

Pierre qui roule n'amasse pas mousse*

Jean-Luc Rols¹, Joséphine Leflaive¹, Loïc Ten-Hage¹, René Le Cohu¹,
Evelyne Buffan-Dubau¹, Micky Tackx¹, Jessica Ferriol¹, Frédéric Azémar¹,
Stéphanie Boulêtreau¹, José-Miguel Sanchez-Pérez¹, Sabine Sauvage¹,
Jérôme Viers², Oleg Pokrovsky² et Frédéric Moulin³

¹ Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement (EcoLab, UMR 5245 CNRS/UPS/INPT), Université Fédérale Toulouse Midi-Pyrénées.

² Laboratoire Géosciences Environnement Toulouse (GET, UMR 5563 CNRS/UPS, UR IRD 254), Université Fédérale Toulouse Midi-Pyrénées.

³ Institut de Mécanique des Fluides de Toulouse (IMFT, UMR 5502 CNRS/INPT/UPS), Université Fédérale Toulouse Midi-Pyrénées.

* *Dicton de la Grèce Antique traduit au XVI^{ème} siècle : « Pierre souvent remuée de la mousse n'est vellée ».*

La directive cadre sur l'Eau (Directive 2000/60/CE du parlement européen, 2000) a pour objectif d'obtenir en 15 ans (2000 + 15 = ?) un état satisfaisant des eaux continentales. Ce « bon état » des eaux concerne (i) l'état chimique qui se réfère à une liste de substances dont la détection est indésirable et au non dépassement pour d'autres substances de niveaux de concentration-plafonds établis sur des critères écotoxicologiques, et (ii) l'état écologique qui se réfère à la structure et au fonctionnement des écosystèmes aquatiques (production primaire, minéralisation,...). Dans les cours d'eau, ces processus fonctionnels fondamentaux assurent en grande partie la réversibilité des perturbations naturelles (crues, étiages,...) et anthropiques (aménagements hydrauliques, pollutions ponctuelles ou diffuses,...).

Dans certains tronçons de rivière (vitesse de courant élevée, faible profondeur), ces processus fonctionnels sont assurés par des agrégats microbiens benthiques (biofilms épilithiques) qui se développent sur le fond du cours d'eau (Battin *et al.*, 2003). Le terme de

biofilm désigne une communauté de microorganismes enchevêtrés dans une matrice d'exopolymères et adhérant à une surface submergée (Figure 1). Les biofilms épilithiques de rivière sont essentiellement constitués par des algues (production primaire), mais ils contiennent également des bactéries (minéralisation de la matière organique), des champignons (décomposition de la matière végétale), des invertébrés (prédation microbienne, broutage du biofilm) et de la matière organique particulaire fine. Cette communauté microbienne tire ses ressources de l'énergie lumineuse (photosynthèse), du recyclage interne des exsudats organiques produits par les microalgues (hétérotrophie) et des nutriments véhiculés par la colonne d'eau. Au cours du temps, ces biofilms intègrent les résultats d'interactions avec des flux d'eau et d'éléments dissous importants, notamment des contaminants toxiques organo-solubles qui peuvent s'accumuler dans la matrice d'exopolymères.

L'association des microorganismes en biofilm leur confère de nombreux avantages.

Les cellules y créent leurs propres micro-environnements (micro-gradients de pH, d'oxygène dissous,...) favorisant la diversification de niches écologiques. L'arrangement spatial des communautés bactériennes et leurs complémentarités fonctionnelles font du biofilm une communauté à activités métaboliques intégrées. De plus, les microorganismes à l'intérieur du biofilm résistent mieux que les microorganismes planctoniques au courant, aux changements de pH, aux carences en nutriments, aux désinfectants et aux antibiotiques. Ils interviennent également dans les processus de minéralisation de la matière organique et de recyclage des éléments, notamment dans les principaux cycles biogéochimiques du carbone et de l'azote et participent à l'auto-épuration par la biodégradation des polluants de l'environnement dans lequel ils évoluent.

La dynamique des communautés de microorganismes qui composent ces biofilms semble obéir au modèle conceptuel de successions écologiques (Lyautey *et al.*, 2005). Ce modèle décrit trois phases au cours desquelles la colonisation du substrat par les microorganismes pionniers, puis la compétition vis-à-vis des ressources nutritives et enfin la diversification des niches (micro-habitats) régissent l'évolution des communautés bactériennes et algales du biofilm. L'évolution temporelle des populations au sein de ces biofilms répond probablement à des changements de conditions physico-chimiques locales. Associée à la succession de taxons dominants au cours du processus de maturation (épaississement !) du biofilm est observée une succession de fonctionnalités : ainsi apparaissent au cours du temps des espèces impliquées dans des processus de recyclage des éléments (nitrification,...) et/ou adaptées aux fluctuations de la disponibilité en oxygène (dénitrification,...).

Lorsque le biofilm épilithique est formé à partir de l'immersion d'un substrat vierge (plaque de verre ou de polyéthylène par

exemple), la trajectoire de successions écologiques de la communauté microbienne dans les premiers stades de maturation (les premières semaines) est fortement dépendante de l'environnement abiotique (facteurs physico-chimiques et composition chimique de la colonne d'eau) et biotique (microorganismes en dérive dans la colonne d'eau). Notamment, la présence de composés toxiques va modifier la trajectoire de succession (donc la composition de la communauté microbienne et son évolution temporelle). Cette trajectoire peut être appréciée par (i) la détermination de la diversité de la communauté microbienne (par des techniques de typage moléculaire, d'identification des micro-algues,...) au cours de la maturation, (ii) la recherche de fonctions pour caractériser la diversité fonctionnelle portée par ces communautés (mesure d'activités enzymatiques hétérotrophes à l'aide de micro-plaques Biolog, par dosage spécifique de gènes portant ces fonctions,...) et (iii) la mesure d'une fonction donnée (production primaire par mesure des micro-gradients d'oxygène dissous dans le biofilm, mesure d'activités enzymatiques comme celles impliquées dans la dénitrification, dosage des ARNm exprimés par les gènes de fonction,...).

Les algues benthiques qui dominent la communauté épilithique représentent, en raison de leurs caractéristiques écologiques, des organismes bio-indicateurs pertinents pour étudier la qualité des eaux courantes (par exemple l'indice biologique diatomique - IBD). Ainsi peuvent être cités leur caractère sessile les empêchant de migrer en cas de pollutions, leur sensibilité aux changements de l'environnement, leur cycle de vie relativement court entraînant une réponse rapide aux perturbations, leur forte diversité et leur présence dans l'ensemble des cours d'eau. La bio-indication s'étend à l'utilisation de diatomées benthiques en milieu marin, notamment par la création d'un inventaire des espèces rencontrées dans un milieu tropical côtier, associé à une détermination

fine de la composition physico-chimique de l'eau (Desrosiers *et al.*, 2013).

Réponses métaboliques, fonctionnelles et structurales des communautés microbiennes benthiques aux perturbations

La complexité structurelle de l'assemblage « biofilm » multiplie les modalités de réponse fonctionnelle de l'agrégat par une diversification possible des activités métaboliques. En conséquence de cette diversité des activités métaboliques, ainsi que de leur modularité, chaque cellule au sein du biofilm évolue dans un « contexte éco-chimique variable » correspondant à l'ensemble des molécules d'origine biotique (e.g. métabolites secondaires) produites par elle-même et par les organismes voisins. Ce contexte éco-chimique est susceptible de moduler le fonctionnement et la composition du biofilm, mais également ses capacités de réponse à des perturbations extérieures. Les biofilms épilithiques sont un modèle biologique pertinent pour aborder l'impact des contraintes locales, puisque ces communautés sessiles sont sans solution d'évitement (hormis le détachement du biofilm de son substrat) et que les interactions chimiques entre les organismes sont exacerbées par les faibles distances intercellulaires.

Des altérations locales de la biodiversité, liées à la présence de pesticides (Paule *et al.*, 2013), d'éléments métalliques (Coutaud *et al.*, 2014 ; Gonzalez *et al.*, 2014) ou de périodes d'assec (figure 2, Barthès *et al.*, 2014), peuvent avoir des conséquences irréversibles sur la structuration des communautés microbiennes (successions) et par conséquent en altérer certaines fonctionnalités. L'objectif est alors d'analyser la manière dont la rythmicité temporelle ou l'intensité des altérations peut agir sur la réponse des communautés microbiennes en termes de composition, de dynamique (résistance ou résilience) et de fonctionnement (biodégradation, biosorption ou reviviscence). Les résultats désignent les biofilms phototrophes comme des outils prometteurs

en tant que bio-indicateurs de la qualité des eaux lorsqu'ils sont caractérisés par une approche multi-métrique composée de descripteurs fonctionnels et structurels.

Les perturbations liées aux modifications du contexte éco-chimique sont abordées au travers de modèles d'interactions différents, selon le type d'organisme ou l'origine des signaux chimiques. Le rôle potentiel d'aldéhydes polyinsaturés produits par les diatomées benthiques de biofilms artificiels (microcosmes) peut concerner la formation et l'organisation de ces biofilms (Leflaive et Ten-Hage, 2011). Ces molécules sont connues par ailleurs pour être des régulateurs de la dynamique des populations et des défenses contre les prédateurs. Un modèle d'interaction (algue verte – diatomée) permet de déterminer l'impact de la perturbation chimique (inhibition de l'adhésion de la diatomée sur un substrat) couplée à des perturbations abiotiques sur la structure et le fonctionnement du biofilm (Allen *et al.*, 2014).

Interaction entre le biofilm épilithique et la couche limite turbulente : de l'expérimentation à la modélisation

Parmi les différents facteurs abiotiques qui contrôlent le développement du biofilm, le forçage hydrodynamique tient une place un peu particulière dans la mesure où il intervient selon deux modalités : une influence directe sous la forme d'une contrainte mécanique exercée sur le biofilm qui est fonction des conditions locales hydrodynamiques, et une influence indirecte via l'accès aux solutés, puisque les flux verticaux vers le biofilm sont pilotés par la turbulence.

Dans ce contexte, les études en canal hydraulique permettant de contrôler finalement le forçage hydrodynamique sont un outil précieux. De telles études ont clairement démontré la nécessité d'une description locale du forçage hydrodynamique turbulent plutôt qu'une description par des grandeurs intégrales comme le débit. Le canal expérimental de l'IMFT a été amélioré grâce à

un système complet de filtrage d'eau de Garonne pour l'alimentation en nutriments naturels et un fond recouvert de substrats synthétiques hémisphériques. Ce nouveau dispositif permet la culture sans carence d'un biofilm de rivière très représentatif du milieu naturel sur des campagnes longues de croissance et de détachement (Boulêtreau *et al.*, 2010). Ce type de canal permet aussi le déploiement de métrologies fines pour caractériser l'hydrodynamique locale (figure 3) : techniques PIV (vélocimétrie par image de particules) et LDV (vélocimétrie laser Doppler) sont ainsi utilisées pour quantifier la turbulence jusque dans la sous-couche de rugosité (proche du fond recouvert de biofilm).

Les expériences en canal ont permis de montrer que l'utilisation combinée de la vitesse de frottement u^* (liée à la contrainte mécanique au niveau du biofilm) et de la rugosité hydraulique k_s (échelle spatiale reliée à la géométrie adoptée par le biofilm pendant sa croissance) dans un modèle de croissance de la biomasse permettait de reproduire convenablement l'évolution du biofilm. Le terme de détachement chronique proportionnel à $k_s u^*$ qui permet de retrouver les chroniques de biomasse dans ces expériences indique que c'est un processus de transfert entièrement piloté par la turbulence qui est responsable d'une érosion chronique de biofilm vers la colonne d'eau (Graba *et al.*, 2010).

Lors de la phase initiale de colonisation, on observe qu'une hydrodynamique plus énergétique (valeur croissante de u^*) induit un retard temporel plus important dans l'accumulation de biomasse (Graba *et al.*, 2013). On retrouve d'ailleurs le même résultat dans un suivi *in situ* de croissance initiale mesurée par électrodes tournantes dans un préleveur avec deux conditions contrastées de vitesse (Boulêtreau *et al.*, 2011).

Quant à la vitesse de croissance de la phase exponentielle, elle semble liée au développement de couches limites le long de

ces mêmes substrats : les contraintes mécaniques limitent le taux de succès du recrutement des organismes colonisateurs et leur développement sur la surface du substrat (Coundoul *et al.*, 2014).

Au contraire, dans la phase mature du biofilm, les niveaux de biomasse atteints sont très proches, quasi indépendants de l'hydrodynamique (Graba *et al.*, 2013).

Interactions entre le biofilm épilithique et sa méiofaune associée

Les biofilms épilithiques de rivière sont des habitats particulièrement instables pour l'installation des communautés d'invertébrés benthiques puisqu'ils subissent de fréquentes perturbations hydrologiques. Cependant, des études de terrain de longues durées, opposant des périodes à régimes de crues contrastés, montrent que les biofilms sont colonisés par une méiofaune abondante (nématodes et rotifères essentiellement) pendant leurs périodes de croissance. La colonisation est favorisée par une vitesse du courant < 30 cm/s, ce qui suggère que la méiofaune associée aux biofilms bénéficierait d'une résistance au courant supérieure à celle présente dans les sédiments fins superficiels (Majdi *et al.*, 2012a).

Les biofilms, par leur composition complexe et leur diversité microbienne élevée, concentrent une large gamme de ressources trophiques disponibles. Le réseau trophique du biofilm de la Garonne est étudié en combinant l'analyse des signatures isotopiques $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$, le marquage isotopique au ^{13}C du microphytobenthos et l'analyse par HPLC des contenus intestinaux en pigments bio-marqueurs issus des microphytes consommés (Majdi *et al.*, 2012b). Ces méthodes ont permis de distinguer les consommateurs directs de microphytes (*e.g.* nématodes *Chromadorina* et larves de Chironomidae) des consommateurs utilisant le carbone microphytobenthique *via* le recyclage par la boucle microbienne ou par prédation (*e.g.* oligochaetes Naididae et larves de Rhyacophilidae). Les analyses

pigmentaires par HPLC couplées à des observations par microscopie confocale (figure 4) montrent que les rotifères peuvent sélectionner les cyanobactéries filamenteuses en prélevant jusqu'à 28 % de leur biomasse par jour, y compris lorsque les diatomées dominent largement la biomasse microphytobenthique du biofilm (Mialet *et al.*, 2013).

Une des questions découlant de ces résultats est de savoir si les interactions invertébrés-biofilms influencent les processus

fonctionnels des biofilms. L'activité des nématodes par exemple favorise la circulation de l'oxygène et la production primaire de biofilms de diatomées cultivés en laboratoire (Mathieu *et al.*, 2007). De plus, les rotifères associés aux biofilms phototrophes peuvent répondre très rapidement à un enrichissement en nitrate de l'eau par une augmentation significative de leur abondance et biomasse, ce qui a pour conséquence d'accroître la capacité de consommation des nitrates par le biofilm (Liu *et al.*, 2015).

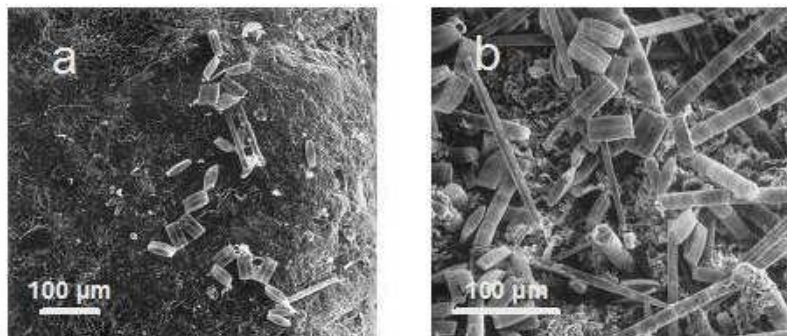


Figure 1 : Vues en microscopie électronique à balayage du biofilm colonisant des substrats en granit après 2 heures (a) et 1 jour (b) d'immersion en rivière (photos R. Le Cohu, EcoLab).

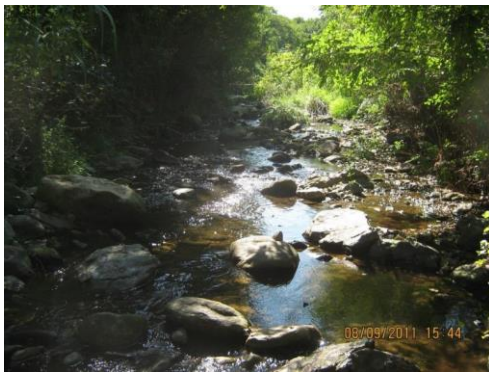


Figure 2 : Exemple de rivière intermittente : rivière Maureillas, Pyrénées-Orientales (photo S. Coulon, ASCONIT Consultants).



Figure 3 : Modélisation en canal hydraulique des écoulements de rivière sur un lit d'algues (photo Y. Bercovitz, IMFT).

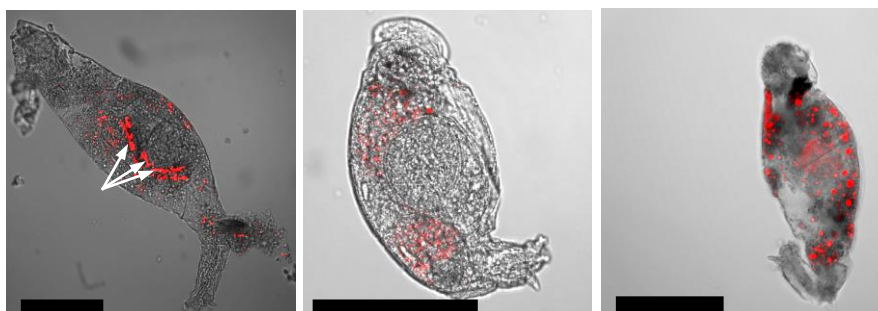


Figure 4 : Fluorescence chlorophyllienne (en rouge) des rotifères Bdelloïdes du biofilm épilithique de la Garonne vue par microscopie confocale. L'échelle est indiquée par la barre noire (= 100 µm). Les flèches indiquent les diatomées ingérées (photos B. Mialet, EcoLab).

Pour aller plus loin :

- Allen J., Ten-Hage L., Leflaive J. (2014). Impairment of benthic diatom adhesion and photosynthetic activity by allelopathic compounds from a green alga: involvement of free fatty acids? *Environmental Science and Pollution Research*, doi: 10.1007/s11356-014-3873-9.
- Barthès A., Ten-Hage L., Lamy A., Rols J.L., Leflaive J. (2014). Resilience of aggregated microbial communities submitted to drought – Small-scale studies. *Microbial Ecology*, **70** (1), 9-20.
- Battin T.J., Kaplan L.A., Newbold J.D., Hansen C.M.E. (2003). Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms. *Nature*, **426**, 439-442.
- Boulêtreau S., Sellali M., Elozegi A., Nicaise Y., Bercovitz Y., Moulin F.Y., Eiff O., Sauvage S., Sanchez-Perez J-M., Garabétian F (2010). Temporal dynamics of river biofilm in constant flows: a case study in a riverside laboratory flume. *International Review of Hydrobiology*, **95**, 156–170.
- Boulêtreau S., Charcosset J.Y., Gamby J., Lyautey E., Mastroiello S., Azemar F., Moulin F., Tribollet B., Garabétian F. (2011). Rotating disk electrodes to assess river biofilm thickness and elasticity. *Water Research*, **45** (3), 1347-1357.
- Coundoul F., Bonometti T., Graba M., Sauvage S., Sanchez-Pérez J-M., Moulin F. (2015). Role of local flow conditions in river biofilm colonization and early growth. *River Research and Applications*, **31** (3), 350-367.
- Coutaud A., Meheut M., Viers J., Rols J.L., Pokrovsky O.S. (2014). Zn isotope fractionation during its interaction with phototrophic biofilm. *Chemical Geology*, **390**, 46-60.
- Desrosiers C., Leflaive J., Eulin A., Ten-Hage L. (2013). Bioindicators in marine waters: benthic diatoms as a tool to assess water quality from eutrophic to oligotrophic coastal ecosystems. *Ecological Indicators*, **32**, 25-34.
- Gonzalez A., Mombo S., Leflaive J., Lamy A., Pokrovsky O.S., Rols J.L. (2014). Silver nanoparticles impact the phototrophic biofilm communities in a much stronger degree than the ionic silver. *Environmental Science and Pollution Research*, **22** (11), 8412-8424.
- Graba M., Moulin F.Y., Boulêtreau S., Garabétian F., Kettab A., Eiff O., Sanchez-Pérez J.M., Sauvage S. (2010). Effect of near-bed turbulence on chronic detachment of epilithic biofilm : experimental and modeling approaches. *Water Resources Research*, **46**, W11531
- Graba M., Sauvage S., Moulin F.Y., Urrea G., Sabater S., Sanchez-Pérez J.M. (2013). Interaction between local hydrodynamics and algal community in epilithic biofilm. *Water Research*, **47** (1), 2153-2163.
- Leflaive J., Ten-Hage L. (2011). Impairment of benthic diatom adhesion and photosynthetic activity by 2E,4E-decadienal. *Research in Microbiology*, **162**, 982-989.
- Liu Y., Majdi N., Tackx M., Dauta A., Gerino M., Julien F., Buffan-Dubau E. (2015) Short-term effects of nutrient enrichment on river biofilm: N–NO₃⁻ uptake rate and response of meiofauna. *Hydrobiologia*, **744**, 165–175.
- Lyautey E., Jackson C.R., Cayrou J., Rols J.L., Garabétian F. (2005). Bacterial community succession in natural river biofilm assemblages. *Microbial Ecology*, **50**, 589-601
- Majdi N., Mialet B., Boyer S., Tackx M., Leflaive J., Boulêtreau S., Ten-Hage L., Julien F., Fernandez R., Buffan-Dubau E. (2012a) The relationships between epilithic biofilm stability and its associated meiofauna under two patterns of flood disturbance. *Freshwater Science*, **31**, 38–50.
- Majdi N., Tackx M., Buffan-Dubau E. (2012b) Trophic positioning and microphytobenthic carbon uptake of biofilm-dwelling meiofauna in a temperate river. *Freshwater Biology*, **57**, 1180–1190.
- Mathieu M., Leflaive J., Ten-Hage L., de Wit R., Buffan-Dubau E. (2007) Free-living nematodes affect oxygen turnover of artificial diatom biofilms. *Aquatic Microbial Ecology*, **49**, 281–291.
- Mialet B., Majdi N., Tackx M., Azémar F., Buffan-Dubau E. (2013) Selective feeding of Bdelloid Rotifers in river biofilms. *PLOS ONE*, **8**, e75352.
- Paule A., Roubeix V., Lauga B., Duran R., Delmas F., Paul E., Rols J.L. (2013) Changes in tolerance to herbicide toxicity throughout development stages of phototrophic biofilms. *Aquatic Toxicology*, **144-145**, 310-321.

Biofilms: colloques/ateliers en France et ailleurs

- **Workshop sur la modélisation des biofilms** les 12 (après-midi) et 13 octobre 2015. Organisé par le Laboratoire de Mathématiques Raphaël Salem de l'Université de Rouen. L'objectif de cette rencontre est de réunir biologistes, physiciens et mathématiciens travaillant sur les biofilms afin d'échanger leurs expériences et de faire le point sur les récents développements.

<http://lmrs.univ-rouen.fr/Biofilms/index.html>

- **7^{ème} Colloque du Réseau National Biofilms**, Toulouse - 2 et 3 décembre 2015. Le RNB 7 se revendique très ouvert : le programme des deux journées sera établi par un comité scientifique sur la base des résumés proposés. Des sessions thématiques parallèles seront organisées pour satisfaire le plus grand nombre d'entre vous.

<http://inact.inp-toulouse.fr/colloqueRNB-toulouse2015/index.html>



Les **02 et 03** décembre 2015

7^{ème} COLLOQUE DU RESEAU NATIONAL BIOFILMS

Deux journées pour comprendre, échanger et débattre
autour des biofilms microbiens

Nouveau format: Programme établi en fonction des résumés
proposés. Organisation de sessions thématiques en parallèle.

TOULOUSE (31)

ENSIACET – Campus INP TOULOUSE-LABEGE



CONFERENCES

Nouveauté

SESSIONS PLENIERES ET
SESSIONS THEMATIQUES

SESSIONS

POSTERS

(PAUSES ET DEJEUNER)

PRIX DU RNB 7

MEILLEUR POSTER
ET MEILLEURE
COMMUNICATION ORALE

SOUSSION DES

RESUMES

DATE limite

30/09/2015

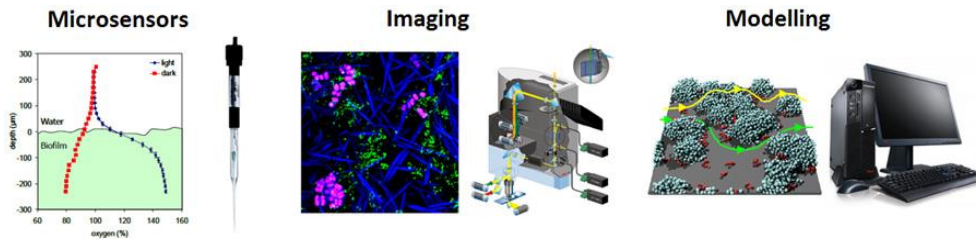
Plus d'infos sur :

<http://inact.inp-toulouse.fr/colloqueRNB-toulouse2015/>

Contact :

colloqueRNB_secretariat@inp-toulouse.fr

- **Advanced Biofilm Course**, 10th edition, 5-10 October 2015, Delft, The Netherlands
<http://biofilms.bt.tudelft.nl/>



- **ASM Conference on biofilms, 24-29 october, Chicago**
<http://conferences.asm.org/index.php/upcoming-conferences/7th-asm-conference-on-biofilms>



- **Biofilms 7 International conference**, Porto, 26-28 june 2016.
<http://biofilms7.com/>



- **Medical Biofilm Techniques 2016**, ESCMID Postgraduate Technical Workshop 22-25 August 2016, Lyngby, Denmark.
https://www.escmid.org/profession_career/educational_activities/escmid_courses_and_workshops/medical_biofilm_techniques_2016/