appréhender la structure et l'activité des communautés phototrophes (biofilms) et hétérotrophes (biofilms et sédiments), en tenant compte d'éventuelles différences spatiales (Haut-Rhône vs Bas-Rhône) et temporelles (juillet vs septembre).

Au niveau physico-chimique, les différences entre les deux sites s'expriment principalement au niveau de la température de l'eau (+3°C environ à Tricastin en juillet et en septembre), de la conductivité, et des teneurs en COD, nitrates et silice, significativement plus élevées dans le Bas-Rhône. Cependant, pour un site d'échantillonnage donné, les résultats mettent en évidence une stabilité temporelle assez forte pour la quasi totalité des paramètres physico-chimiques mesurés (à l'exception des concentrations en oxygène dissous), tant à l'échelle hebdomadaire pendant la durée de chaque expérience qu'à l'échelle saisonnière entre le début et la fin de l'été.

A l'opposé, l'analyse de la biomasse périphytique fait apparaître à la fois des variations spatiales (entre Bugey et Tricastin) et des variations saisonnières (entre juillet et septembre) au niveau du Haut-Rhône. Les concentrations en MSSC et en chl *a* fluctuent ainsi respectivement d'un facteur 15 (0,04-0,54 mg/cm<sup>2</sup>) et d'un facteur 12 (2,8-35,6 µg/cm<sup>2</sup>) en fonction de la date et de la station d'échantillonnage. Ces valeurs sont dans la gamme de celles observées sur la Garonne après 21 jours d'accrétion (biofilms matures) puisque les valeurs décrites dans le rapport GolFilm varient entre 0,12 et 0,38 mg/cm<sup>2</sup> pour la MSSC et entre 2,3 et 7,1 µg/cm<sup>2</sup> pour la chl *a* (Boulêtrau et al., 2010). L'étude réalisée dans le Rhône en aval du barrage de retenue de Pierre-Bénite par Fauvet et al. (2001), a également révélée des niveaux comparables de biomasse algale, avec des concentrations moyennes en chl *a* comprises entre 2,1 et 5,9 µg/cm<sup>2</sup> après 7 jours de colonisation sur des lames de verre déposées sur le lit du fleuve en période automnale (novembre 1994 et 1995).

Malgré les variations spatio-temporelles observées dans la présente étude au niveau de la biomasse périphytique, les résultats démontrent que la composition globale de la communauté photosynthétique périphytique (à l'échelle des principaux groupes algaux et des cyanobactéries) est assez constante pour tous les prélèvements, avec une dominance des cyanobactéries (55% à 68%) et une forte représentation des diatomées.

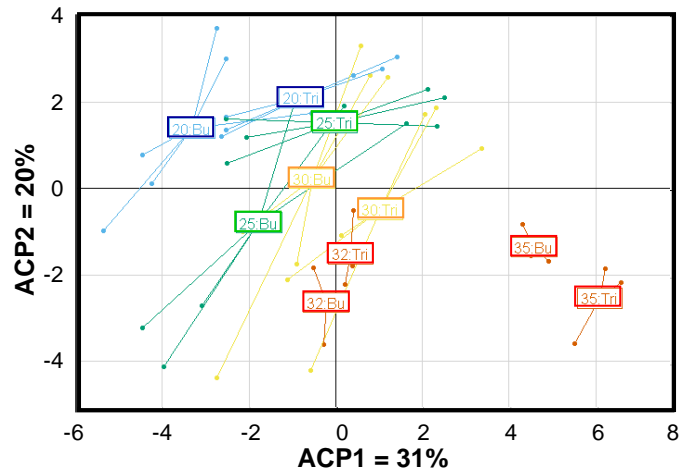
Au niveau des communautés périphytiques hétérotrophes (principalement des bactéries), les variations temporelles et spatiales sont visibles tant au niveau de la structure (profils génétiques) que des activités respiratoires et dénitrifiantes. Il est intéressant de constater que le potentiel moyen de dénitrification, compris entre 50 et 140  $\mu\text{g N}_2\text{O/g MSSC/h}$  est inférieur à celui observé avec des biofilms matures de la Garonne lors du projet GolFilm (production moyenne de 1157  $\mu\text{g N}_2\text{O/g MSSC/h}$  après 21 jours de croissance des biofilms, Boulêtreau et al., 2010). Cette différence s'explique notamment par un ratio plus faible de gènes *nirK* par rapport au nombre de gène ADNr 16S. Ce ratio était en effet compris entre 0,48% et 1,23% dans la Garonne (Boulêtreau et al., 2010), alors qu'il est inférieur à 0,25% dans le Rhône.

Cette proportion de gène *nirK* est également comparable au sein des communautés bactériennes sédimentaire (Fig. 15B) qui présentent pour la dénitrification et la respiration, des niveaux d'activités assez similaires entre le Haut-Rhône et le Bas-Rhône, tant en juillet qu'en septembre. Le travail réalisé par Garnier et al. (2007) en période estivale sur le bassin de la Seine montre que le potentiel de dénitrification s'accroît d'amont en aval, avec des valeurs de productions de  $\text{N}_2\text{O}$  plus élevées dans les grandes rivières dont les sédiments sont plus riches en matière organique. Cependant les niveaux de production de  $\text{N}_2\text{O}$  observés avec du sédiment prélevés en Basse-Seine, inférieurs à 400  $\text{ng N}_2\text{O/g/h}$  sont plus de dix fois inférieurs à ceux obtenus dans notre étude (4500  $\text{ng N}_2\text{O/g/h}$ ).

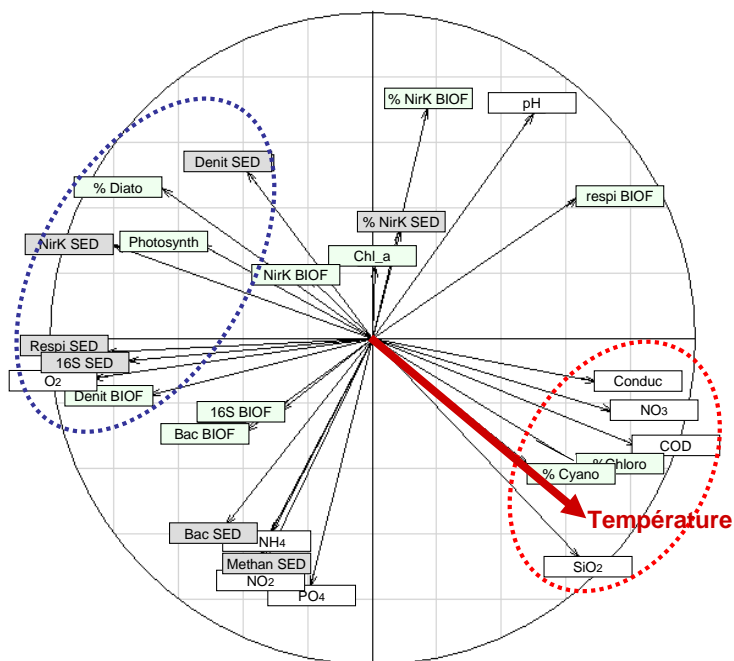
Dans notre étude, les plus fortes différences en terme d'activité sédimentaires sont observées pour la méthanisation, qui a une production moyenne de 258  $\text{ng CH}_4/\text{g/h}$  par les communautés sédimentaires prélevées à Bugey en juillet alors que cette production est très faible (<25  $\text{ng CH}_4/\text{g/h}$ ) voire non détectable avec les autres échantillons.

De manière globale, la caractérisation des conditions physico-chimiques de l'eau et des communautés microbiennes périphytiques et sédimentaires lors des prélèvements effectués en juillet et septembre sur les deux sites d'études a permis de révéler des différences notables entre les différents échantillons (§3.1), confirmant ainsi l'intérêt d'avoir réalisé deux séries d'expérimentations en microcosmes, en considérant pour chacune d'elle des communautés provenant de deux stations différentes. En effet, dans le contexte de notre étude, cela a ainsi permis de tester l'influence de la thermie dans des situations contrastées, offrant ainsi une vision plus large des effets potentiels d'une hausse thermique sur des communautés naturelles complexes.

Ainsi, si l'analyse, paramètre par paramètre, des effets associés aux différents niveaux de hausse thermique a mis en évidence une influence forte de la température sur les communautés périphytiques et sédimentaires, tant d'un point de vue structural que fonctionnel, les résultats ont montré que la réponse des communautés microbiennes est variable suivant le paramètre considéré, l'origine des échantillons et la date de l'expérience. Afin de s'affranchir de toutes ces variations inter-expériences, une ACP a été réalisée avec l'ensemble des paramètres physico-chimiques et microbiens mesurés à la fin de chaque suivi en microcosme et en regroupant tous les échantillons (quelle que soit l'origine et la date initiale d'échantillonnage) en fonction de la température testée (Fig. 35).



**Fig. 35.** Analyse en composantes principales (ACP) des données physico-chimiques et microbiennes mesurées après 3 semaines dans les quatre expériences en microcosmes (i.e. Bugey/Tricastin ; juillet/septembre). Les points illustrent la dispersion autour du barycentre représenté par l'étiquette qui indique la température testée pour chacune des stations.



**Fig. 36.** Cercle des corrélations obtenu par ACP avec toutes les données physico-chimiques (étiquettes blanches) et microbiennes (étiquettes vertes pour les biofilms et grises pour les sédiments) mesurées après 3 semaines dans les quatre expériences en microcosmes (i.e. Bugey/Tricastin ; juillet/septembre). Les regroupements en pointillés indiquent les paramètres principalement affectés positivement (rouge) ou négativement (bleu) par la hausse thermique. (la légende des étiquettes est fournie en annexe 3). La température a été projetée comme variable supplémentaire (non explicative)

Cette représentation graphique suivant les deux premiers axes de l'ACP, qui expliquent plus de 50% de la variance entre les échantillons, illustre très clairement la distinction des échantillons en fonction de la température considérée dans les microcosmes. Cette distinction se fait tant sur l'axe 1 (augmentation des coordonnées en abscisse quand la température s'élève) que sur l'axe 2 (diminution des coordonnées en ordonnée quand la température s'élève). La température représente donc un facteur de forçage majeur sur l'évolution des paramètres microbiens et physico-chimiques dans les microcosmes et ce, malgré les différences de caractéristiques des échantillons initiaux. Il est également à noter que la dispersion des points autour du barycentre est réduite à 32 et 35°C, ce qui confirme cet effet de forçage qui favorise nettement la convergence inter-site.

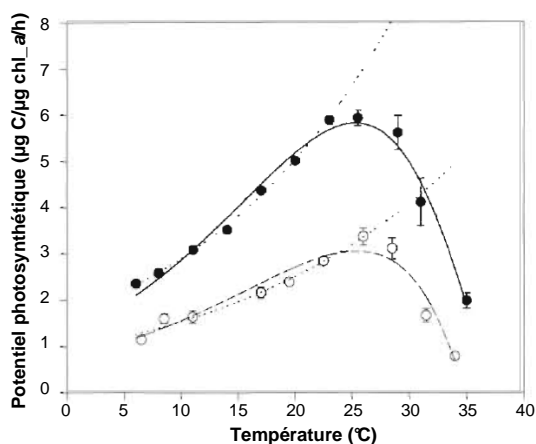
Sur cette représentation, il est intéressant de constater la spécificité très marquée des échantillons à 35°C. **Ainsi, il semblerait que le changement le plus net des conditions physico-chimiques et microbiennes soit induit entre 32°C et 35°C, pouvant traduire un effet de seuil.** Cette différence plus marquée à 35°C est notamment visible sur les ACP effectuées à partir des données physico-chimiques (Fig.16) ou des profils de diversité bactérienne obtenus par PCR-ARISA avec les communautés périphytiques (Fig. 24B et 24D) et sédimentaires (Fig. 30B et 30D). De même, plusieurs paramètres microbiens, tels que l'activité photosynthétique (Fig. 23), la dénitrification par le périphyton (Fig. 26) ou le sédiment (Fig. 32) et l'abondance et la proportion de gène *nirK* dans les communautés bactériennes périphytiques (Fig. 27 et 28), ne traduisent un effet statistiquement significatif de la hausse thermique qu'à partir du seuil de 35°C.

Cependant, il est indéniable au regard des résultats et des regroupements observés sur l'ACP (Fig. 35) que l'augmentation graduelle de 20°C à 32°C engendre également une évolution progressive des communautés microbiennes périphytiques et sédimentaires. Le cercle des corrélations obtenu à partir de cette ACP permet d'identifier les principaux paramètres favorisés ou au contraire affectés négativement par la hausse des températures (Fig. 36).

Au sein des biofilms périphytiques, la hausse thermique engendre ainsi un effet fort sur la structure des communautés en favorisant le développement des cyanobactéries et des chlorophycées, au détriment des diatomées. La diminution des diatomées a été associée à une diminution de la consommation en silice, composante principale des frustules diatomiques, engendrant une augmentation significative des concentrations de ce composé aux plus fortes températures. La prolifération de cyanobactéries lors de fortes augmentations de température est généralement observée dans des communautés phytoplanctoniques (ex. Chu et al., 2007 ; Jöhnk et al., 2008), et ce type de remaniement a également été décrit dans des plusieurs études visant à évaluer les effets de hausses thermiques sur les communautés phototrophes benthiques (Blanchard et al., 1996 ; Marcarelli et Wurtsbaugh, 2006 ; Villanueva et al., 2011). Cependant, dans notre étude, les résultats ne préjugent pas du risque potentiel lié au développement de cyanobactéries, puisque les analyses effectuées ne permettent ni d'identifier les espèces en place, ni de détecter la présence éventuelle de cyanotoxines. De plus, les remaniements observés n'engendrent pas de conséquence notable sur la biomasse phototrophe totale, suggérant ainsi des processus de remplacements d'espèces suite au développement des taxons les plus adaptés aux fortes températures comme cela a déjà été observée par Marcarelli et Wurtsbaugh (2006) et Villanueva et al. (2011).

D'un point de vue fonctionnel, la hausse thermique entraîne une inhibition du potentiel photosynthétique mais celle-ci n'est détectable qu'à 35°C. Ce résultat suggère que la gamme de températures comprises entre 20°C et 32°C correspondrait à l'optimum thermique pour l'activité photosynthétique des communautés étudiées et qu'une augmentation au delà de ce seuil induit une diminution des capacités fonctionnelles des organismes phototrophes. Cette hypothèse semble cohérente au regard des travaux de Blanchard et al. (1996), qui ont mis en évidence un optimum

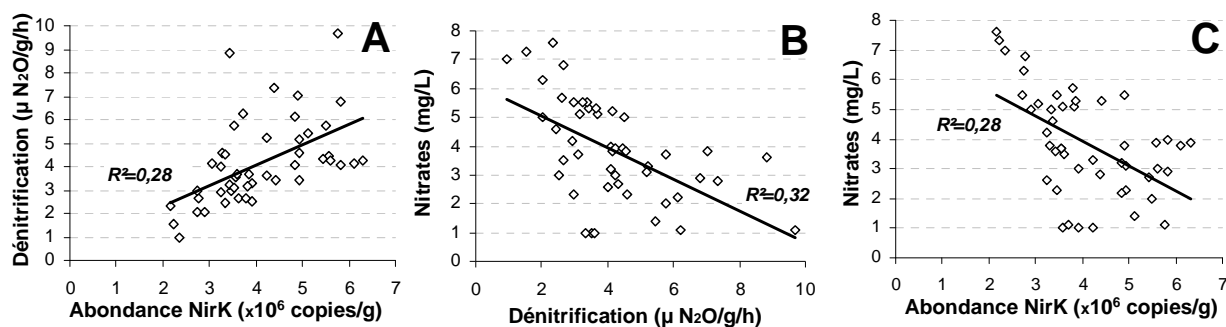
thermique autour de 25°C pour le potentiel photosynthétique de communauté phytobenthiques prélevées dans la baie de Marennes-Oléron (Charente-Maritime), avec une forte inhibition de cette activité lorsque la température dépasse les 30°C, et ce, quelle que soit la période de prélèvement des échantillons (septembre ou décembre ; Fig. 37).



**Fig. 37.** Corrélation entre la température et le potentiel photosynthétique de communautés phytobenthiques prélevées dans la baie de Marennes-Oléron en septembre 1995 (cercles noirs) et décembre 1995 (cercles blancs). D'après Blanchard et al., 1996

L'activité potentielle de dénitrification par les biofilms est également affectée négativement par la hausse thermique mais ces effets restent limités du fait du niveau très faible de cette activité dans le compartiment périphytique. Par contre, ces effets sur l'activité dénitrifiante sont beaucoup plus visibles dans le sédiment. Cela s'explique notamment par une diminution significative de l'abondance de gènes *nirK* dans la communauté sédimentaire à partir de 30°C ou de 32°C.

En effet, il est intéressant de constater qu'il existe dans les différents microcosmes une corrélation positive significative ( $p < 0,05$ ) entre l'abondance de gènes *nirK* et le potentiel de dénitrification des sédiments (Fig. 38A) et que les concentrations en nitrates dans l'eau sont négativement corrélées ( $p < 0,05$ ) au potentiel de dénitrification des sédiments (Fig. 38B) et à l'abondance de gènes *nirK* dans ce compartiment (Fig. 38C). Ces observations montrent que l'effet de la température a été perceptible à différents niveaux, et suggèrent donc un lien fort entre le potentiel génétique, le potentiel fonctionnel et l'activité réelle dans les microcosmes pour le processus de dénitrification par les communautés sédimentaires.



**Fig. 38.** Corrélations deux à deux ( $p < 0,05$ ) observées après 3 semaines dans tous les microcosmes entre l'abondance de gènes *NirK* dans les sédiments, le potentiel de dénitrification des sédiments et les concentrations en nitrates dans l'eau.



Aux températures supérieures à 30°C, il est également observé une diminution significative du nombre de copies du gène ADNr 16S dans les communautés sédimentaires, traduisant ainsi une diminution de l'abondance bactérienne dans ce compartiment.

## 5. Conclusion synthétique

L'objectif de cette étude était d'évaluer les effets potentiels d'une augmentation de température en période estivale, sur les processus et la dynamique des communautés benthiques (périphytiques et sédimentaires) du Rhône. Les essais conduits dans des microcosmes de laboratoire, ont ainsi permis de simuler un échauffement des eaux (jusqu'à +16°C par rapport à l'eau du milieu lors du prélèvement initial) en testant l'effet de températures finales de 20°C jusqu'à 35°C.

Les résultats obtenus ont montré une incidence significative de la thermie, à la fois sur la physico-chimie mais aussi sur les communautés phototrophes (algues et cyanobactéries) et bactériennes, tant au niveau de leur structure que de leur potentiel fonctionnel (diminution des capacités de photosynthèse, de respiration et de dénitrification, augmentation des capacités de méthanisation). Cependant, les variations ont été très variables suivant l'origine et la période de prélèvement des communautés microbiennes. De plus, la plupart des effets significatifs n'ont été observés qu'à partir de températures supérieures ou égales à 30°C (i.e. 30°C, 32°C et 35°C), traduisant un possible effet de seuils thermiques à partir desquels des modifications structurales et fonctionnelles du compartiment microbien benthique peuvent être détectés, surtout lorsque la température atteint 35°C.

## 6. Références

- Berggren M, Laudon H, Jonsson A, Jansson M, 2010. Nutrient constraints on metabolism affect the temperature regulation of aquatic bacterial growth efficiency. *Microb Ecol* 60, 894-902.
- Bianchi M, Bonin P, Feliatra, 1994. Bacterial nitrification and denitrification rates in the Rhône River plume (northwestern Mediterranean Sea). *Mar Ecol Prog Ser* 103, 197-202.
- Blanchard GF, Guarini JM, Richard P, Gros P, Mornet F, 1996. Quantifying the short-term temperature effect on light-saturated photosynthesis of intertidal microphytobenthos. *Mar Ecol Prog Ser* 134, 309-313.
- Boulêtreau S, Dubois S, Salvo E, Lyautey E, Compin A, Dalger D, Garabetian F, Mastrorillo S, 2010. Influence de la température sur les communautés microbiennes aquatiques: Cas des biofilms de rivière et du centre nucléaire de production d'électricité de Golfech. Programme GolFilm 2008 – 2010. Contrat de collaboration EDF/CNRS. Rapport final, 58 p.
- Boulêtreau S, Salvo E, Lyautey E, Mastrorillo S, Garabetian F, 2012. Temperature dependence of denitrification in phototrophic river biofilms. *Sci Total Environ*. 416, 323-328.
- Christaki U, Courties C, Joux F, Jeffrey WH, Neveux J, Naudin JJ, 2009. Community structure and trophic role of ciliates and heterotrophic nanoflagellates in Rhone River diluted mesoscale structures (NW Mediterranean Sea). *Aquat Microb Ecol* 57, 263-277.
- Chu Z, Jin X, Iwami N, Inamori Y, 2007. The effect of temperature on growth characteristics and competitions of *Microcystis aeruginosa* and *Oscillatoria mougeotii* in a shallow, eutrophic lake simulator system. *Hydrobiologia* 581, 217-223.
- Claret C, Fontvieille D, 1997. characteristics of biofilm assemblages in two contrasted hydrodynamic and trophic contexts. *Microb Ecol* 34, 49-57.
- Claret C, Marmonier P, Bravard JP, 1998. Seasonal dynamics of nutrient and biofilm in interstitial habitats of two contrasting riffles in a regulated large river. *Aquat Sci* 60, 33-55.

- Demars BOL, Manson JR, Ólafsson JS, Gislason GM, Gudmundsdottir R, Woodward G, Reiss J, Pichler DE, Rasmussen JJ, Friberg N, 2011. Temperature and the metabolic balance of streams. *Freshwater Biol* 56, 1017-1230.
- Duhamel S, Jacquet S, 2006. Flow cytometric analysis of bacteria- and virus-like particles in lake sediments. *J Microbiol Meth* 64, 316-332.
- Fauvet G, Claret C, Marmonier P, 2001. Influence of benthic and interstitial processes on nutrient changes along a regulated reach of a large river (Rhône River, France). *Hydrobiologia* 445, 121-131.
- Fruget JF, Centofanti M, Dessaix J, Olivier JM, Druart JC, Martinez PJ, 2001. Temporal and spatial dynamics in large rivers: example of a long-term monitoring of the middle Rhône River. *Ann Limnol* 37, 237-251.
- Garnier J, Mounier E, Martinez A, Laverman A, Martin J, Cremer C, Sebilo M, Lot K, Billen G, Silvestre M, Amsaleg C, Herbal M, Vilain G, Chollet J, 2007. Facteurs de contrôle de la production de N<sub>2</sub>O par dénitrification. Bilans des émissions à l'échelle du bassin. Programme Interdisciplinaire de Recherche sur l'Environnement de la Seine (PIREN Seine) Rapport d'activités, 23 p ;
- Henry S, Beaudoin E, Lopez-Gutiérrez JC, Martin-Laurent F, Brauman A, Philippot L, 2004. Quantification of denitrifying bacteria in soils by nirK gene targeted real-time PCR. *J Microbiol Meth* 59, 327-335.
- Hewson I, Fuhrman JA, 2004. Richness and diversity of bacterioplankton species along an estuarine gradient in Moreton Bay, Australia. *Appl Environ Microbiol* 70, 3425-3433.
- Jöhnk KD, Huisman J, Sharples J, Sommeijer B, Visser PM, Stroom JM, 2008. Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria. *Global Change Biol* 14, 495-512.
- Joux F, Jeffrey WH, Abboudi M, Pujo-Pay M, Oriol L, Neveux J, Naudin JJ, 2009. Ultraviolet radiation in the Rhône lenses of low salinity and marine waters of the northwestern Mediterranean Sea: attenuation and effects on bacterial production and net community production. *Photochem Photobiol* 85, 783-793.
- Khalanski M, Carrel G, Desaint B, Fruget JF, Olivier JM, Poirel A, Souchon Y, 2008. Global thermal study of the Rhone – Hydrobiological impact of cumulative warming. *Hydroécol Appl* 16, 53-108.
- Marcarelli AM, Wurtsbaugh A, 2006. Temperature and nutrient supply interact to control nitrogen fixation in oligotrophic streams: An experimental examination. *Limnol. Oceanogr.* 51, 2278-2289
- Muyzer G, Hottentrager S, Teske A, Waver C, 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA. A new molecular approach to analyze the genetic diversity of mixed microbial communities. *In Akkermans ADL, van Elsas JD, de Bruijn FJ (ed.), Molecular microbial ecology manual.* Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, The Netherlands.
- Naudin JJ, Cauwet G, Fajon C, Oriol L, Terzić S, Devenon JL, Broche P, 2001. Effect of mixing on microbial communities in the Rhone River plume. *J Marine Syst* 28, 203-227.
- Netto M, 2007. Scénarios de gestion de boues de dragage de cours d'eau : Rôle des bactéries dans la mobilité des polluants métalliques. Thèse, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, 312 p.
- Omnes P, Slawyk G, Garcia N, Bonin P, 1996. Evidence of denitrification and nitrate ammonification in the River Rhone plume (northwestern Mediterranean Sea). *Mar Ecol Prog Ser* 141, 275-281.
- Pujo-Pay M, Conan P, Joux F, Oriol L, Naudin JJ, Cauwet G, 2006. Impact of phytoplankton and bacterial production on nutrient and DOM uptake in the Rhône River plume (NW Mediterranean). *Mar Ecol Prog Ser* 315, 43-54.
- Pesce S, Lambert AS, Neyra M, Montuelle B, 2013. Influence de la thermie sur les communautés microbiennes aquatiques, Rapport Irstea-INRA, Programme Microtherm (Etude Thermique du Rhône, Phase 4), 23 p.
- Ranjard L, Poly F, Lata JC, Mougél C, Thioulouse J, Nazaret S, 2001. Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. *Appl Environ Microbiol* 67, 4479-4487.
- Schmitt-Jansen, M., Altenburger, R., 2008. Community-level microalgal toxicity assessment by multiwavelength-excitation PAM fluorometry. *Aquat. Toxicol.* 86, 49-58.
- Sime-Ngando T, Colombet J, Personnic S, Domaizon I, Dorigo U, Perney P, Hustache JC, Viollier E, Jacquet S, 2008. Short-term variations in abundances and potential activities of viruses, bacteria and nanoprotoists in Lake Bourget. *Ecol Res* 23, 851-861.

- Tlili A, Corcoll N, Bonet B, Morin S, Montuelle B, Bérard A, Guasch H, 2011. In situ spatio-temporal changes in pollution-induced community tolerance to zinc in autotrophic and heterotrophic biofilm communities. *Ecotoxicology* 20, 1823-1839.
- Troussellier M, Schäfer H, Batailler N, Bernard L, Courties C, Lebaron P, Muyzer G, Servais P, Vives-Rego J, 2002. Bacterial activity and genetic richness along an estuarine gradient (Rhône River plume, France) *Aquat Microb Ecol* 28, 13-24.
- Veraart AJ, de Klein JJM, Scheffer M, 2011. Warming can boost denitrification disproportionately due to altered oxygen dynamics. *PLoS ONE* 6, e18508
- Villanueva VD, Font J, Schwartz T, Romani AM, 2011. Biofilm formation at warming temperature: acceleration of microbial colonization and microbial interactive effects. *Biofouling* 27, 59-71.
- Yvon-Durocher G, Jones JJ, Trimmer M, Woodward G, Montoya JM, 2010. Warming alters the metabolic balance of ecosystems. *Phil Trans R Soc B* 365, 2117-2126.

## Annexes

Annexe 1 : Caractéristiques physico-chimiques dans l'eau du Rhône et dans les microcosmes (une semaine après chaque renouvellement d'eau) lors du suivi réalisé en juillet 2012.

			Temp. °C	pH	conductivité µS/cm	Oxygène mg/L	COD mg/L	NO3 mg/L	NO2 mg/L	NH4 mg/L	PO4 mg/L	SiO2 mg/L	
BUGEY	T0	10 juillet	Rhône	18,9	8,1 0,1	306,2 2,9	5,96 0,64	1,73 0,13	2,38 0,05	0,07 0,01	0,04 0,01	0,19 0,01	0,90 0,00
		Rhône	18,4	8,0 0,1	323,1 3,7	8,09 0,47	1,73 0,05	3,28 0,10	0,05 0,01	0,04 0,01	0,04 0,01	1,75 0,47	
		20°C		8,3 0,0	320,3 1,5	7,90 0,20	2,17 0,12	2,23 0,55	0,02 0,00	0,02 0,00	0,05 0,00	0,05 0,02	3,63 1,02
	T1	17 juillet	25°C		8,6 0,1	338,7 1,5	7,35 0,08	2,15 0,05	1,60 0,10	0,02 0,01	0,02 0,01	0,13 0,01	5,87 0,38
		30°C			9,1 0,6	386,7 4,0	6,85 0,10	2,37 0,10	2,23 0,32	0,03 0,01	0,02 0,00	0,14 0,05	6,47 1,62
		35°C			8,9 0,0	377,7 3,2	6,61 0,10	2,55 0,18	1,83 0,23	0,03 0,01	0,02 0,01	0,16 0,04	9,03 0,25
	T2	24 juillet	Rhône	19,0	8,0 0,1	307,2 4,1	9,37 0,39	1,75 0,16	2,90 0,08	0,03 0,02	0,07 0,04	0,13 0,06	1,25 0,31
		20°C			8,1 0,0	335,3 1,5	7,65 0,15	1,72 0,16	2,90 0,36	0,02 0,00	0,02 0,00	0,06 0,04	2,87 1,08
		25°C			8,1 0,0	356,7 1,5	7,06 0,16	1,98 0,08	2,57 0,31	0,02 0,01	0,03 0,01	0,19 0,06	5,13 0,35
	T3	31 juillet	30°C		7,3 0,0	379,0 6,1	6,63 0,36	2,42 0,10	2,63 1,08	0,02 0,00	0,02 0,00	0,15 0,08	5,97 1,61
		35°C			8,1 0,0	394,3 0,6	6,23 0,23	2,50 0,26	3,37 0,40	0,03 0,01	0,02 0,00	0,24 0,05	7,57 0,83
		20°C			8,1 0,0	313,0 6,6	10,74 0,04	1,55 0,05	1,90 0,46	0,03 0,01	0,03 0,01	0,09 0,07	0,93 0,67
TRICASTIN	T0	10 juillet	Rhône	22,6	8,3 0,0	380,7 4,1	6,19 0,54	2,26 0,13	5,08 0,17	0,04 0,00	0,04 0,01	0,16 0,01	3,13 0,05
		Rhône	21,9	8,2 0,0	385,0 2,0	7,65 0,32	2,13 0,05	4,65 0,06	0,02 0,00	0,02 0,00	0,08 0,01	3,33 0,21	
		20°C		8,3 0,0	388,7 1,2	8,33 0,22	2,47 0,03	4,17 0,15	0,02 0,00	0,02 0,00	0,07 0,02	4,77 0,68	
T1	17 juillet	25°C		8,5 0,2	405,0 2,6	7,55 0,02	2,38 0,03	3,43 0,21	0,02 0,00	0,02 0,00	0,10 0,02	7,23 0,58	
	30°C			9,2 0,0	436,3 3,5	6,95 0,17	2,73 0,12	4,17 0,51	0,02 0,00	0,02 0,01	0,13 0,03	7,30 0,70	
	35°C			8,9 0,1	436,3 4,9	6,83 0,09	2,78 0,03	3,40 1,47	0,03 0,01	0,02 0,00	0,14 0,04	9,33 0,59	
T2	24 juillet	Rhône	21,1	8,3 0,0	349,3 2,8	7,57 0,28	2,05 0,17	4,95 0,10	0,02 0,00	0,07 0,03	0,15 0,02	3,35 0,13	
	20°C			8,1 0,1	394,7 5,5	7,83 0,17	2,10 0,10	4,57 0,38	0,02 0,00	0,02 0,00	0,09 0,01	4,53 0,64	
	25°C			8,2 0,0	403,0 0,0	7,37 0,07	2,12 0,08	2,50 0,36	0,02 0,00	0,02 0,00	0,07 0,01	4,23 1,10	
T3	31 juillet	30°C		8,1 0,0	440,3 6,7	6,70 0,01	2,50 0,09	3,73 0,15	0,03 0,01	0,02 0,01	0,20 0,09	6,33 0,68	
	35°C			8,1 0,0	432,0 8,0	6,63 0,16	2,48 0,03	3,60 0,56	0,02 0,00	0,02 0,00	0,13 0,04	6,87 0,55	
	20°C			8,1 0,0	407,3 0,6	10,71 0,06	1,90 0,05	3,90 0,10	0,02 0,00	0,02 0,00	0,05 0,04	2,50 0,52	
T3	31 juillet	25°C		8,1 0,0	398,0 11,5	9,47 0,16	1,90 0,09	3,20 0,62	0,02 0,01	0,02 0,01	0,07 0,05	0,97 0,67	
	30°C			8,0 0,1	458,0 8,5	8,28 0,13	2,38 0,16	5,30 0,20	0,05 0,03	0,03 0,01	0,33 0,05	5,30 0,72	
	35°C			8,0 0,0	441,0 20,7	7,90 0,20	2,38 0,03	4,77 0,95	0,04 0,03	0,03 0,01	0,14 0,04	5,10 0,87	

Annexe 2 : Caractéristiques physico-chimiques dans l'eau du Rhône et dans les microcosmes (une semaine après chaque renouvellement d'eau) lors du suivi réalisé en septembre 2012.

		Temp. °C	pH	conductivité µS/cm	Oxygène mg/L	COD mg/L	NO3 mg/L	NO2 mg/L	NH4 mg/L	PO4 mg/L	SiO2 mg/L												
BUGEY	T0	Rhône	21,1	8,2	0,1	304,6	5,3	8,08	0,64	2,00	0,24	2,50	0,20	0,05	0,01	0,10	0,04	0,06	0,01	1,40	0,11		
		Rhône	17,3	8,1	0,0	291,0	6,1	6,58	0,24	1,95	0,31	2,50	0,30	0,04	0,01	0,03	0,01	0,06	0,03	1,70	0,25		
		20°C		7,8	0,3	316,7	2,5	9,96	0,21	1,78	0,03	2,80	0,10	0,02	0,00	0,02	0,00	0,03	0,00	1,13	0,06		
	T1	25°C		7,6	0,0	333,3	4,0	8,61	0,16	1,97	0,08	4,23	0,21	0,04	0,02	0,02	0,00	0,04	0,01	0,04	0,01	2,47	0,25
		30°C		7,4	0,1	355,3	1,5	7,88	0,20	2,32	0,08	4,00	0,17	0,06	0,03	0,02	0,01	0,02	0,01	0,04	0,02	2,53	0,32
		35°C		7,4	0,1	399,0	4,4	5,13	0,13	2,88	0,10	5,77	0,76	0,26	0,13	0,02	0,01	0,22	0,02	6,07	0,85		
	T2	Rhône	17,7	7,6	0,1	296,9	2,5	6,71	0,49	1,50	0,12	2,40	0,28	0,03	0,00	0,04	0,01	0,05	0,02	1,30	0,16		
		20°C		7,7	0,4	297,0	1,0	6,07	0,11	2,12	0,08	2,13	0,51	0,02	0,00	0,02	0,00	0,03	0,00	1,10	0,44		
		25°C		7,4	0,0	320,7	3,5	5,51	0,07	2,28	0,03	5,20	0,52	0,02	0,00	0,02	0,00	0,09	0,01	3,60	0,00		
	T3	30°C		7,7	0,1	309,0	19,3	5,41	0,07	2,50	0,00	2,97	0,81	0,02	0,00	0,02	0,00	0,04	0,01	2,07	0,68		
		35°C		7,7	0,1	383,7	8,6	5,29	0,39	2,97	0,08	6,90	0,78	0,03	0,01	0,02	0,00	0,25	0,03	7,50	0,90		
		20°C		8,3	0,0	315,0	7,0	7,50	0,20	1,88	0,03	1,80	0,75	0,02	0,00	0,02	0,00	0,03	0,00	0,70	0,52		
T0	25°C		8,2	0,1	326,0	2,0	6,33	0,38	2,02	0,08	3,77	0,85	0,02	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00	0,07	0,03	2,93	0,60	
	30°C		8,2	0,1	347,7	23,3	6,30	0,00	2,27	0,06	2,03	0,86	0,02	0,00	0,02	0,00	0,03	0,00	2,33	1,06			
	35°C		8,3	0,0	410,7	5,5	5,30	0,00	2,60	0,00	6,03	0,93	0,02	0,00	0,03	0,01	0,22	0,06	6,23	0,42			
TRICASTIN	T0	Rhône	23,4	8,3	0,0	459,0	3,0	8,14	0,37	2,25	0,18	4,35	0,08	0,07	0,01	0,09	0,04	0,09	0,05	3,55	0,57		
		Rhône	21,1	8,3	0,0	434,8	4,9	5,77	0,37	2,00	0,16	4,60	0,17	0,05	0,00	0,05	0,03	0,17	0,08	3,20	0,26		
		20°C		7,5	0,2	463,7	1,5	9,70	0,35	2,20	0,05	3,83	0,12	0,02	0,00	0,02	0,00	0,03	0,00	3,80	0,20		
	T1	25°C		8,8	0,0	487,3	4,5	8,93	0,23	2,27	0,06	4,23	0,15	0,02	0,00	0,02	0,00	0,05	0,01	4,33	0,38		
		30°C		7,5	0,2	518,0	1,0	8,07	0,15	2,52	0,06	4,43	0,35	0,02	0,00	0,02	0,01	0,08	0,02	5,87	0,21		
		35°C		7,5	0,2	551,7	4,6	5,31	0,04	2,97	0,08	5,37	0,21	0,07	0,01	0,02	0,00	0,09	0,01	8,10	0,26		
	T2	Rhône	20,7	7,9	0,1	444,6	4,8	5,86	0,26	2,20	0,21	5,00	0,40	0,04	0,01	0,03	0,00	0,12	0,05	3,20	0,51		
		20°C		7,7	0,4	439,3	4,6	6,02	0,05	2,10	0,05	3,90	0,26	0,02	0,00	0,02	0,00	0,04	0,01	2,73	0,32		
		25°C		8,1	0,0	464,0	5,3	5,56	0,06	2,07	0,06	4,93	0,06	0,02	0,00	0,02	0,00	0,07	0,00	4,50	0,17		
	T3	30°C		7,8	0,1	482,3	9,3	5,29	0,14	2,20	0,10	4,47	0,21	0,02	0,00	0,02	0,00	0,05	0,02	3,73	0,57		
		35°C		7,7	0,1	540,0	3,5	5,04	0,05	2,65	0,05	6,47	0,25	0,03	0,01	0,02	0,00	0,11	0,00	8,00	0,53		
		20°C		8,4	0,0	437,3	1,5	7,47	0,26	2,10	0,10	3,70	0,10	0,02	0,00	0,02	0,00	0,03	0,01	1,17	0,23		
T0	25°C		8,4	0,0	477,0	5,6	6,47	0,12	2,23	0,08	5,40	0,26	0,02	0,00	0,02	0,00	0,07	0,01	4,50	0,44			
	30°C		8,3	0,0	473,7	20,2	6,07	0,06	2,35	0,09	4,90	0,66	0,02	0,00	0,02	0,00	0,03	0,01	3,77	1,32			
	35°C		8,3	0,0	528,3	7,0	5,43	0,06	2,77	0,06	7,30	0,30	0,02	0,01	0,02	0,00	0,07	0,01	7,70	0,10			

Annexe 3 : Légende des étiquettes utilisées dans la Fig. 36

**Biofilms périphytiques:**

% NirK BIOF : Proportion relative de copies du gène *nirK* (par rapport aux copies du gène ADNr 16S)

NirK BIOF: Nombre de copies du gène *nirK* (par cm<sup>2</sup>)

Respi BIOF : Respiration

Denit BIOF: Dénitrification

Photosynth: Photosynthèse

Chl\_a : Chlorophylle *a*

% Diato : Proportion relative des diatomées dans la communauté phototrophe

% Cyano: Proportion relative des cyanobactéries dans la communauté phototrophe

% Chloro : Proportion relative des chlorophycées dans la communauté phototrophe

16S BIOF: Nombre de copies du gène ADNr 16S (par cm<sup>2</sup>)

Bac BIOF: Densité bactérienne (estimée par cytométrie en flux)

**Sédiments:**

% NirK SED : Proportion relative de copies du gène *nirK* (par rapport aux copies du gène ADNr 16S)

NirK SED: Nombre de copies du gène *nirK* (par cm<sup>2</sup>)

Respi SED : Respiration

Denit SED: Dénitrification

Methan SED : Méthanisation

16S SED: Nombre de copies du gène ADNr 16S (par g)

Bac SED: Densité bactérienne (estimée par cytométrie en flux)

Annexe 4 : Synthèse bibliographique concernant les effets connus de la thermie sur les communautés microbiennes aquatiques

Pesce S, Lambert AS, Neyra M, Montuelle B, 2013. Influence de la thermie sur les communautés microbiennes aquatiques, Rapport Irstea-INRA, Programme Microtherm (Etude Thermique du Rhône, Phase 4), 23 p.

## **Programme Microtherm**

# **Influence de la thermie sur les communautés microbiennes des eaux de surface**

## **Rapport bibliographique**

S. Pesce<sup>1</sup>, A.S. Lambert<sup>1,2</sup>, M. Neyra<sup>1</sup>, B. Montuelle<sup>2</sup>

1. Irstea, UR MALY, Lyon, France

2. INRA, UMR CARTEL, Thonon-les-bains, France



## Sommaire

	<b>page</b>
<b>1. Introduction</b>	<b>1</b>
<b>2. Effets de la température sur la structure et la diversité des communautés microbiennes aquatiques</b>	<b>2</b>
2.1. Croissance et biomasse des communautés phototrophes	2
2.2. Diversité des communautés phototrophes	3
2.3. Croissance et biomasse des communautés hétérotrophes	4
2.4. Diversité des communautés hétérotrophes	5
<b>3. Effets de la température sur les activités microbiennes en milieu aquatique</b>	<b>7</b>
3.1. Photosynthèse	7
3.2. Respiration	9
3.3. Recyclage de la matière organique	10
3.4. Activités liées au cycle de l'azote	12
<b>4. Effets de la température sur les interactions trophiques impliquant les communautés microbiennes</b>	<b>13</b>
<b>5. Observations sur des rejets thermiques localisés</b>	<b>14</b>
<b>6. Le cas particulier du fleuve Rhône</b>	<b>15</b>
<b>7. Conclusions</b>	<b>17</b>
<b>8. Références bibliographiques</b>	<b>18</b>

## **1. Introduction**

Avec une augmentation moyenne des températures de près de 1°C au cours des 100 dernières années, notre planète est soumise à des modifications climatiques rapides et importantes (Acuña et al., 2008). Cette évolution tend à s'accélérer et différents scénarios prédisent par exemple une augmentation supérieure à 0,2°C tous les 10 ans au cours des prochaines décennies, pouvant conduire à une hausse de 2 à 4,5°C d'ici 2100 (IPCC, 2007). S'ajoutent également à cette augmentation moyenne et généralisée, le risque de réchauffement plus localisés dans les zones des rejets thermiques engendrés par des installations industrielles, en particulier celles de production électrique.

Depuis plusieurs années, de nombreux travaux ont mis en évidence la vulnérabilité des écosystèmes aquatiques face au réchauffement climatique (ex. Meyer et al., 1999; Moss et al., 2009; Wilby et al., 2010). Celui-ci peut notamment entraîner une hausse de la température des eaux de surface, engendrant alors un impact biologique direct sur les communautés aquatiques, tant au niveau de la biodiversité que des capacités métaboliques des organismes, avec le risque d'altérer à terme le fonctionnement des écosystèmes (Wilby, 2008) et augmenter les risques sanitaires liés à la présence d'organismes pathogènes (De Toni et al., 2009). Les effets potentiels d'une telle hausse ont ainsi été rapportés pour différents compartiments biologiques tels que les macroinvertébrés (Durance et Ormerod, 2007), les amphibiens (Araújo et al., 2006), les macrophytes (Franklin et al., 2008) ou les poissons (Graham et Harrod, 2009). Le réchauffement des eaux peut également engendrer des décalages saisonniers susceptibles d'impacter les communautés biologiques en entraînant des modifications dans leur cycle de vie en réponse par exemple à la précocité des conditions printanières en milieu océanique (Edwards et Richardson, 2004) ou de la stratification thermique en milieu lacustre (Thackeray et al. 2008).

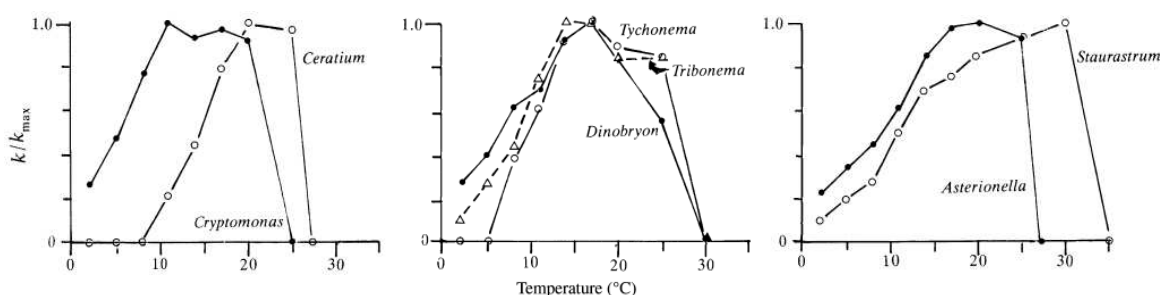
Les communautés microbiennes ont un rôle écologique majeur dans les systèmes aquatiques puisqu'elles interviennent de manière prépondérante dans les cycles biogéochimiques en contribuant notamment à la production primaire, la dégradation de la matière organique et le recyclage des nutriments. Si ce rôle est partiellement contrôlé par la structure des milieux aquatiques (dépendant de la nature des substrats, hauteurs d'eau, turbidité, hydraulité et variations/courantologie), de nombreux travaux ont montré que ces communautés sont fortement influencées par les conditions thermiques de l'environnement. Cependant, ces travaux concernent principalement le milieu terrestre, comme en attestent de récents articles de synthèse (Davidson et Janssens, 2006; Singh et al., 2010). Si elles sont plus limitées, les connaissances concernant la réponse des microorganismes aquatiques à des variations thermiques révèlent toutefois les effets potentiels de ce type de stress sur les communautés microbiennes phototrophes et hétérotrophes dans les eaux de surface. L'objectif de cette synthèse est donc de répertorier les études à ce sujet et décrire les principaux résultats disponibles actuellement.

## 2. Effets de la température sur la structure et la diversité des communautés microbiennes aquatiques

### 2.1. Croissance et biomasse des communautés phototrophes

De nombreux travaux, réalisés à partir de cultures algales, ont mis en évidence que le taux maximal de croissance est propre à chaque espèce et est conditionné par différents paramètres environnementaux. Parmi ces paramètres, les plus importants sont les conditions nutritives, lumineuses et thermiques, ces trois facteurs présentant généralement de fortes interactions (ex. Dauta et al., 1990 ; Bouterfas et al., 2002; Butterwick et al., 2005).

En fonction des conditions nutritives et lumineuses, il est donc possible, pour chaque espèce algale, de déterminer les conditions thermiques optimales, celles-ci pouvant être très variables (Fig. 1).



*Figure 1 : Influence de la température sur le taux de croissance (k) de 7 espèces phytoplanctoniques (Asterionella formosa; Ceratium furcoides ; Cryptomonas marssonii; Dinobryon divergens; Staurastrum cingulum; Tribonema sp.; Tychonema bourrellyi) ; d'après Butterwick et al. (2005)*

L'une des mesures quantitatives la plus couramment utilisée pour décrire l'effet de la température sur les activités biologiques (ex. croissance, photosynthèse, respiration...) est celle du coefficient thermique (ou  $Q_{10}$ , Van't Hoff 1898 ; voir équation ci-dessous) qui permet de mesurer le niveau de stimulation d'une activité métabolique  $R_T$  pour une augmentation de 10°C, et dans une gamme de température comprise entre  $T_0$  (référence) et  $T$ .

$$R_T = R_{T_0} Q_{10}^{\left(\frac{T-T_0}{10}\right)}$$

En fonction des optimums thermiques, le  $Q_{10}$  varie suivant la gamme de températures testée. Ainsi Berges et al. (2002) ont mesuré sur une espèce diatomique marine (*Thalassiosira pseudonana*) un  $Q_{10}$  (pour le taux de croissance) proche de 3,1 pour une hausse de 8 à 17°C alors qu'il est beaucoup plus faible (~1,2) pour une hausse de 17 à 25°C. Richardson et al. (2000) ont observé une valeur de  $Q_{10}$  inférieur à 1 chez une espèce diatomique hivernale (*Aulacoseira baicalensis*) isolée d'un lac Sibérien et soumise à un gradient de température de 2 à 11°C. Vona et al. (2004) ont également mis en évidence une forte baisse de croissance chez des espèces phytoplanctoniques cryophiles exposées à des températures supérieures à 15°C, sans pouvoir calculer de  $Q_{10}$  du fait de l'absence totale de survie à partir de 20°C.

Dans des communautés complexes, telles que celles rencontrées dans le milieu naturel, l'influence de la température sur la croissance algale va donc être fortement conditionnée par la composition spécifique au sein des assemblages microbiens, qu'ils soient benthiques (biofilms) ou planctoniques. Cependant, compte tenu des interactions et des phénomènes de compétition entre les espèces présentes, les variations de température peuvent engendrer à l'échelle des communautés, des réponses non prévisibles sur la base des modèles mono spécifiques (Jiang et Morin, 2004 ; Brauer et al., 2009). Simulant à différentes saisons des hausses de températures de +2°C à +6°C par rapport à la température ambiante, Staehr et Sand-Jensen (2006) ont mis en évidence une augmentation du taux de croissance algale dans des communautés phytoplanctoniques naturelles, entraînant un raccourcissement de la phase exponentielle de croissance (avant l'atteinte de la phase stationnaire), comme montré précédemment par Coles et Jones (2000) sur différentes espèces phytoplanctoniques. Cependant, la réponse des communautés algales au gradient thermique semble être variable et fonction de la période d'échantillonnage initiale des communautés. Staehr et Sand-Jensen (2006) ont ainsi démontré qu'une augmentation de température stimulait plus fortement la croissance des communautés collectées dans les périodes de l'année les plus froides.

Villanueva et al. (2011) ont également révélé une croissance algale plus rapide dans des biofilms naturels soumis à une hausse thermique de 3°C environ (13°C à 16°C). Toutefois, dans leur étude, la température n'affecte pas la biomasse algale maximale (chlorophylle *a* ; chl *a*), ce paramètre étant principalement contrôlé par les conditions nutritives, comme montré par Marcarelli et al. (2006). Ces résultats sont contradictoires à ceux de Di Pippo et al. (2012) qui ont mis en évidence, en conditions lumineuses et nutritives non limitantes, un retard dans la phase exponentielle de croissance de biofilms lors d'un passage thermique de 20°C à 30°C. Leurs travaux semblent ainsi suggérer qu'une augmentation trop sévère de la température peut engendrer un ralentissement la croissance algale. Dans cette expérience, et malgré le retard de croissance observé, la hausse de température a favorisé une production de biomasse supérieure sur la durée de l'expérience, tant en terme de chl *a* que de contenu polysaccharidique.

## 2.2. Diversité des communautés phototrophes

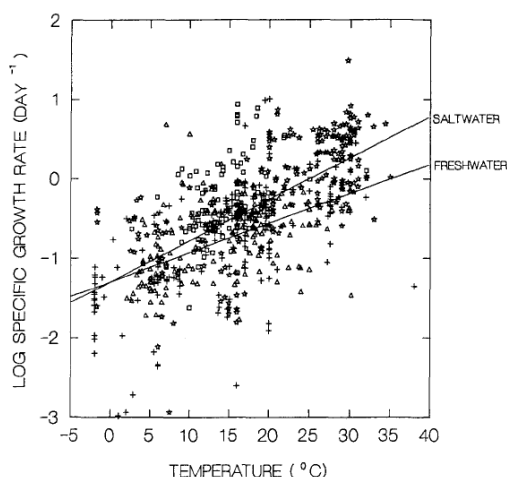
A partir de biofilms très simplifiés (composées uniquement d'une espèce cyanobactérienne *Synechocystis sp.* et d'une algue verte *Chlorococcum sp.*) cultivés dans un dispositif expérimental (4L) à courant constant (0,5 m/s), Di Pippo et al. (2012) ont clairement montré l'influence de la température sur l'abondance relative de ces deux espèces. Ainsi, à 20°C, le biofilm est quasi-exclusivement composé d'algues vertes (92-97%) alors que l'inverse est observé à 30°C, *Synechocystis* représentant alors 93 à 99% de la biomasse totale. Dans des communautés plus complexes, l'augmentation des températures favorise également généralement le développement des populations cyanobactériennes, et peut parfois engendrer des blooms cyanobactériens, quand les conditions nutritives sont favorables (ex. Chu et al., 2007 ; Jöhnk et al., 2008). Cela s'explique en partie par le fait que les cyanobactéries sont caractérisées par des températures optimales de croissance et de photosynthèse majoritairement

comprises entre 20 et 30°C, celles-ci étant élevées comparées à celles de la plupart des autres espèces phytoplanctoniques (Konopka et al., 1978 ; DeNicola, 1996 ; Coles et Jones, 2000).

Plus globalement, les conditions thermiques influencent fortement la composition des communautés phototrophes aquatiques, qu'elles soient planctoniques (Andersson et al., 1994 ; Findlay et al., 2001) ou benthiques (Blanchard et al., 1996 ; Marcarelli et Wurtsbaugh, 2006 ; Villanueva et al., 2011). Par exemple, Andersson et al. (1994) ont montré à partir de phytoplancton marin (originaire de la mer Baltique) que le passage d'une communauté printanière à une communauté estivale était déclenché par un hausse thermique de 10°C environ (0 à 10°C). A moyen ou long terme (cycles pluri-annuels), les changements climatiques peuvent ainsi engendrer des modifications importantes dans la composition des assemblages phytoplanctoniques lacustres et dans leur dynamique saisonnière, même s'il est généralement difficile de réellement appréhender la seule influence de la hausse thermique, notamment en cas de variation du contexte nutritif (Anneville et al., 2004 ; Thackeray et al., 2008). Thackeray et al. (2008) ont ainsi montré au moyen d'un suivi à long-terme (1955-2003) du phytoplancton de la zone pélagique du lac Windermere (Angleterre), que le bloom printanier de *Cyclotella* intervient de plus en plus tôt du fait d'une stratification thermique de plus en plus précoce, alors que l'avancement du bloom d'*Asterionella* est lié à la fois aux modifications progressives en terme de réchauffement du lac et d'enrichissement nutritif.

### 2.3. Croissance et biomasse des communautés hétérotrophes

De nombreuses études ont mis en évidence la forte influence de la température sur la croissance bactérienne en milieu aquatique (ex. ; White et al., 1991 ; Rivkin et al., 1996 ; Pomeroy et Wiebe, 2001 ). Ceci a notamment été illustré par White et al. (1991), qui ont analysé les résultats de 57 études réalisées dans différents milieux marins et dulcicoles (Fig. 2). A partir des données récoltées, ils ont ainsi montré une corrélation positive très significative entre la température et les taux de croissance spécifiques dans les communautés planctoniques ( $r^2=0,44$  ;  $n=700$  ;  $F<0,00001$ ) et obtenu pour ce paramètre, un  $Q_{10}$  moyen proche de 3, celui-ci étant légèrement moins élevé en milieu dulcicole (~2). Le même type de relation a également été souligné par Sander et Kalff (1993) concernant des communautés sédimentaires marines et lacustres.



*Figure 2 : Corrélation entre le taux de croissance bactérien (« growth rate » en jours) et la température en milieux dulcicoles (« freshwater ») et marin (« saltwater »); d'après White et al. (1991)*

Cependant, si elle est fortement influencée par les conditions thermiques, la croissance des communautés bactériennes aquatiques est également régulée par les conditions nutritives et les taux de matières organiques (White et al., 1991 ; Pomeroy et Wiebe, 2001 ; Berggren et al., 2010). Ainsi, Berggren et al. (2010) ont montré que la réponse des communautés bactériennes à des variations thermiques est très dépendante des conditions nutritives. Ainsi, leurs travaux ont révélé l'absence de corrélation entre la croissance bactérienne et la température en conditions trophiques limitantes.

Au sein des communautés aquatiques hétérotrophes, la croissance des espèces fongiques est également très influencée par les conditions thermiques. Plusieurs travaux ont montré que le taux de croissance de différentes espèces d'hyphomycètes aquatiques présente un optimum thermique variable suivant les espèces, mais celui-ci est généralement supérieur à 15°C (Suberkropp, 1984 ; Chauvet et Suberkropp, 1998 ; Rajashekhar et Kaveriappa, 2000). Cela se confirme à l'échelle des communautés puisque Ferreira et Chauvet (2011a) ont observé, sur des assemblages associées à des feuilles d'aulne immergées, une augmentation de la biomasse fongique lors d'une augmentation thermique de 5°C à 15°C. Cependant, cette augmentation est plus marquée lorsque les concentrations en azote et phosphore sont élevées, révélant un effet synergique entre les conditions thermiques et les conditions nutritives (Ferreira et Chauvet, 2011a).

#### 2.4. Diversité des communautés hétérotrophes

Dès 1974, Cherry et al. ont mis en évidence, à partir d'approches culturelles classiques, la forte influence de la température sur la composition des communautés bactériennes en milieu aquatique. Ils ont ainsi montré une augmentation concomitante de la température et de la diversité des espèces cultivables alors qu'à l'inverse, une diminution de 4 à 10°C par rapport à la température ambiante engendrait un appauvrissement de la richesse spécifique des communautés. Utilisant la technique moléculaire d'hybridation inverse (reverse line blot hybridization), Lindström et al. (2005) ont également démontré que la distribution des principaux groupes bactériens planctoniques dans 15 lacs du nord de l'Europe était principalement contrôlée par la température, ainsi que par le pH et le temps de rétention des eaux. Les suivis réalisés par Yannarell et Triplett (2004 ; 2005) dans plusieurs lacs situés dans le Wisconsin (Etats-Unis) ont également révélé l'influence notable de la température sur la diversité bactérienne planctonique, évaluée à partir d'une méthode d'empreinte moléculaire (PCR-ARISA). Cette méthodologie a également permis d'obtenir des résultats similaires avec des communautés bactériennes périphytiques, collectées dans des biofilms de deux rivières néo-zélandaises (Lear et al., 2008). Dans ces deux rivières, la température représente ainsi le principal facteur physique (en comparaison avec la luminosité, la profondeur et le débit) conditionnant la variabilité temporelle de la diversité bactérienne dans ces assemblages. D'après Villanueva et al. (2011), en cas d'une hausse concomitante des températures (+3°C) et des concentrations en nutriments (N et P), l'influence de la température sur la diversité bactérienne est principalement marquée pendant les premiers stades de développement des biofilms (<30 jours), la teneur en nutriments jouant un rôle

plus important dans les semaines suivantes. Cependant, Boivin et al. (2005) ont montré qu'en présence d'une forte concentration métallique (cuivre), l'influence de la température sur la diversité bactérienne périphytique est minimisée, le cuivre à forte dose étant le principal facteur de forçage de la communauté bactérienne.

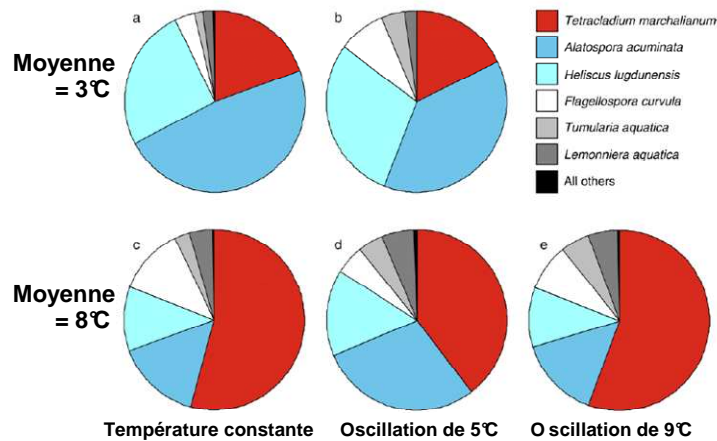


Figure 3 : Structure de communautés fongiques après décomposition de feuilles d'Aulne à température constante (a, c) ou sous un régime thermique journalier oscillant (b, d, e); d'après Dang et al. (2009)

La composition des communautés fongiques est aussi conditionnée par la température. Ainsi, Dang et al. (2009) ont montré que la composition fongique (reconstituée à partir de neuf souches cultivées) se développant après plus de 60 jours sur des feuilles d'Aulne immergées est principalement dominée par l'espèce *Alatospora acuminata* lorsque la température moyenne d'incubation est égale à 3°C, alors qu'elle est dominée par *Tetracodium marchalianum* à 8°C (Fig. 3). Ces remaniements sont dus, pour partie, à l'influence variable des températures sur les capacités de sporulation des différentes espèces. Ainsi, étudiant le comportement de communautés d'hyphomycètes aquatiques naturelles collectées sur des feuilles immergées dans une rivière indienne et incubées dans des conditions thermiques comprises entre 0°C et 35°C, Rajashekhar et Kaveriappa (2000) ont montré que le nombre d'espèces capables de sporuler était maximal à 25°C (31 espèces sur 35 identifiées ; Fig. 4).

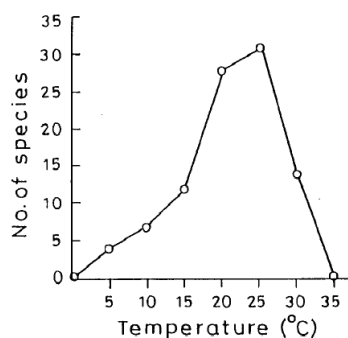


Figure 4 : Influence de la température sur le nombre d'espèces d'hyphomycètes aquatiques sporulant au sein d'une communauté naturelle composée de 35 espèces; d'après Rajashekhar et Kaveriappa (2000)

Cependant, outre la température moyenne, il est important de considérer les variations thermiques journalières qui influent également sur la répartition des espèces présentes (Fig.3 ; Dang et al., 2009), la lumière, qui stimule les processus de sporulation (Rajashekhar et Kaveriappa, 2000) et les conditions nutritives qui interagissent en synergie avec la température (Ferreira et Chauvet, 2011a). En milieu naturel, ces paramètres conditionnent donc la dynamique saisonnière des communautés fongiques, fortement influencée également par les interactions entre les différentes espèces présentes dans les assemblages (Suberkropp, 1984).

### **3. Effets de la température sur les activités microbiennes en milieu aquatique**

#### **3.1. Photosynthèse**

Comme pour la croissance, l'optimum thermique de la photosynthèse est variable suivant les espèces algales (Table 1). A l'échelle des communautés, l'impact d'une hausse de température va donc varier en fonction des espèces présentes et des gradients thermiques testés. Ainsi, Hancke et Glud (2004) ont observé une augmentation linéaire du taux de photosynthèse de communautés diatomiques benthiques de zones intertidales suite à une hausse des températures de 0°C à 12-15°C (optimal thermique) avec un  $Q_{10}$  pour ce paramètre compris entre 2,2 et 3,1 (suivant l'origine des communautés) pour cette gamme de température, alors qu'il diminue progressivement lorsque la température continue à s'élever.

<b>Espèces</b>	<b>Optimum thermique (°C)</b>
<b>Cyanophyta</b>	
<i>Schizothrix calcicola</i> (C. Ag.) Gom.	25
<b>Chlorophyta</b>	
<i>Chara braunii</i> Gmel.	15
<i>C. guairensis</i> R. Bic.	10
<i>Cladophora glomerata</i> (L.) Kütz.	15
<i>Cladophora glomerata</i> (L.) Kütz.	20
<i>Cladophora glomerata</i> (L.) Kütz.	28-32
<i>Cladophora glomerata</i> (L.) Kütz.	10
<i>Mougeotia</i> sp.	25
<i>Nitella subglomerata</i> A. Braun	20-25
<i>Nitella</i> sp.	25
<i>Pitophora oedogonia</i> (Mont.) Wittr.	25
<i>Spirogyra</i> sp.	20
<i>Spirogyra</i> sp.	25
<i>Ulothrix zonata</i> Kütz.	10
<b>Rhodophyta</b>	
<i>Audouinella hermannii</i> (Roth) Duby	10
<i>Bangia atropurpurea</i> (Roth) C. Ag.	20
<i>Batrachospermum</i> sp.	15
<i>B. ambiguum</i> Mont.	10
<i>B. delicatulum</i> (Skuja) Necchi et Entw.	15-20
<i>B. vogesiacum</i> Schultz	10
<i>Compsopogon coeruleus</i> (C. Ag.) Mont.	30-35
<i>Compsopogon coeruleus</i> (C. Ag.) Mont.	20-25
<i>Lemanea fluviatilis</i> C. Ag.	15-17,5
<i>Thorea hispida</i> (Thore) Desv.	15

*Table 1 : Optimum thermique pour le taux de photosynthèse net (mesurée par la production d'oxygène) de différentes espèces algales ; d'après Necchi et al. (2004)*

Des relations similaires entre température et photosynthèse ont également été démontrées dans des études réalisées avec des communautés phytoplanctoniques (Jones, 1998) et des communautés phytobenthiques sédimentaires (Colijn et van Buurt, 1975 ; Blanchard et al., 1996) ou périphtiques (Baulch et al., 2005). Ces travaux ont généralement mis en évidence des taux de photosynthèse maximum à des températures comprises entre 20°C et 25°C. Rasmussen et al. (1983) ont cependant montré que cet optimal thermique peut présenter des variations saisonnières, atteignant ainsi



respectivement 20°C et 30°C pour des communautés benthiques collectées en mai et en septembre dans des sédiments marins au Danemark. Toutefois, la variation saisonnière peut parfois conditionner uniquement le potentiel photosynthétique des communautés, sans engendrer de variations temporelles en terme d'optimum thermique (Blanchard et al., 1996).

Etudiant l'influence de la température sur des communautés phytoplanctoniques de la Mer Baltique, Andersson et al. (1994) ont mis en évidence, pour la production primaire, des valeurs de  $Q_{10}$  variables en fonction de la gamme thermique testée et de la fraction considérée au sein de la communauté (i.e. micro-, nano- ou pico-plancton). Cependant, quelle que soit la classe de taille considérée, les valeurs de  $Q_{10}$  sont décroissantes avec l'élévation des températures (de 0 à 30°C), devenant inférieures à 1 lorsque la température s'élève de 20 à 30°C (Fig. 5).

Dans un contexte de refroidissement (passage de 20°C à 8°C), Nielsen and Jorgensen (1968), ont montré que le taux de photosynthèse de la diatomée *Skeletonema costatum* diminuait d'un tiers au départ mais redevenait ensuite pratiquement égal au taux observé à 20°C.

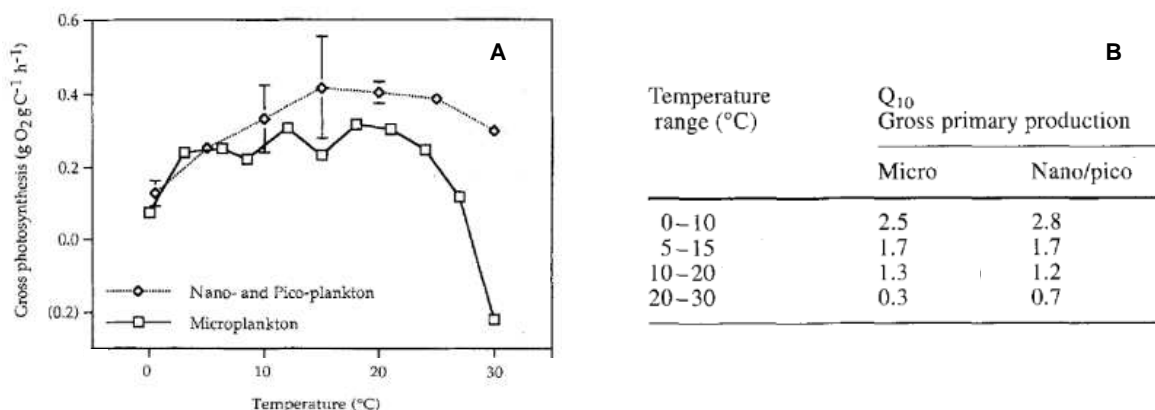
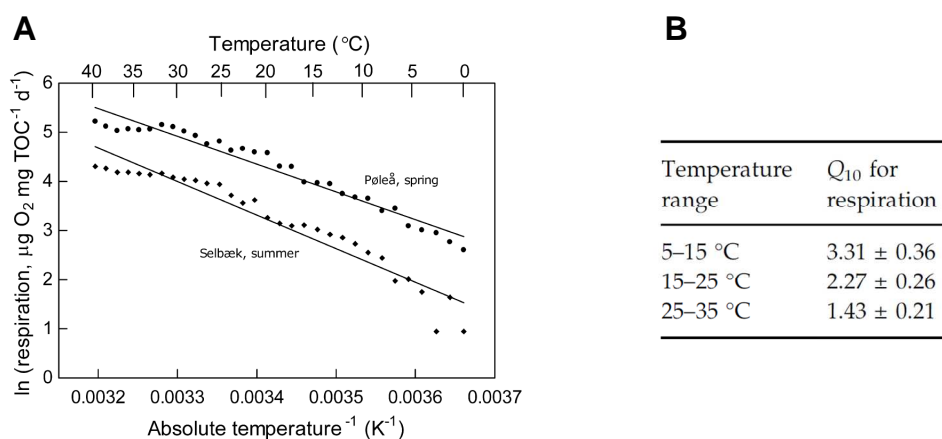


Figure 5 : Influence de la température sur la production d'oxygène par photosynthèse brute (gross photosynthesis) de communautés micro- et nano/pico-planctoniques marines (A) et coefficients thermiques ( $Q_{10}$ ) associés (B); d'après Andersson et al. (1994)

Cependant, il est nécessaire de différencier le taux de photosynthèse brut (PB= production d'oxygène par photosynthèse) et le taux de photosynthèse net (PN=PB - consommation d'oxygène par respiration). En effet, lorsque la respiration augmente de façon concomitante à celle de la photosynthèse, le taux de photosynthèse net n'augmente pas, et peut même, dans certains cas, diminuer (Necchi, 2004). Suivant les espèces, cette différence entre niveaux photosynthétiques nets et bruts est variable, modulant ainsi très fortement les niveaux de corrélation entre stimulation photosynthétique et stimulation du taux de croissance algal suite à une augmentation de température (Davison, 1991 ; Coles et Jones, 2000 ; Vona et al., 2004). A l'échelle des communautés, la stimulation de la photosynthèse nette par la température est donc fortement conditionnée par la composition spécifique. Cependant, plusieurs auteurs ont également souligné l'influence des conditions d'éclairement, qui représentent un facteur particulièrement important pour la régulation des activités photosynthétiques (Pinckney et Zingmark, 1993 ; Epping et Köhl, 2000 ; Morris et Komkamp, 2003 ; Hancke et al., 2008).

### 3.2. Respiration

De nombreuses études ont mis en évidence une forte stimulation de la respiration suite à une augmentation de température, dans des communautés microbiennes planctoniques (Staeher et Sand-Jensen, 2006 ; Simčič et Germ, 2010), périphtiques (Hancke et Glud, 2004 ; Baulch et al., 2005 ; Acuña et al., 2008 ; Berggren et al., 2010 ; Boulêtreau et al., 2012 ; Perkins et al., 2012) et sédimentaires (Sand-Jensen et al., 2007, Simčič et Germ, 2010), ainsi que dans des communautés fongiques se développant sur des substrats végétaux (Ferreira et Chauvet, 2011a ; 2011b) . Comme pour la photosynthèse, les valeurs de  $Q_{10}$  concernant la respiration diminuent avec l'élévation des températures (Sand-Jensen et al., 2007 ; Fig. 6).



*Figure 6 : Influence de la température sur la respiration de communautés bactériennes sédimentaires (A) et coefficients thermiques ( $Q_{10}$ ) associés (B); d'après Sand-Jensen et al. (2007)*

Cependant, le caractère universel de la relation entre l'activité respiratoire et la température dans différents types d'écosystèmes fait l'objet d'un débat important au sein de la communauté scientifique (ex. Enquist et al., 2003 ; Perkins et al., 2012), illustré par des résultats parfois contradictoires. Ainsi, certains travaux ont mis en exergue une relative stabilité des valeurs de  $Q_{10}$  obtenu pour la respiration, avec des communautés benthiques de rivière présentant une origine géographique, un historique thermique et des compositions spécifiques différentes (Sand-Jensen et al., 2007 ; Perkins et al., 2012) alors que d'autres études mettent clairement en évidence l'influence de la saisonnalité et des caractéristiques physico-chimiques des sites de prélèvement sur ce paramètre (Staeher et Sand-Jensen, 2006 ; Acuña et al., 2008). Il a également été démontré que les hausses thermiques stimulent généralement plus fortement la respiration que la photosynthèse (ex. Hancke et Glud, 2004 ; Staeher et Sand-Jensen, 2006). De ce fait, le réchauffement climatique pourrait entraîner à terme un déséquilibre de la balance métabolique des écosystèmes (définie comme le ratio entre le taux de fixation du carbone atmosphérique par photosynthèse et celui de sa reminéralisation par respiration) et induire une diminution du taux de séquestration du carbone atmosphérique (Yvon-Durocher et al., 2010). Compte tenu de cette différence de sensibilité entre respiration et production primaire à une hausse thermique, Demars et al. (2011) ont ainsi estimé que l'émission dans l'atmosphère de carbone issu des écosystèmes lotiques pourrait passer de 120 Mtonnes C/an pour une température de 13 $^{\circ}\text{C}$  à 150-330 Mtonnes C/an suite à une augmentation de 5 $^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3. Recyclage de la matière organique

Les communautés microbiennes hétérotrophes jouent un rôle prépondérant dans le recyclage de la matière organique en milieu aquatique. Les activités d'hydrolyse par les enzymes extracellulaires hydrolytiques représentent généralement les premières étapes de dégradation des matières organiques complexes (Robador et al. 2010). Ces activités, dépendantes du type de substrat et du potentiel enzymatique des communautés, peuvent être modulées par les conditions thermiques.

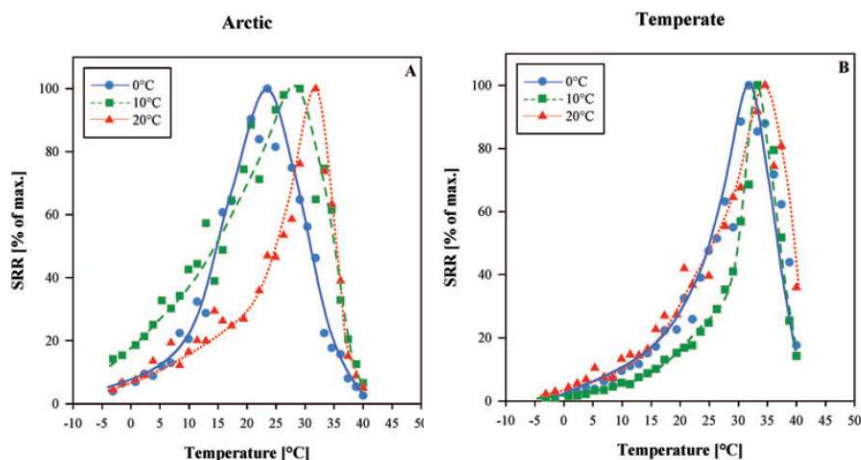
La revue rédigée par Pomeroy et Wiebe (2001) a ainsi souligné une forte interaction entre les concentrations en substrats et la température dans la régulation du métabolisme des communautés bactériennes sédimentaires marines. Cependant, cette interaction est très dépendante du type de communautés considéré (tropicales, tempérées ou psychrotolérantes). Cela est confirmé par les travaux de Robador et al. (2010), qui ont également mis en évidence l'influence importante de la température sur le potentiel d'hydrolyse du sulfate de chondroïtine (molécule de type glycosaminoglycane) par des communautés sédimentaires, avec une température optimale variable en fonction de l'origine des échantillons. Ainsi des communautés sédimentaires d'origine arctique présentent pour cette activité un optimum thermique proche de 22°C, avec une forte inhibition aux températures supérieures à 25°C, alors que cet optimum est proche de 26°C pour des communautés sédimentaires issues d'une zone tempérée (Mer Wadden, Allemagne). Montuelle et Volat (1997) ont également montré que les  $Q_{10}$  de la glucosidase, la phosphatase et la peptidase de communautés microbiennes sédimentaires variaient environ de 1 à 3 dans une gamme de 10 °C à 30°C. Dans cette gamme de température, la relation avec l'activité exoenzymatique était bien décrite par la loi d'Arrhenius, avec des différences de sensibilité selon l'origine de la communauté microbienne (sable ou limon). En conséquence la capacité d'hydrolyse assurée par les microorganismes sédimentaires peut augmenter jusqu'à un facteur 9 (pour la phosphatase), entre 10 et 30°C.

En complément, les travaux de Villanueva et al. (2011) ont révélé que l'influence de la température sur les activités enzymatiques extracellulaires de communautés périphtiques est variable suivant le type d'activité et peut-être dépendante des conditions nutritives. Ainsi, une hausse thermique de 3°C entraîne uniquement une augmentation significative de l'activité peptidase en conditions eutrophes alors qu'elle ne modifie pas les activités glucosidase et phosphatase, quelles que soient les conditions nutritives.

Le recyclage de la matière organique *via* la dégradation microbienne de substrats végétaux immergés est également impacté par les conditions thermiques. Ainsi, sur une gamme de 5°C à 15°C, Ferreira et Chauvet (2011a ; 2011b) ont observé une corrélation positive entre la température et le taux de décomposition de feuilles d'aulne par des communautés fongiques. L'augmentation de cette activité de décomposition est cependant modulée par les conditions nutritives, tant dans le milieu (azote et phosphore dissous ; Ferreira et Chauvet, 2011a) que dans les substrats végétaux (taux de phosphore, Ferreira et Chauvet, 2011b), qui peuvent représenter un facteur limitant et réduire les effets de la hausse thermique. A l'échelle mondiale, une étude prédit une stimulation des processus de dégradation

microbienne de substrats végétaux dans les milieux aquatiques du fait du réchauffement climatique (Boyero et al., 2011). Cependant, cette stimulation microbienne devrait être compensée par une baisse concomitante des activités de décomposition par les macro-invertébrés détritivores ce qui semble suggérer un effet mitigé du réchauffement climatique sur le taux de décomposition global des substrats végétaux (Boyero et al., 2011).

Dans de nombreux systèmes sédimentaires, la sulfato-réduction représente une voie métabolique majeure pour la minéralisation de la matière organique. Al-Raei et al. (2009) ont observé une dynamique saisonnière très marquée pour les processus de sulfato-réduction dans des sédiments tempérés situés à la surface de la zone intertidale de la mer Wadden (Allemagne). Leur travaux ont ainsi mis en évidence une influence notable des apports de matière organique et des conditions thermiques, avec une activité sulfato-réductrice 7 fois plus importante en été qu'en hiver. Des résultats similaires ont été obtenus par Finke et Jørgensen (2008) et Robador et al. (2009) avec des sédiments arctiques. Suite à une exposition chronique (2 ans) à différentes conditions thermiques (0°C, 10°C ou 20°C), Robador et al. (2009) ont montré que des communautés sédimentaires d'une zone arctique sont beaucoup plus sensibles aux conditions d'incubation que celles d'une zone tempérée. En effet, l'optimum thermique pour l'activité sulfato-réductrice des communautés arctiques est variable et très dépendant de l'historique d'exposition thermique, alors qu'il reste relativement stable pour les communautés issues de la zone tempérée, quelle que soit la température lors de la phase d'incubation (Fig. 7). Cette différence de réponse s'explique, entre autres, par un effet plus important de l'augmentation de température sur la composition des populations sulfato-réductrices issues de la zone arctique, alors qu'elle a peu d'effets sur les populations issues de zones tempérées (Mussman et al., 2005 ; Robador et al., 2009). Il est cependant intéressant de constater que quel que soit le type de sédiment, l'optimum thermique (compris entre 20°C et 35°C) est très supérieur aux conditions thermiques environnementales, mais aussi aux conditions thermiques expérimentales testées durant la pré-incubation des communautés (Fig. 7).



*Figure 7 : influence de la température sur les activités sulfato-réductrices (SRR) de communautés sédimentaires marines prélevées en zone Arctique(A) et en zone tempérée (B) et pré-incubées durant 24 mois à 0°C, 10°C et 20°C ; d'après Robador et al. (2009)*

### 3.4. Activités liées au cycle de l'azote

Les communautés microbiennes interviennent dans le cycle de l'azote en milieu aquatique. Dans ces milieux, la dénitrification représente une voie majeure pour l'élimination des nitrates (Seitzinger et al. 1988 ; Veraart et al. 2011). Par exemple, il a été montré dans une rivière riche en galets (Garonne, France) que ce processus permettait à des biofilms périphytiques d'éliminer jusqu'à 83 % des nitrates présents dans l'eau (Teissier et al. 2007). Les travaux de Veraart et al. (2001) et Boulêtreau et al. (2012) ont mis en évidence une forte influence des conditions thermiques sur la dénitrification, celle-ci étant fortement stimulée lorsque la température s'élève. Ceci est en accord avec de précédentes études qui ont révélé l'influence de la température sur l'activité nitrate réductase, mesurée à l'échelle spécifique sur des cultures algales (Berges et al. 2002 ; Vona et al. 2004), l'optimum thermique pour cette activité, pouvant varier suivant les espèces (Fig.8).

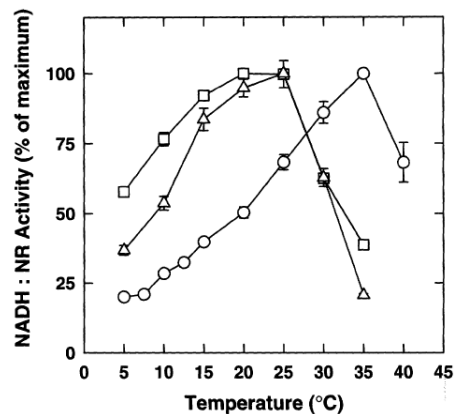
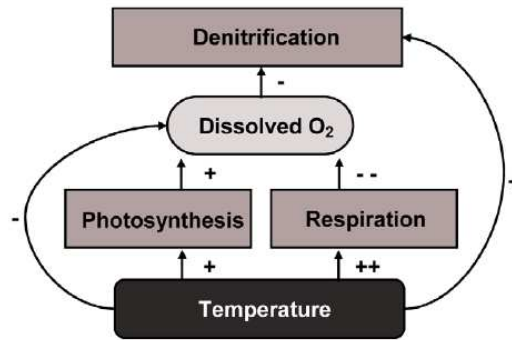


Figure 8 : Influence de la température sur l'activité nitrate réductase (NADH) de cultures algales de *Koliella antarctica* (triangles), *Chlorella saccharophla* (carrés) et *Chlorella sorokiniana* (ronds) ; d'après Vona et al. (2004)

A l'échelle des communautés, Boulêtreau et al. (2012) ont observé une augmentation exponentielle des capacités de dénitrification de biofilms de rivières soumis à une élévation thermique graduelle de 1°C à 31°C. Pour cette fonction, ils ont ainsi obtenu un  $Q_{10}$  (~7) trois fois plus important que ceux mesurés, en parallèle, pour la photosynthèse et la respiration, suggérant un possible déséquilibre de la balance entre le cycle de l'azote et celui du carbone en cas de réchauffement climatique important. De plus, la dénitrification est également fortement modulée par la disponibilité en oxygène dissous dans le milieu, qui inhibe ce processus (Veraart et al. 2011 ; Bouskill et al. 2012). Or, ce paramètre est lui-même conditionné par la température, de manière directe et indirecte, via les activités photosynthétiques et respiratoires. De ce fait, les variations thermiques engendrent des effets directs mais aussi indirects sur la dénitrification, du fait notamment de l'interdépendance entre les différentes activités microbiennes (Veraart et al. 2011 ; Fig.9). L'importance de ces interactions a également été soulignée au niveau de l'activité nitrogénase par Compaoré et Stal (2010). Ces auteurs ont ainsi montré que la fixation d'azote par deux espèces cyanobactériennes hétérotrophes (*Anabaena variabilis* et *Nostoc* sp.) est influencée par la température et la concentration en oxygène, mais aussi par la photosynthèse et la respiration.



*Figure 9: Représentation schématique des principaux effets directs et indirects de la température sur la dénitrification ; d'après Veraart et al. (2011)*

#### **4. Effets de la température sur les interactions trophiques impliquant les communautés microbiennes**

L'équilibre des réseaux trophiques est régulé par des interactions de types top-down ou bottom-up, dictées, en outre, par les relations proies-prédateurs. Ainsi, les communautés microbiennes benthiques et planctoniques sont contrôlées pour partie par les organismes brouteurs ou filtreurs, tels que les protozoaires et les macroinvertébrés (Kishi et al. 2005 ; Wey et al. 2008 ; Kathol et al. 2009). Kishi et al. (2005) ont mis en évidence l'influence des conditions thermiques sur ce contrôle dans un milieu lotique boréal. A partir de dispositifs expérimentaux, ils ont identifié une forte pression de type top-down dans une chaîne trophique composée de poissons prédateurs, de larves de phryganes (herbivores) et de périphyton à 12°C. Dans ces conditions thermiques, cette pression, exercée par les poissons prédateurs, engendre une diminution du nombre de larves et donc indirectement, une augmentation de la biomasse périphytique. Cependant cette pression n'est plus visible à 3°C et à 21°C du fait d'une diminution de l'activité de prédation par les poissons. Dans ce cas, l'augmentation de 12°C à 21°C entraîne donc, en présence de maillons trophiques supérieurs, une diminution de la biomasse algale, du fait de l'activité de broutage des larves, alors que ce paramètre est généralement stimulé par une telle hausse thermique (voir ch. 2.1).

Les conditions thermiques peuvent également conditionner le développement de protozoaires au sein même des assemblages microbiens. Ainsi Norf et al. (2007) et Villanueva et al., (2011) ont mis en évidence un développement plus rapide de ciliés dans des biofilms soumis à une hausse thermique, particulièrement en présence de conditions nutritives favorables (Villanueva et al. 2011). Cette croissance peut alors entraîner une augmentation de la pression sur les communautés bactériennes, limitant ainsi la croissance bactérienne et engendrant des modifications de la structure de ces communautés, *via* notamment des phénomènes de broutage sélectif (Villanueva et al. 2011). Cette pression, qui s'exerce principalement sur les bactéries périphytiques peut également fortement impacter les communautés bactériennes planctoniques, qui représentent une source nutritive préférentielle pour de nombreux protozoaires localisés dans les biofilms (Kathol et al. 2009).

Tous ces travaux soulignent donc les limites des expériences visant à évaluer l'effet de la thermie sur un seul compartiment, notamment dans une optique d'extrapolation au milieu naturel, où plusieurs interactions biologiques elles-mêmes régulées thermiquement sont présentes. De même, il est important de tenir compte des décalages saisonniers engendrés par le réchauffement des eaux et qui peuvent impacter inégalement les différents compartiments de la chaîne trophique, modifiant ainsi les interrelations entre les communautés biologiques (Edwards et Richardson, 2004).

## **5. Observations sur des rejets thermiques localisés**

Les rejets thermiques d'installations industrielles et particulièrement de production électrique ont pu faire l'objet d'études afin d'analyser les effets de la thermie sur le fonctionnement des écosystèmes soit à titre de site atelier afin d'analyser les effets d'un réchauffement, soit dans le cadre de surveillance de leur environnement.

Ces installations utilisent l'eau pour le refroidissement de leur installation, générant des augmentations de température de l'eau de quelques dixièmes de degrés à plusieurs degrés selon la conception des installations entre l'amont et l'aval sur le cours d'eau, ou le point de prélèvement et de rejet lorsqu'il s'agit d'installations littorales prélevant en milieu marin.

Concernant les analyses sur les cours d'eau, les concentrations en chl *a* planctonique mesurées dans le Rhône dans le cadre de la surveillance de l'environnement du site en amont et en aval de la centrale du Bugey entre 1979 et 2003 ne font pas apparaître un impact notable des rejets thermiques de cette centrale sur la biomasse phytoplanctonique (Khalanski et al., 2008).

De récents travaux visant à évaluer l'effet du réchauffement de l'eau sur la structuration et la réponse fonctionnelle du biofilm (contrôle autogène) ont été réalisées dans l'environnement proche du CNPE de Golfech utilisé comme site atelier situé sur la Garonne (Boulêtreau et al., 2010). D'après les estimations qui peuvent être déduites des résultats de cette étude, une augmentation de la température de l'eau de 2,5°C en aval du CNPE entraînerait dans les biofilms une augmentation de 50 % de la production microbienne, de 40 % de la respiration et de 100 % de l'activité dénitrifiante *via* un changement de la structure des communautés et/ou de l'architecture de l'assemblage. Cependant, au bout de 3 semaines, les différences au niveau de la dénitrification entre la zone échauffée et la zone témoin ne sont plus observables suggérant que la stimulation est transitoire et s'estompe lorsque les biofilms deviennent matures et atteignent leur équilibre écologique.

D'autres études ont par ailleurs été menées dans les rejets de sites sur le milieu marin, toutefois ces résultats d'études ne permettent pas tous d'isoler strictement la part de l'incidence entre la température et l'observation des effets sur les communautés microbiennes notamment par la présence d'injection de chlore destinée justement à la lutte contre le fouling dans les circuits et les installations spécifique à ce type de milieux (mollusques, biofilm, etc...). En zone littorale, les rejets thermiques de la centrale de Gravelines (mer du Nord) stimulent la croissance du phytoplancton. L'augmentation de production primaire peut alors atteindre 30% dans la zone échauffée en absence de résidus oxydants produits par la chloration (Grégoire et al., 1993).

A l'échelle mondiale, les travaux visant à évaluer les effets des rejets thermiques localisés sur les communautés microbiennes aquatiques sont également relativement rares et ils ont été principalement réalisés dans des milieux côtiers, situés dans la région asiatique (Inde, Chine N'est ce pas Taiwan ?). Les résultats issus de ces études menées en milieu marin tropical ou subtropical mettent en évidence un impact limité des rejets thermiques sur les communautés phytoplanctoniques, tant d'un point de vue de la biomasse que de la densité cellulaire, en le distinguant de l'effet associé aux rejets chlorés, qui affectent négativement la biomasse et la productivité algale (Poornima et al., 2005 ; 2006 ; Chuang et al., 2009). Ces résultats sont en accord avec ceux de Choi et al. (2002) qui ont montré que, malgré des conditions thermiques favorables en aval du rejet d'une centrale électrique (augmentation de 5°C à 10°C de la température des eaux), les concentrations en chl *a*, la production bactérienne et l'abondance des nanoflagellés hétérotrophes étaient fortement inhibées par les rejets chlorés. Les travaux de Chuang et al. (2009) suggèrent toutefois que malgré la présence de chlore, les rejets thermiques peuvent engendrer une augmentation significative de la quantité de chl *a*, donc de la biomasse algale, dans des communautés périphytiques.

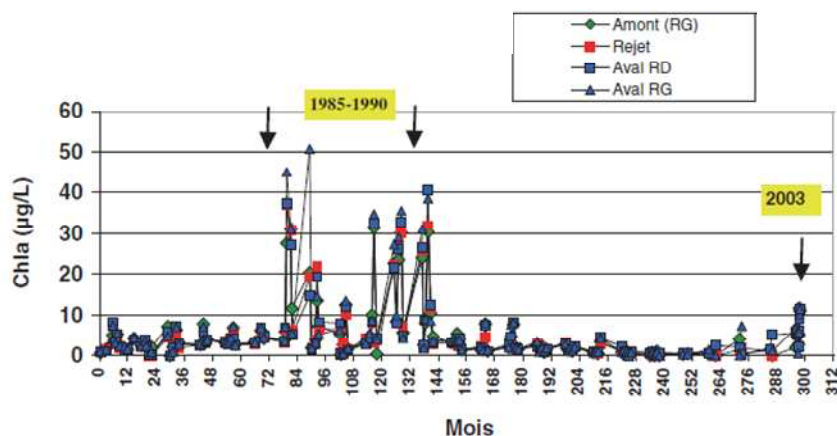
## **6. Le cas particulier du fleuve Rhône**

Le Rhône est un fleuve totalement aménagé pour la production hydro-électrique et la navigation. Au cours des trois dernières décennies, le régime thermique du Rhône a été affecté par le changement climatique. Il s'est traduit par un échauffement moyen d'environ 1,5 °C sur le Haut-Rhône et de 3,0 °C sur le Bas-Rhône. Dans cette dérive générale des températures, sur les quinze dernières années les échauffements résiduels moyens cumulés liés aux rejets thermiques des centres nucléaires de production d'électricité (CNPE) sont estimés de l'ordre de 0,6°C à 1,4°C suivant les zones concernées (Khalanski et al., 2008). Si les suivis chroniques réalisés depuis plus de 25 ans semblent indiquer que les modifications constatées sur les peuplements de macro-invertébrés et de poissons s'expliquent en premier lieu par les effets du changement climatique, sans influence notable des rejets thermiques des CNPE (Khalanski et al., 2008), les connaissances concernant les communautés microbiennes de ce fleuve sont beaucoup plus limitées. Elles sont issues, pour la plupart, de suivis réalisés en zone estuarienne et côtière, afin de suivre dans ce secteur l'influence du panache fluvial sur les communautés microbiennes planctoniques (Bianchi et al., 1994; Omnes et al., 1996 ; Naudin et al., 2001; Troussellier et al., 2002; Pujo-Pay et al., 2006; Christaki et al., 2009; Joux et al., 2009).

La chronique des concentrations en chl *a* planctonique, mesurées pendant 25 ans (1979-2003) dans le haut-Rhône (secteur du Bugey), fait apparaître trois périodes distinctes dans l'évolution de la biomasse phytoplanctonique (Khalanski et al., 2008 ; Fig. 10). Ces trois périodes sont respectivement caractérisées par i) de faibles concentrations en chl *a* (entre 1979 et 1984), ii) des concentrations plus élevées (entre 1985 et 1990) puis iii) un retour aux faibles concentrations initiales (à partir de 1991).



D'après les auteurs, ces variations temporelles sont principalement liées à l'évolution des teneurs en nutriments et au développement d'organismes phytoplanctonophages (le bivalve *Corbicula fluminea*) sans lien notable avec la hausse générale des températures ou des rejets thermiques du CNPE du Bugey (Khalanski et al., 2008).



*Figure 10: Chronique de la biomasse du phytoplancton (chlorophylle a, en µg/L) dans le Rhône sur le site de Bugey; d'après Khalanski et al. (2008)*

De même, un suivi de huit années (1987-1994) réalisé dans le moyen-Rhône, dans le secteur de Péage-de-Roussillon, a également permis de mettre en évidence une évolution temporelle forte de la biomasse phytoplanctonique et de la structure taxonomique des communautés algales planctoniques et benthiques sur toute la période d'étude (Fruget et al., 2001). Cette observation semble diverger des premières conclusions de Khalanski et al. (2008) : cette évolution semblerait être majoritairement conditionnée dans ce secteur par les conditions hydrologiques (débit) et thermiques puis, dans une moindre mesure, par les conditions nutritives, qui influencent principalement les communautés périphytiques. Cependant, et malgré la grande quantité de données récoltées au cours de ce suivi, les auteurs ont souligné la difficulté de discerner les effets associés aux rejets thermiques du CNPE de Saint-Alban à ceux liés à l'ensemble des variations environnementales observées sur le site d'étude, soulignant ainsi la nécessité de mettre en œuvre des suivis à long-terme, s'appuyant sur une solide stratégie d'échantillonnage, tant d'un point de vue temporel que spatial (Fruget et al., 2001).

En l'état actuel des connaissances, les autres données disponibles dans la littérature sont issues de prélèvements réalisés ponctuellement sur différents sites du Rhône. Fauvet et al. (2001) ont ainsi étudié le développement de communautés périphytiques algales dans le moyen-Rhône en plaçant pendant 7 jours des substrats artificiels en verre sur le lit du fleuve dans le secteur de Pierre-Bénite. Leurs résultats ont mis en évidence des concentrations en chl *a* assez faibles, comprises en moyenne entre 2 et 6 µg/cm<sup>2</sup> suivant le site de prélèvement, avec une augmentation de la biomasse algale dans les sections caractérisées par des teneurs plus riches en nitrates. De même, les travaux de Claret et Fontvieille (1997) ont montré que la croissance algale à la surface de sédiments situés dans le haut-Rhône (secteur de Chautagne) est fortement conditionnée par les concentrations en nutriments, mais

aussi par les conditions hydrodynamiques. La biomasse globale des biofilms présente également de fortes variations temporelles, liées notamment aux variations des teneurs en carbone organique dissous dans le milieu. Ces variations saisonnières sont particulièrement visibles au niveau du compartiment hétérotrophe pour lequel l'abondance cellulaire et le niveau d'activité sont principalement influencés par les conditions thermiques (Claret et Fontvieille, 1997, Claret et al., 1998). Ainsi, en saison chaude (température moyenne proche de 18°C), l'activité bactérienne au sein de biofilms sédimentaires de ce secteur peut augmenter la consommation d'oxygène et le taux de décomposition de la matière organique, entraînant alors le relargage de fortes quantités de nitrates dans le milieu (Claret et al., 1998). Cependant, une élévation trop importante de la température peut conduire à une surconsommation d'oxygène et stimuler alors des processus de dénitrification qui engendrent une diminution des teneurs en nitrates (Claret et al., 1998). Netto (2007) a également caractérisé des communautés bactériennes de sédiments prélevés en avril 2004 sur le Rhône, sur un site situé en amont de Valence et de la confluence du Doux sur le Rhône, en effectuant un estimatif de la concentration bactérienne et des niveaux d'activités de dénitrification et de déshydrogénase. Cependant ce travail ne donne pas d'indication quant aux variations saisonnières et à l'influence de la température sur ces paramètres microbiens.

De manière plus générale, cette synthèse des connaissances concernant les communautés microbiennes du fleuve Rhône met en évidence le peu d'informations sur les communautés microbiennes et leur rôle dans le fonctionnement écologique du, Rhône, ainsi qu'un manque de données quant aux effets de la thermie sur les microorganismes de cet écosystème.

## **7. Conclusions**

La plupart des résultats repris dans cette synthèse mettent en évidence l'influence directe de la température sur la structure, la diversité et les fonctions des communautés microbiennes phototrophes et hétérotrophes planctoniques et benthiques. Au niveau fonctionnel, la température exerce à la fois un contrôle distal, qui influence à moyen et long terme la structure de la communauté et donc conditionne la taille des populations impliquées dans les activités mesurées, et un contrôle proximal qui affecte à court terme l'intensité de l'activité métabolique (Boulêtreau et al., 2010). Quand les températures maximales ne dépassent pas l'optimum thermique des organismes, le contrôle proximal engendre généralement une stimulation des différentes activités microbiennes lorsque les températures s'élèvent. Cependant, la réponse aux variations thermiques (à court, moyen ou long terme) est variable suivant les processus microbiens considérés, ce qui peut, à terme, engendrer des déséquilibres des cycles biogéochimiques en milieu aquatique (Yvon-Durocher et al., 2010 ; Demars et al., 2011). Si la plupart des activités microbiennes sont directement conditionnées par la température, certaines d'entre elles sont également interdépendantes, ce qui entraîne des conséquences indirectes des modifications thermiques (Veraart et al., 2011).

D'autre part, il apparaît clairement que les effets de la thermie sont en interactions fortes avec les conditions environnementales chimiques (nutriments, toxiques) et physiques (lumière). Ainsi, plusieurs auteurs ont mis en évidence un effet synergique positif entre température et nutriments sur les processus microbiens, quand ces deux facteurs ne sont pas en conditions limitantes (e.g.. Berggren et al., 2010 ; Villanueva et al., 2011). Cela suggère que les effets d'une hausse thermique sur les communautés microbiennes aquatiques pourraient être plus marqués dans les milieux eutrophes (Ferreira et Chauvet, 2011a). A l'opposé, les effets de la thermie peuvent être plus difficilement perceptibles en présence de toxiques, qui peuvent représenter un facteur de forçage important pour le fonctionnement écologique des communautés microbiennes, comme cela a été montré pour le cuivre (Boivin et al., 2005) ou le chlore (e.g. Chuang et al., 2009) Cependant, il est intéressant de souligner que, contrairement aux macroorganismes (macroinvertébrés, poissons...) peu d'études concernent les effets cumulés de la température et des contaminants sur les communautés microbiennes aquatiques (Holmstrup et al., 2010). De ce fait, les interactions entre ces deux types de stress restent encore largement méconnues à ce jour.

Pour apprécier l'impact des variations thermiques sur les communautés microbiennes dans les milieux aquatiques, il s'avère également primordial d'étudier les interactions entre les différents compartiments microbiens mais également les interactions avec les organismes appartenant aux niveaux trophiques supérieurs, afin de tenir compte des processus de prédateurs et de compétitions, qui peuvent moduler (ou être modulés par) les effets de la thermie mais aussi par les décalages saisonniers engendrés par la hausse des températures (voir ch. 4).

## **8. Références bibliographiques**

- Acuña V, Wolf A, Uehlinger U, Tockner K, 2008. Temperature dependence of stream benthic respiration in an Alpine river network under global warming. *Freshwater Biol* 53, 2076-2088.
- Al-Raei AM, Bosselmann K, Böttcher ME, Hespeneide B, Tauber F, 2009. Seasonal dynamics of microbial sulfate reduction in temperate intertidal surface sediments: Controls by temperature and organic matter. *Ocean Dynam* 59, 351-370.
- Andersson A, Haecky R, Hagström Å, 1994. Effect of temperature and light on the growth of micro-nano- and pico-plankton: impact on algal succession. *Mar Biol* 120; 511-520.
- Anneville O, Souissi S, Gammeter S, Straile D, 2004. Seasonal and inter-annual scales of variability in phytoplankton assemblages: comparison of phytoplankton dynamics in three peri-alpine lakes over a period of 28 years. *Freshwater Biol* 49, 98-115.
- Araújo MB, Thuiller W, Pearson RG, 2006. Climate warming and the decline of amphibians and reptiles in Europe. *J Biogeogr* 33, 1712-1728.
- Baulch, HM., Schindler DW, Turner MA, Findlay DL, Paterson MJ, Vinebrooke RD, 2005. Effects of warming on benthic communities in a boreal lake: Implications of climate change. *Limnol. Oceanogr.* 50, 1377-1392.
- Berges JA, Varela DE, Harrison PJ, 2002. Effects of temperature on growth rate, cell composition and nitrogen metabolism in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* (bacillariophyceae). *Mar Ecol Prog Ser* 225, 139-146.
- Berggren M, Laudon H, Jonsson A, Jansson M, 2010. Nutrient constraints on metabolism affect the temperature regulation of aquatic bacterial growth efficiency. *Microb Ecol* 60, 894-902.
- Bianchi M, Bonin P, Feliatra, 1994. Bacterial nitrification and denitrification rates in the Rhône River plume (northwestern Mediterranean Sea). *Mar Ecol Prog Ser* 103, 197-202.

- Blanchard GF, Guarini JM, Richard P, Gros P, Mornet F, 1996. Quantifying the short-term temperature effect on light-saturated photosynthesis of intertidal microphytobenthos. *Mar Ecol Prog Ser* 134, 309-313.
- Boivin MEY, Massieux B, Breure AM, van den Ende FP, Greve GD, Rutgers M, Admiraal W, 2005. Effects of copper and temperature on aquatic bacterial communities. *Aquat. Toxicol.* 71, 345-356.
- Boulêtreau S, Dubois S, Salvo E, Lyautey E, Compin A, Dalger D, Garabetian F, Mastrotillo S, 2010. Influence de la température sur les communautés microbiennes aquatiques: Cas des biofilms de rivière et du centre nucléaire de production d'électricité de Golfech. Programme GolFilm 2008 – 2010. Contrat de collaboration EDF/CNRS. Rapport final, 58 p.
- Boulêtreau S, Salvo E, Lyautey E, Mastrotillo S, Garabetian F, 2012. Temperature dependence of denitrification in phototrophic river biofilms. *Sci Total Environ.* 416, 323-328.
- Bouskill NJ, Eveillard D, Chien D, Jayakumar A, Ward BB, 2012. Environmental factors determining ammonia-oxidizing organism distribution and diversity in marine environments. *Environ. Microbiol.* 14, 714-729.
- Bouterfas R, Belkoura M, Dauta A, 2002. Light and temperature effects on the growth rate of three freshwater algae isolated from a eutrophic lake. *Hydrobiologia* 489, 207-217.
- Boyero L, Pearson RG, Gessner MO, Barmuta L, Ferreira V, Graça MAS, Dudgeon D, Boulton AJ, Callisto M, Chauvet E, Helson JE, Bruder A, Albariño RJ, Yule CM, Arunachalam M, Davies JN, Figueroa R, Flecker AS, Ramírez A, Death RG, Iwata T, Mathooko JM, Mathuriau C, Gonçalves JF, Moretti MS, Jinggut T, Lamothe S, M'Erimba C, Ratnarajah L, Schindler MH, Castela J, Buria LM, Cornejo A, Villanueva VD, West DC, 2011. A global experiment suggests climate warming will not accelerate decomposition in streams but might reduce carbon sequestration. *Ecol Lett* 14: 289-294
- Brauer VS, de Jonge VN, Buma AGJ, Weissing FJ, 2009. Does universal temperature dependence apply to communities? An experimental test using natural marine plankton assemblages. *Oikos* 118, 1102-1108.
- Butterwick C, Heaney SI, Talling JF, 2005. Diversity in the influence of temperature on the growth rates of freshwater algae, and its ecological relevance. *Freshwater Biol* 50, 291-300.
- Chauvet E, Suberkropp K, 1998. Temperature and sporulation of aquatic hyphomycetes. *Appl Environ Microbiol* 64, 1522-1525.
- Cherry DS, Guthrie RK, Harvey RS, 1974. Temperature influence on bacterial populations in three aquatic systems. *Water Res* 8, 149-155.
- Choi DH, Park JS, Hwang CY, Huh SH, Cho BC, 2002. Effects of thermal effluents from a power station on bacteria and heterotrophic nanoflagellates in coastal waters. *Mar Ecol Prog Ser* 229, 1-10.
- Christaki U, Courties C, Joux F, Jeffrey WH, Neveux J, Naudin JJ, 2009. Community structure and trophic role of ciliates and heterotrophic nanoflagellates in Rhone River diluted mesoscale structures (NW Mediterranean Sea). *Aquat Microb Ecol* 57, 263-277.
- Chu Z, Jin X, Iwami N, Inamori Y, 2007. The effect of temperature on growth characteristics and competitions of *Microcystis aeruginosa* and *Oscillatoria mougeotii* in a shallow, eutrophic lake simulator system. *Hydrobiologia* 581, 217-223.
- Chuang YL, Yang HH, Lin HJ, 2009. Effects of thermal discharge from a nuclear power plant on phytoplankton and periphyton in subtropical coastal waters. *J Sea Res* 61, 197-205.
- Claret C, Fontvieille D, 1997. characteristics of biofilm assemblages in two contrasted hydrodynamic and trophic contexts. *Microb Ecol* 34, 49-57.
- Claret C, Marmonier P, Bravard JP, 1998. Seasonal dynamics of nutrient and biofilm in interstitial habitats of two contrasting riffles in a regulated large river. *Aquat Sci* 60, 33-55.
- Coles JF, Jones RC, 2000. Effect of temperature on photosynthesis-light response and growth of four phytoplankton species isolated from a tidal freshwater river. *J Phycol* 36, 7-16.
- Colijn F, van Buurt G, 1975. Influence of light and temperature on the photosynthetic rate of marine benthic diatoms. *Mar Biol* 31,209-214.
- Dang CK, Schindler M, Chauvet E, Gessner MO, 2009. Temperature oscillation coupled with fungal community shifts can modulate warming effects on litter decomposition. *Ecology* 90, 122-131.
- Dauta A, Devaux J, Piquemal F, Boumnick L, 1990. Growth rate of four freshwater algae in relation to light and temperature. *Hydrobiologia* 207, 221-226.

- Davidson EA, Janssens IA, 2006. Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change. *Nature* 440, 165-173.
- Davison IR, 1991. Environmental effects on algal photosynthesis: temperature. *J. Phycol.* 27, 2-8.
- Demars BOL, Manson JR, Ólafsson JS, Gislason GM, Gudmundsdottir R, Woodward G, Reiss J, Pichler DE, Rasmussen JJ, Friberg N, 2011. Temperature and the metabolic balance of streams. *Freshwater Biol* 56, 1017-1230.
- DeNicola DM, 1996. Periphyton responses to temperature at different ecological levels. In: Stevenson R J, Bothwell ML, Lowe RL (eds), *Algal Ecology: freshwater benthic ecosystems*. Academic Press, San Diego, p 149-180.
- De Toni A, Tournon-Bodilis A, Wallet F, 2009. Impact of climate change on pathogenic aquatic microorganisms: some examples. *Environ Risque Sante* 8, 311-321.
- Di Pippo F, Ellwood NTW, Guzzon A, Siliato L, Micheletti E, De Philippis R, Albertano PB, 2012. Effect of light and temperature on biomass, photosynthesis and capsular polysaccharides in cultured phototrophic biofilms. *J Appl Phycol* 24, 211-220
- Durance I, Ormerod SJ, 2007. Climate change effects on upland stream macroinvertebrates over a 25-year period. *Glob Chang Biol* 13, 942-957.
- Edwards M, Richardson AJ, 2004. Impact of climate change on marine pelagic phenology and trophic mismatch. *Nature* 430, 881-884.
- Enquist BJ, Economo EP, Huxman TE, Allen AP, Ignace DD, Gillooly JF, 2003. Scaling metabolism from organisms to ecosystems. *Nature* 423, 639-642.
- Epping E, Kühl M, 2000. The responses of photosynthesis and oxygen consumption to short-term changes in temperature and irradiance in a cyanobacterial mat (Ebro Delta, Spain). *Environ. Microbiol.* 2, 465-474.
- Fauvet G, Claret C, Marmonier P, 2001. Influence of benthic and interstitial processes on nutrient changes along a regulated reach of a large river (Rhône River, France). *Hydrobiologia* 445, 121-131.
- Ferreira V, Chauvet E, 2011a. Synergistic effects of water temperature and dissolved nutrients on litter decomposition and associated fungi. *Global Change Biol* 17, 551-564.
- Ferreira V, Chauvet E, 2011b. Future increase in temperature more than decrease in litter quality can affect microbial litter decomposition in streams. *Oecologia.* 167, 279-291.
- Findlay DL, Kasian SEM, Stainton MP, Beaty K., Lyng, M, 2001. Climatic influences on algal populations of boreal forest lakes in the Experimental Lakes area. *Limnol Oceanogr* 46, 1784-1793.
- Finke N, Jørgensen BB, 2008. Response of fermentation and sulfate reduction to experimental temperature changes in temperate and Arctic marine sediments. *ISME J* 2, 815-829.
- Franklin P, Dunbar M, Whitehead P, 2008. Flow controls on lowland river macrophytes: a review. *Sci Total Environ* 400, 369-378.
- Fruget JF, Centofanti M, Dessaix J, Olivier JM, Druart JC, Martinez PJ, 2001. Temporal and spatial dynamics in large rivers: example of a long-term monitoring of the middle Rhône River. *Ann Limnol* 37, 237-251.
- Graham CT, Harrod C, 2009. Implications of climate change for the fishes of the British Isles. *J Fish Biol* 74, 1143-1205.
- Grégoire A, Gras R, Khalanski M, 1993. Hydrobiological monitoring studies carried out near nuclear power plants built on the sea shore. *Hydroécol Appl* 1, 29-43
- Hancke K, Glud RN, 2004. Temperature effects on respiration and photosynthesis in three diatom-dominated benthic communities. *Aquat Microb Ecol* 37, 265-281.
- Hancke K, Hancke TB, Olsen LM, Johnsen G, Glud RN, 2008. Temperature effects on microalgal photosynthesis-light responses measured by O<sub>2</sub> production, pulse amplitude modulated fluorescence and <sup>14</sup>C assimilation. *J. Phycol.* 44, 501-514.
- Holmstrup M, Bindesbøl AM, Oostingh GJ, Duschl A, Scheil V, Köhler HR, Loureiro S, Soares AM, Ferreira AL, Kienle C, Gerhardt A, Laskowski R, Kramarz PE, Bayley M, Svendsen C, Spurgeon DJ, 2010. Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: a review. *Sci Total Environ* 408, 3746-3762.
- IPCC Climate change, 2007. Impact, adaptation and vulnerability. Eds Parry ML, Canziani OF, Palutikof JP, van der Linden PJ, Hanson CE

- Jiang L, Morin PJ, 2004. Temperature-dependent interactions explain unexpected responses to environmental warming in communities of competitors. *J Anim Ecol* 73, 569-576.
- Jöhnk KD, Huisman J, Sharples J, Sommeijer B, Visser PM, Stroom JM, 2008. Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria, *Global Change Biol* 14, 495-512.
- Jones R.C., 1998. Seasonal and spatial patterns in phytoplankton photosynthesis parameters in a tidal freshwater river. *Hydrobiologia* 364, 199-208.
- Joux F, Jeffrey WH, Abboudi M, Pujo-Pay M, Oriol L, Neveux J, Naudin JJ, 2009. Ultraviolet radiation in the Rhône lenses of low salinity and marine waters of the northwestern Mediterranean Sea: attenuation and effects on bacterial production and net community production. *Photochem Photobiol* 85, 783-793.
- Kathol M, Norf H, Arndt H, Weitere M, 2009. Effects of temperature increase on the grazing of planktonic bacteria by biofilm-dwelling consumers. *Aquat Microb Ecol* 55, 65-79.
- Khalanski M, Carrel G, Desaint B, Fruget JF, Olivier JM, Poirel A, Souchon Y, 2008. Global thermal study of the Rhone – Hydrobiological impact of cumulative warming. *Hydroécol Appl* 16, 53-108.
- Kishi D, Murakami M, Nakano S, Maekawa K, 2005. Water temperature determines strength of top-down control in a stream food web. *Freshwater Biol* 50, 1315-1322
- Konopka A, Brock TD, 1978. Effect of temperature on blue-green-algae (cyanobacteria) in Lake Mendota, *Appl Environ Microbiol* 36, 572-576.
- Langford TEL, 1990. Ecological effects of thermal discharges. Elsevier Applied Science, London, UK, 468 p.
- Lear G., Anderson MJ, Smith JP, Boxen K, Lewis GD, 2008. Spatial and temporal heterogeneity of the bacterial communities in stream epilithic biofilms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 65, 463-473.
- Lindström ES, Kamst-Van Agterveld MP, Zwart G, 2005. Distribution of typical freshwater bacterial groups is associated with pH, temperature, and lake water retention time. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8201-8206.
- Marcarelli AM, Wurtsbaugh A, 2006. Temperature and nutrient supply interact to control nitrogen fixation in oligotrophic streams: An experimental examination. *Limnol. Oceanogr.* 51, 2278-2289
- Meyer JL, Sale, MJ, Mulholland PJ, Poff NL, 1999. Impacts of climate change on aquatic ecosystem functioning and health. *J Am Water Resour Assoc* 35, 1373-1386.
- Montuelle B, Volat B, 1997, Influence of oxygen and temperature on exoenzyme activities in freshwater sediments, *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 26, 373-376.
- Morris EP, Kromkamp JC, 2003. Influence of temperature on the relationship between oxygen- and fluorescence-based estimates of photosynthetic parameters in a marine benthic diatom (*Cylindrotheca closterium*). *Eur. J. Phycol.* 38, 133-142.
- Moss B, Hering D, Green AJ, Aidoud A, Becares E, Beklioglu M, et al., 2009. Climate change and the future of freshwater biodiversity in Europe: a primer for policy-makers. *Freshw Rev* 2, 103-130.
- Musmann M, Ishii K, Rabus R, Amann R, 2005. Diversity and vertical distribution of cultured and uncultured Deltaproteobacteria in an intertidal mud flat of the Wadden Sea. *Environ Microbiol* 7, 405-418.
- Naudin JJ, Cauwet G, Fajon C, Oriol L, Terzić S, Devenon JL, Broche P, 2001. Effect of mixing on microbial communities in the Rhone River plume. *J Marine Syst* 28, 203-227.
- Necchi O, 2004. Photosynthetic responses to temperature in tropical lotic macroalgae. *Phycol. Res.* 52, 140-148.
- Netto M, 2007. Scénarios de gestion de boues de dragage de cours d'eau : Rôle des bactéries dans la mobilité des polluants métalliques. Thèse, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, 312 p.
- Nielsen ES, Jørgensen EG, 1968. The adaptation of plankton algae. *Physiol. Plantarum*, 21, 647-654.
- Norf H, Arndt H, Weitere M, 2007. Impact of local temperature increase on the early development of biofilm-associated ciliate communities. *Oecologia* 151, 341-350.
- Omnes P, Slawyk G, Garcia N, Bonin P, 1996. Evidence of denitrification and nitrate ammonification in the River Rhone plume (northwestern Mediterranean Sea). *Mar Ecol Prog Ser* 141, 275-281.
- Perkins DM, Yvon-Durocher G, Demars BOL, Reiss J, Pichler DE, Friberg N, Trimmer M, Woodward G, 2012. Consistent temperature dependence of respiration across ecosystems contrasting in thermal history. *Global Change Biol.* 18, 1300-1311.

- Pinckney J, Zingmark RG, 1993. Photophysiological responses of intertidal benthic microalgal communities to in situ light environments: Methodological considerations. *Limnol. Oceanogr.* 38, 1373-1383.
- Pomeroy LR, Wiebe WJ, 2001. Temperature and substrates as interactive limiting factors for marine heterotrophic bacteria. *Aquat Microb Ecol* 23, 187-204.
- Poornima EH, Rajadurai M, Rao TS, Anupkumar B, Rajmohan R, Narasimhan SV, Rao VNR, Venugopalan VP, 2005. Impact of thermal discharge from a tropical coastal power plant on phytoplankton. *J Therm Biol* 30, 307-316.
- Poornima EH, Rajadurai M, Rao VNR, Narasimhan SV, Venugopalan VP, 2006. Use of coastal waters as condenser coolant in electric power plants: impact on phytoplankton and primary productivity. *J Therm Biol* 31, 556-564.
- Pujo-Pay M, Conan P, Joux F, Oriol L, Naudin JJ, Cauwet G, 2006. Impact of phytoplankton and bacterial production on nutrient and DOM uptake in the Rhône River plume (NW Mediterranean). *Mar Ecol Prog Ser* 315, 43-54.
- Rajashekhar M, Kaveriappa KM, 2000. Effects of temperature and light on growth and sporulation of aquatic hyphomycetes. *Hydrobiologia* 441, 149-153.
- Rasmussen MB, Henriksen K, Jensen A, 1983. Possible causes of temporal fluctuations in primary production of the microphytobenthos in the Danish Wadden Sea. *Mar Biol* 73, 109-114.
- Richardson TL, Gibson CE, Heaney SI, 2000. Temperature, growth and seasonal succession of phytoplankton in Lake Baikal, Siberia. *Freshwater Biol* 44, 431-440.
- Rivkin RB, Anderson MR, Lajzerowicz C, 1996. Microbial processes in cold ocean. I. Relationship between temperature and bacterial growth rate. *Aquat Microb Ecol* 10, 243-254.
- Robador A, Brüchert V, Jørgensen BB. 2009. The impact of temperature change on the activity and community composition of sulfate-reducing bacteria in arctic versus temperate marine sediments. *Environ Microbiol* 11, 1692-1703.
- Robador A, Brüchert V, Stehen AD, Arnosti C, 2010. Temperature induced decoupling of enzymatic hydrolysis and carbon remineralization in long-term incubations of Arctic and temperate sediments. *Geochim cosmochim Acta* 74, 2316-2326.
- Sander BC, Kalff J, 1993. Factors controlling bacterial production in marine and fresh-water sediments. *Microb Ecol* 26, 79-99.
- Sand-Jensen K, Pedersen NL, Søndergaard M, 2007. Bacterial metabolism in small temperate streams under contemporary and Future climates. *Freshwater Biol.* 52, 2340-2353.
- Seitzinger SP, 1988. Denitrification in freshwater and coastal marine ecosystems: ecological and geochemical significance. *Limnol. Oceanogr* 33, 702-724.
- Simčič T, Germ M, 2010. Increased temperature due to global warming alters the metabolic potential in aquatic organisms from an oligotrophic lake. *Internat. Rev. Hydrobiol.* 95, 4-5.
- Singh BK, Bardgett RD, Smith P, Reay DS, 2010. Microorganisms and climate change: terrestrial feedbacks and mitigation options. *Nature Rev* 8, 779-790.
- Staehr PA, Sand-Jensen K, 2006. Seasonal changes in temperature and nutrient control of photosynthesis, respiration and growth of natural phytoplankton communities. *Freshwater Biol* 51, 249-262.
- Suberkropp K, 1984. Effect of temperature on seasonal occurrence of aquatic hyphomycetes. *Trans Br Mycol Soc* 82, 53-62.
- Teissier S, Torre M, Delmas F, Garabétian F, 2007. Detailing biogeochemical N budgets in riverine epilithic biofilms. *J N Am Benthol Soc* 26, 178-190.
- Troussellier M, Schäfer H, Batailler N, Bernard L, Courties C, Lebaron P, Muyzer G, Servais P, Vives-Rego J, 2002. Bacterial activity and genetic richness along an estuarine gradient (Rhône River plume, France) *Aquat Microb Ecol* 28, 13-24.
- Van't Hoff, J. H., 1898. Lectures on theoretical and physical chemistry. In: Part I. Chemical dynamics, Edward Arnold, London, pp. 224-229.
- Veraart AJ, de Klein JJM, Scheffer M, 2011. Warming can boost denitrification disproportionately due to altered oxygen dynamics. *PLoS ONE* 6, e18508.
- Villanueva VD, Font J, Schwartz T, Romani AM, 2011. Biofilm formation at warming temperature: acceleration of microbial colonization and microbial interactive effects. *Biofouling* 27, 59-71.

- Vona V, Rigano VD, Lobosco O, Carfagna S, Esposito S, Rigano C, 2004. Temperature responses of growth, photosynthesis, respiration and NADH: nitrate reductase in cryophilic and mesophilic algae. *New Phytol* 63, 325-331.
- Wey JK, Scherwass A, Norf H, Arndt H, Weitere M, 2008. Effects of protozoan grazing within river biofilms under semi-natural conditions. *Aquat Microb Ecol* 52, 283-296.
- White PA, Kalff J, Rasmusen JB, Gasol JM, 1991. The effect of temperature and algal biomass on bacterial production and specific growth rate in freshwater and marine habitats. *Micro Ecol* 2, 99-118.
- Wilby RL, 2008. Towards a climate smart WWF: meta-analysis of climate change impacts on ecosystems. Part 1: The scale of the challenge. Report on behalf of WWF-UK, 54 p.
- Wilby RL, Orr H., Watts G., Battarbee RW, Berry PM, Chadd R, et al., 2010. Evidence needed to manage freshwater ecosystems in a changing climate: Turning adaptation principles into practice. *Sci Total Environ* 408, 4150-4164.
- Yannarell AC, Triplett EW, 2004. Within- and between-lake variability in the composition of bacterioplankton communities: Investigations using multiple spatial scales. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 214-223.
- Yannarell AC, Triplett EW, 2005. Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 227-239.
- Yvon-Durocher G, Jones JI, Trimmer M, Woodward G, Montoya JM, 2010. Warming alters the metabolic balance of ecosystems. *Phil Trans R Soc B* 365, 2117-2126.