HAL
open science

Interactions “ biofilm-herbivores ” : influence de la qualité des ressources alimentaires sur l’état physiologique des herbivores

Jean-Bastien Gambonnet

To cite this version:

Jean-Bastien Gambonnet. Interactions “ biofilm-herbivores ” : influence de la qualité des ressources alimentaires sur l’état physiologique des herbivores. Sciences de l’ingénieur [physics]. 2016. dumas-01841331

HAL Id: dumas-01841331

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01841331v1

Submitted on 17 Jul 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L’archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d’enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Copyright

Membre de
UNIVERSITÉ DE LYON

ENTPE

École d'ingénieurs
de l'Ecologie, de l'Energie,
du Développement Durable
et de la Mer

École Nationale
des Travaux Publics
de l'État

rue Maurice Audin
69518 Vaulx-en-Velin Cedex

téléphone :
+33 (0)4 72 04 70 70

télécopie :
+33 (0)4 72 04 62 54

http://www.entpe.fr

TRAVAIL DE FIN D'ETUDE

Organisme d'accueil :
Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés (LEHNA)

Interactions « biofilm-herbivores » : influence de la qualité des ressources alimentaires sur l'état physiologique des herbivores

Jean-Bastien GAMBONNET
Promotion 61
VA : ENV - RISPOL
Année 2015-2016

Président de Jury : Thierry WINIARSKI
Tuteur entreprise : Laurence VOLATIER, Florian MERMILLOD-BLONDIN, Valérian ESTRAGNAT
Expert : Nathalie MONDY

Date de soutenance : 12 septembre 2016

NOTICE ANALYTIQUE

	NOM	PRENOM	
AUTEUR	GAMBONNET	Jean-Bastien	
TITRE DU TFE	**Interactions « biofilm-herbivores » : influence de la qualité des ressources alimentaires sur l'état physiologique des herbivores**		
	ORGANISME D'AFFILIATION ET LOCALISATION	**NOM PRENOM**	
MAITRE DE TFE	Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés (LEHNA)	Laurence VOLATIER, Florian MERMILLOT-BLONDIN, Valérian ESTRAGNAT	
COLLATION	66 pages	6 annexes (13 pages)	42 références bibliographiques
MOTS CLES	bassin d'infiltration - biofilms – brouteurs - colmatage – ingénierie écologique – réserves énergétiques – ressources alimentaires – sédiment - stœchiométrie - *Viviparus viviparus*		
LOCALISATION	Crépieux-Charmy - agglomération lyonnaise		
RESUME	Dans un but d'ingénierie écologique, l'implantation d'espèces herbivores peut s'avérer un outil prometteur pour limiter les développements excessifs et potentiellement néfastes de biofilms dans des systèmes naturels ou anthropiques tels que les bassins d'infiltration. Afin de répondre à la problématique de colmatage des bassins d'infiltration de Crépieux-Charmy, le LEHNA propose d'introduire un brouteur (*Viviparus viviparus*) pour limiter ces développements sous l'effet des interactions « producteur primaire-herbivore ». Les interfaces « eau-sédiment » de ces bassins d'infiltration sont en effet colonisés par des biofilms aux composantes algales plus ou moins denses au cours des saisons et aux compositions variables suivant les bassins. Se pose alors la question du maintien de *Viviparus viviparus* sur une année complète et dans l'ensemble des bassins du site. Ce TFE consiste donc à mieux comprendre les interactions « biofilm-brouteurs » afin de déterminer plus précisément comment la qualité des ressources alimentaires, c'est à dire des biofilms, influence l'état physiologique de ces herbivores. Pour répondre à cette problématique, un protocole expérimental, s'appuyant sur les théorie de la stœchiométrie, a été élaboré afin de tester les effets de la qualité de trois sources de nourritures différentes sur la constitution des réserves énergétiques (glycogène, triglycérides, protéines) et sur les taux de croissance de *Viviparus viviparus*.		
ABSTRACT	Insert herbivorous species can be a promising tool to limit excessive and potentially damaging developments biofilms in natural or human systems such as infiltration basins. To solve the clogging problem of infiltration basins of Crépieux-Charmy, the LEHNA proposes to introduce a grazer (*Viviparus viviparus*) to limit these developments due to interactions between herbivore and biofilm. "Water-sediment" interfaces of such infiltration basins are indeed colonized by biofilms with an algal component which is more or less dense over the seasons. More over, their compositions vary from one basin to another. Consequently, the main question is to maintain *Viviparus viviparus* a full year and in all the basins. Therefore, this TFE aims to have a better understanding of the "biofilm-grazers" interactions to determine more precisely how the quality of food resources affects the physiological state of these herbivores. To answer to this question, an experimental protocol, based on the theory of stoichiometry, has been developed to test the effects of the quality of three different foods on the energy reserves (glycogen, triglycerides, proteins) and the growth rate of *Viviparus viviparus*.		

REMERCIEMENTS

Mon travail de fin d'étude a été réalisé au sein de deux équipes du Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés (LEHNA) : l'équipe E3S (Ecologie, Evolution, Ecosystème souterrains) et l'équipe IPE (Impacts des Polluants sur les Ecosystèmes).
A cet égard, je remercie les deux équipes pour leur chaleureux accueil, leur bonne ambiance et leur grande disponibilité ainsi que leur responsable, Florian Mallard et Thierry Winiarsky d'avoir accepté ce stage et d'avoir mis à disposition leurs locaux et leurs matériels.

Je tiens à remercier particulièrement certaines personnes sans qui ce travail n'aurait pas pu aboutir.

- Tout d'abord Laurence Volatier et Florian Mermillot-Blondin ; vous êtes à l'initiative de ce projet, vous m'avez fait confiance et vous êtes rendus disponibles tout au long de ces 5 mois. Ce fut un vrai plaisir de travailler en équipe à vos cotés, de partager votre bonne humeur quotidienne et votre expérience ! Vous m'avez fait découvrir et apprécier le monde de la recherche. Je n'oublierais pas l'ensemble des fous rires et bons moments qui ont accompagné ce travail, même en période de rush durant ce « bel » été.

- Un grand merci également à Valérian Estragnat pour ton investissement, ta disponibilité et ton aide si précieuse tout au long de ce stage ! Nous avons longuement travaillé ensemble sur ce design expérimental qui n'a cessé d'évoluer et de s'étoffer. Tu as pris le temps de participer, de m'expliquer et de me conseiller sur chacune des manips. J'espère que tu réussiras avec succès ta thèse !

- Je remercie sincèrement Fred Hervant pour ton indispensable aide sur les extractions lipidiques, glucidiques et protéiques pour lesquelles tu as pris le temps de détailler chacune des étapes du protocole.

- Merci à Mélissa Tenaille pour ta grande implication et application lorsque j'ai eu besoins de « mains » pour ces longues heures de broyage, de pesées, de mesures, de changement d'eau des aquariums…

- Je remercie aussi Félix Vallier pour ta bonne humeur et ta participation hebdomadaire aux mesures réalisées sur l'analyseur de nutriments Easychem plus (Systea, Anagni, Italia) pour le contrôle des aquariums et l'expérience des extractions.

- Merci également à Laurent Simon pour l'ensemble des mesures effectuées au mois d'aout sur l'analyseur élémentaire (Flashea 1112).

Enfin, je remercie les membres du Jury d'avoir accepté de participer à l'évaluation de ce travail.

SOMMAIRE

Table des illustrations 3
Préambule 4
Introduction 5

Synthèse Bibliographique 7

1. Effets directs des brouteurs sur le biofilm des milieux benthiques 8

1.1. Le biofilm : une source nutritive aux composantes diverses 8
1.2. L'Effet du broutage sur la biomasse algale 8
1.3. Le broutage augmente la diversité algale du biofilm 9
1.4. Les effets du broutage sur l'activité photosynthétique du biofilm 10
1.5. L'effet du broutage sur la partie hétérotrophe du biofilm 11

2. La réponse des brouteurs aux caractéristiques du biofilm 12

2.1. Interactions « brouteurs-biofilms » régulées par la théorie de la stœchiométrie écologique 12
2.2. Les préférences alimentaires des brouteurs 13
2.3. Des effets sur la croissance des brouteurs 14
2.4. Des effets sur le stockage énergétique des brouteurs 14
2.5. Des effets sur les excrétions des brouteurs et le recyclage des nutriments 16
2.5.1. Le recyclage des nutriments par les brouteurs 16
2.5.2. Les conséquences du recyclage sur le biofilm : des effets indirects des brouteurs 17

3. Positionnement du sujet et hypothèses testées 17

Matériels et Méthodes 20

1. Conditions experimentales 21

1.1. Choix de l'organisme modèle 21
1.2. Condition d'élevage des Viviparus viviparus 22
1.3. Les sources de nourriture 22
1.4. Plan experimental 23
1.5. Suivi des paramètres physico-chimiques des aquariums 25
1.6. Concentration en NO_3^-, NH_4^+ et PO_4^{3-} 25

***2.* Etat physiologique des Viviparus viviparus 27**

2.1. Dosage des réserves énergétiques 27
2.1.1. Dosage des triglycérides 27

2.1.2. Dosage du glycogène 28
2.1.3. Dosage des protéines 28
2.2. Mesure du taux de Croissance 29

***3.* Mesure des teneurs en carbone (C), azote (N) et phosphore (P) des individus et des sources de nourriture 29**

3.1. Mesures effectuées sur les Viviparus viviparus 29
3.2. Mesures effectuées sur les sources de nourriture 30

4. Mesures des excrétions en nutriments 30

5. Mode de traitement des données 31

5.1. Représentations graphiques 31
5.2. Traitement statistique 31

Résultats et Discussion 33

1. Présentation des résultats 34

1.1. Caractéristiques initiales des sources de nourriture 34
1.2. Caractéristiques des Viviparus viviparus 34
1.3. Influence de la nourriture sur la croissance des Viviparus viviparus 35
1.4. Influence de la qualité stoechiométrique des sources de nourriture sur le stockage énergétique des Viviparus viviparus 36
1.4.1 Effet sur les réserves lipidiques 36
1.4.2 Effet sur les réserves glucidiques 37
1.4.2 Relation entre la qualité stoechiométrique d'une source alimentaire et les reserves énergétiques de *Viviparus viviparus* 38
1.5. Influence des concentrations en éléments chimiques des sources de nourriture sur le stockage énergétique des Viviparus viviparus 39
1.6. Impact des sources de nourriture sur l'excrétion 40

2. Discussion 42

Conclusions et Perspectives de travail *..... 45*
Bibliographie *..... 46*

Annexes : tableaux de résultats 49

Table des illustrations

Figure 1 : Les interactions "biofilms - brouteurs" 19
Figure 2 : Photographie d'un *Viviparus viviparus*, mâle 21
Figure 4 : Photo d'une coupe de substrats de bassin, VEOLIA 23
Figure 3 : Composante algale du biofilm 23
Figure 5 : Mise en place des encagements dans les aquariums 24
Figure 6 : Ensemble des aquariums de l'expérience 24
Figure 7 : Schéma du dispositif expérimental 26
Figure 8 : Séparation des deux fractions au cours de l'extraction des lipides 27
Figure 9 : Dosage du glycogène après ajout du kit GluHK 28
Figure 10 : Position de la mesure de la hauteur des escargots 29
Figure 11 : préparation des béchers et des prélèvements d'eau pour mesurer les quantités de nutriments excrétés 31
Figure 12 : Ratios élémentaires C:N et C:P de Viviparus viviparus en fonction des sources de nourriture 35
Figure 13 : Taux de triglycérides par masse de protéines en fonction des différents traitements 36
Figure 14 : Taux de glycogène par masse de protéine en fonction des différents traitements 37
Figure 15 : Rapport masse de triglycérides / masse de protéines en fonction de la qualité stœchiométrique des sources alimentaires 38
Figure 16 : Rapport masse de triglycérides sur masse de protéines en fonction de la quantité de carbone de la source de nourriture 39
Figure 17 : Rapport masse de triglycérides sur masse de protéines en fonction de la quantité d'azote de la source de nourriture 39
Figure 18 : Excrétion de N en fonction des différents traitements 40
Figure 19 : Excrétion d'azote en fonction de la qualité des ressources alimentaires 41
Figure 20 : Excrétion d'azote en fonction de la quantité d'azote dans la nourriture 41

Préambule

Les travaux exposés dans le présent rapport s'intègrent dans un programme de recherche plus vaste initié en 2010 par les équipes Ecologie, Evolution, Ecosystèmes souterrains (E3S) et Impact des Polluants sur les Ecosystèmes (IPE) du Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés (LEHNA). Ce programme a pour objectif général de contribuer à la compréhension du fonctionnement du champ captant de Crépieux-Charmy ; ceci, pour faciliter les choix de gestion du site liés à la préservation de la ressource en eau tant d'un point de vue qualitatif que d'un point de vue quantitatif.

Dans ce contexte, deux axes de recherche sont développés en parallèle par le LEHNA :

- La compréhension des échanges entre le Rhône et le champ captant.
- La compréhension du fonctionnement hydraulique des bassins d'infiltration situés sur le champ captant : quels sont les facteurs impliqués dans les processus de colmatage ? Quelle solution pourrait être mise en place ?

Pour mener à bien ce second axe de recherche, une thèse a démarré en janvier 2016 dans l'objectif de développer une technique d'ingénierie écologique qui vise à s'appuyer sur des concepts en écologie fonctionnelle (Carpenter, 1995) pour lutter contre le développement excessif de tapis algaux (biofilms) dans les processus de colmatage. Concrètement, depuis 2011, la solution développée par le LEHNA pour limiter le développement excessif des tapis algaux sur le champ captant de Crépieux-Charmy repose sur l'introduction d'un gastéropode herbivore *Viviparus viviparus* dans les bassins d'infiltration.

Mon travail de TFE s'inscrit en soutien de ce travail de thèse. Il vise effectivement à mieux comprendre l'action nutritive de *Viviparus viviparus*. Concrètement, il s'agit d'étudier l'impact de la qualité des ressources alimentaires, c'est-à-dire des biofilms, sur l'état physiologique de ces invertébrés herbivores. En effet, les bassins d'infiltration de Crépieux-Charmy présentent des différences notables de colonisation par les biofilms. Ces derniers possèdent des caractéristiques distinctes, notamment en ce qui concerne leur composante algale qui est plus ou moins dense selon les bassins d'infiltration (Jully Maxime, 2014). De plus, une variabilité de la composition des biofilms au cours des saisons est aussi prévisible. Se pose alors la question du maintien de *Viviparus viviparus* sur le long terme et dans l'ensemble des bassins du site. Ainsi, comme il sera présenté dans le corps du rapport, mon travail consiste à tester l'effet de biofilms contrastés (hétérotrophe/phototrophe) sur l'état physiologique de ces individus.

Introduction

L'écologie fonctionnelle étudie la fonction des organismes isolés ou en interaction dans des écosystèmes naturels ou anthropisés. Elles se traduisent par des flux d'éléments (carbone, azote, eau, …) et des flux d'énergie qui varient en fonction de facteurs environnementaux. Les recherches en écologie fonctionnelle portent sur les processus et les organismes à l'origine de ces flux, ainsi que sur leurs réponses aux variations naturelles et anthropiques du milieu. Ainsi, la structure et le fonctionnement des écosystèmes va dépendre des flux de ressources disponibles et des relations trophiques existantes entre les différents niveaux trophiques. Le contrôle du premier niveau trophique, c'est-à-dire celui des producteurs primaires, peut se faire à la fois par la ressource (contrôle ascendant, bottom-up control, Hairston et al., 1960), par la compétition pour cette ressource (Tilman, 1982) et aussi par la prédation (contrôle descendant, top-down control, Elton, 1927, Lindeman, 1942). A titre d'exemple, les travaux de Gruner et al. (2008) ont démontré les effets de l'herbivorie sur la production primaire quel que soit le niveau des ressources basales (ex : azote, phosphore).

Les biofilms constituent souvent le premier niveau trophique des réseaux alimentaires benthiques, c'est à dire des systèmes situés aux interfaces « eau-sédiment », et jouent donc le rôle de producteur primaire. Le terme biofilm décrit une matrice biologique qui se développe à une interface, par exemple « eau-sédiment ». Celle-ci est constituée par un assemblage de cellules microbiennes et de polymères adhérés à une surface (ex. particule de sédiment). Cette forme est le mode de développement préférentiel des micro-organismes dans l'environnement par rapport aux cellules individuelles dispersées vivant sous une forme planctonique (Flemming et Wingender, 2010). Les biofilms sont des mélanges complexes principalement composés de bactéries et d'algues. Ils jouent un rôle écologique important car ils représentent un refuge et une source de nourriture essentielle pour les invertébrés et certains vertébrés brouteurs. Ces brouteurs constituent le plus souvent le deuxième niveau trophique de ces milieux benthiques. Ce sont principalement des macro-invertébrés de taille supérieure à 0.25 mm (Dinet et al.,1985) vivant dans les fonds des cours d'eau, des lacs ou des mers. Les invertébrés dits « brouteurs » appartiennent à différents groupes, les plus étudiés étant les gastéropodes, les larves de trichoptères, d'éphéméroptères et certains décapodes, amphipodes et isopodes. Ils ont un rôle important, voire essentiel dans les dynamiques des communautés microbiennes vivant sous la forme de biofilms benthiques, en exerçant une action trophique directe.

Dans un but d'ingénierie écologique, l'implantation d'espèces herbivores peut s'avérer un outil prometteur pour limiter les développements excessifs et potentiellement néfastes de biofilms dans des systèmes naturels ou anthropiques tels que les bassins d'infiltration. L'application de ces concepts d'écologie fonctionnelle à la problématique de colmatage des bassins d'infiltration de Crépieux-Charmy revient à proposer l'introduction d'un brouteur (*Viviparus viviparus*) pour limiter le développement des biofilms sous l'effet des interactions « producteur primaire-herbivore ». Les interfaces « eau-sédiment » de ces bassins d'infiltration sont en effet colonisés par des biofilms aux composantes algales plus ou moins denses au cours des saisons et aux compositions variables suivant

les bassins (Master 2 Ecosciences Microbiologie, Jully, 2015). Se pose alors la question du maintien de *Viviparus viviparus* sur une année complète et dans l'ensemble des bassins du site.

> **La problématique** de ce travail consiste donc à mieux comprendre les interactions « biofilm-brouteurs » afin de déterminer plus précisément comment la qualité des ressources alimentaires, c'est à dire des biofilms, influence l'état physiologique de ces herbivores.

Ce rapport se compose :

- D'une première partie bibliographique permettant de synthétiser les résultats et conclusions de plusieurs études qui ont déjà été menées sur les interactions « biofilm-brouteurs ». Ces interactions peuvent être analysées sous deux angles : l'influence des brouteurs sur la biomasse, la diversité et l'activité du biofilm dans un premier temps ; l'influence de la quantité et de la qualité nutritive du biofilm sur les brouteurs dans un second temps. A l'issue de cette partie, les hypothèses testées dans cette étude seront explicitées.
- D'une partie « matériels et méthodes » présentant les stratégies expérimentales mises en œuvre pour tester les hypothèses ainsi que les protocoles expérimentaux appliqués.
- D'une partie où les résultats seront présentés et discutés.

Enfin, nous conclurons sur la pertinence de l'hypothèse initiale et apporterons des perspectives à ce travail.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Cette partie a pour objectif de faire un état des lieux des connaissances sur les relations « biofilms – brouteurs » et de définir les notions clés de ce travail.

Au travers ce sujet, nous nous intéressons plus particulièrement à deux axes :

- *L'influence des brouteurs sur la biomasse, la diversité et l'activité du biofilm.*
- *L'influence de la quantité et de la qualité nutritive du biofilm sur les brouteurs.*

A l'issue de cette partie, les hypothèses testées dans cette étude seront explicitées.

1. EFFETS DIRECTS DES BROUTEURS SUR LE BIOFILM DES MILIEUX BENTHIQUES

1.1. LE BIOFILM : UNE SOURCE NUTRITIVE AUX COMPOSANTES DIVERSES

Les biofilms sont structurés par une matrice composée de matériel extracellulaire sécrété par les organismes eux-mêmes. Elle peut représenter plus de 90% en masse de la globalité du biofilm (Flemming et Wingender, 2010). Elle est majoritairement composée d'eau, à laquelle s'ajoutent des exopolymères, c'est-à-dire des polysaccharides, des protéines, des acides nucléiques, ainsi que du matériel détritique et des particules minérales en proportions variables (Kostel et al., 1999 ; Flemming, 2011).

Un assemblage de micro-organismes vivent par ailleurs dans cette matrice. Ceux-ci sont très diversifiés ; ils peuvent être unicellulaires ou pluricellulaires, procaryotes ou eucaryotes et appartenir à différents niveaux trophiques (Wetzel, 1983 ; Lock, 1993) :

- Des producteurs primaires comprenant des organismes phototrophes eucaryotes (« micro-algues ») et des phototrophes procaryotes (cyanobactéries).
- Des décomposeurs tels que les bactéries ou les champignons.

Globalement, les bactéries dominent en nombre dans de tels biofilms. Toutefois, si on ne s'intéresse qu'aux communautés phototrophes, celles-ci sont généralement dominées par les bacillariophytes, plus communément appelées diatomées, les chlorophytes ou algues vertes, ainsi que par les cyanophytes ou cyanobactéries (Goldsborough et Robinson, 1996). Lorsque les conditions de lumière et de ressources nutritives sont favorables, les biofilms développés présentent une forte composante photo-autotrophe, ce qui leur confère alors une coloration variant du vert au brun et un aspect plus ou moins filamenteux (Hillebrand et al., 2002).

Ces assemblages participent largement à la production primaire du milieu et sont des sources de nourriture pour les invertébrés et certains vertébrés brouteurs (Lock, 1981 ; Feminella et Hawkins, 1995 ; Chessman et al., 2009 ; Fitter et Hillebrand, 2009). Le broutage aura donc des conséquences sur la biomasse des biofilms.

1.2. L'EFFET DU BROUTAGE SUR LA BIOMASSE ALGALE

Parmi les facteurs pouvant contrôler la biomasse des biofilms phototrophes, l'effet du broutage, c'est-à-dire la réduction de la biomasse du biofilm par des invertébrés herbivores, a été beaucoup étudié pour tous les types d'habitats aquatiques (Lamberti et al., 1995 ; Sommer, 2000 ; Hillebrand, 2009 ; Sturt et al., 2011). Le broutage peut en effet avoir des effets à la fois sur la biomasse, sur la diversité ou sur la production primaire des algues benthiques (Steinman, 1996). Ces effets peuvent être positifs ou négatifs et dépendent du type d'invertébré, des espèces algales, des concentrations en éléments nutritifs dans le milieu, des conditions d'éclairement, ainsi que du type de substrat (Feminella et

Hawkins, 1995 ; Haglund et Hillebrand, 2005). Toutefois, le phénomène le plus observé en présence de brouteurs est une réduction significative de la biomasse algale pour la plupart des espèces (Steinman, 1996), à l'exception des larves de diptères (Hillebrand, 2009). Ceci est confirmé par la méta-analyse de Hillebrand réalisée en 2009 sur plus de 800 études couvrant tous les types de milieux aquatiques. En effet, cette étude a montré que la présence de brouteurs pouvait en moyenne réduire la biomasse algale de 59% (certaines réductions atteignent même les 99%). Ces travaux suggèrent également que parmi les producteurs primaires, ce sont les algues benthiques qui sont les plus sensibles à l'activité de broutage. Les effets sont plus prononcés en laboratoire (65%) que sur le terrain (56%) mais sont dans tous les cas très significatifs. L'action des invertébrés sur des biofilms benthiques peut donc s'avérer être un moyen efficace pour lutter contre la croissance algale à l'interface eau-sédiment d'un bassin d'infiltration. Aussi, dans une optique d'ingénierie écologique, Gette-Bouvarot et al. (2015) ont montré que l'ajout d'un mollusque gastéropode brouteur dans un bassin d'infiltration pouvait limiter la densité algale des biofilms se développant aux interfaces « eau-sédiment » et, par voie de conséquences, améliorer les capacités d'infiltration des bassins.

Cette activité de broutage dépend cependant de la densité en brouteurs. En effet, lorsque la biomasse des brouteurs augmente, la consommation du biofilm devient plus importante d'où une diminution de sa biomasse (Feminella et Hawkins, 1995). Toutefois, à l'échelle du laboratoire, l'ampleur des effets induits par chaque individu peut diminuer lorsqu'on atteint une très grande biomasse de brouteurs. Ainsi, le surpeuplement peut réduire la pression de pâturage par individu, ce qui est probablement lié à une concurrence intra ou interspécifique (Ruesink, 2000). L'effet du broutage sur le biofilm peut être modulé par les nutriments présents dans le milieu qui peuvent permettre un renouvellement rapide de la biomasse algale (Bullery et al., 2012).Le biofilm subit donc à la fois des contrôles ascendants (bottom-up) et descendants (top-down) comme l'ont affirmé Hill et al. en 1992 et Fitter et Hillebrand en 2009 :

- Les contrôles ascendants associent une augmentation de la productivité primaire et de la biomasse algale à une augmentation du nombre de niveaux trophiques (Townsend, 1998) grâce à des teneurs en nutriments plus importantes.
- Les contrôles descendants impliquent le rôle de la prédation dans les niveaux trophiques supérieurs (Hairston et al., 1960 ; Carpenter et al., 1985).

Les nutriments et le broutage ont donc des rôles antagonistes sur le développement de la biomasse algale.

1.3. LE BROUTAGE AUGMENTE LA DIVERSITE ALGALE DU BIOFILM

Certains auteurs affirment que la composition en tant que telle des biofilms est davantage affectée par la présence de brouteurs que par l'apport en nutriments (Hillebrand et Kahlert, 2001), générant ainsi de la diversité algale dans ceux-ci. En effet, sans consommateurs primaires, les algues assimilant plus efficacement les nutriments vont proliférer et prédominer. Au contraire, la présence de brouteurs va générer une perturbation dans le milieu, et conduire à une augmentation de la diversité si on se

réfère à la théorie des perturbations intermédiaires (Conell, 1978). Cette dernière prévoit que la plus forte diversité (ici algale) est observée pour des niveaux de perturbation (broutage) intermédiaires. Cuker (1983) a, par exemple montré, que l'activité de broutage d'escargots modifiait de manière considérable la composition algale du biofilm : les diatomées de plus de 20 µm sont majoritaires lorsque les densités de brouteurs sont faibles ; à l'inverse, aux densités plus élevées, ce sont les formes coccoïdes et les plus petites diatomées (moins de 20 µm) qui se développent principalement.

L'augmentation de la diversité algale, en présence d'une densité moyenne en brouteurs, peut s'expliquer par une augmentation de l'hétérogénéité spatiale et temporelle du biofilm en présence de brouteurs qui vont créer des « patchs » (Liess et Hillebrand, 2004). Ces derniers sont souvent observés dans les travaux étudiant les relations biofilms-brouteurs (Malm et al., 1999 ; Duffy et Hay, 2000 ; Engkvist et al., 2000 ; Nielsen, 2001). La consommation d'algues macroscopiques par les brouteurs va en effet générer des zones dénudées sur le substrat et réduire la concurrence entre les algues en fluidifiant la communauté (Gaines, 1985). De nouvelles espèces algales vont alors se développer dans ces zones vides. Ces effets du pâturage peuvent aussi varier en fonction de la profondeur et de l'épaisseur du biofilm. En effet, que ce soient les brouteurs ou les algues, ils sont tous deux limités par plusieurs facteurs abiotiques tels que l'énergie générée par les mouvements d'eau s'ils existent, l'intensité et la qualité lumineuse ainsi que la sédimentation (Menge et Sutherland, 1987 ; Hurd, 2000). Tous les brouteurs n'ont cependant pas les mêmes impacts comme l'a prouvé Sommer (2000). Ce dernier a étudié l'influence de deux brouteurs, *Idothea chelipes* et *Littorina littorea*, sur l'hétérogénéité spatiale du biofilm. La première espèce ne modifie pas son hétérogénéité alors que la seconde l'augmente de manière significative.

Le broutage présente donc à la fois des effets sur la biomasse algale et sur la diversité algale. L'arrangement physique des biofilms dans l'espace étant impacté, on devrait donc également observer des modifications dans le fonctionnement et dans l'activité photosynthétique de ces biofilms.

1.4. LES EFFETS DU BROUTAGE SUR L'ACTIVITE PHOTOSYNTHETIQUE DU BIOFILM

L'étude d'Arakelova (2010) sur différentes communautés de biofilms montre que l'activité des brouteurs, liée à leur alimentation et à leur excrétion, est décisive pour la biomasse des algues mais aussi pour leur productivité. L'auteur explique que les pelotes fécales excrétées par les gastéropodes contiennent une proportion considérable de phosphore sous forme organique. Or cette libération de phosphore dans le milieu peut influencer l'activité des producteurs autotrophes, de manière positive ou négative. McCormick et Stevenson (1991) ont suggèré que la croissance des algues dans les couches inférieures du biofilm pouvait être stimulée lorsque les cellules de surface sont pâturées. Ces conclusions sont en accord avec les résultats de Gette-Bouvarot et al. (2014) qui décrivent une composante algale du biofilm moins dense mais plus active en présence de gastéropodes.

En effet, en réduisant la biomasse algale du biofilm, les brouteurs peuvent dans le même temps stimuler l'activité photosynthétique du biofilm. Deux raisons peuvent expliquer ce point :

- Une compétition entre les différentes espèces d'algues du biofilm qui devient moins importante (Carpenter, 1986 ; Mc Cormick et Stevenson, 1989). En l'absence de brouteur, les algues filamenteuses sont avantagées par leur grande taille qui leur permet d'accéder facilement aux nutriments et à la lumière. Avec les brouteurs, celles-ci sont réduites voir supprimées (Steinman et al., 1992) et d'autres algues peuvent alors proliférer.
- Un broutage préférentiel des cellules sénescentes entrainant une activation du métabolisme des couches plus profondes (Hart, 1985 ; Lambert et al., 1989 ; Komulaynen, 2005). Cette suppression des cellules sénescentes de la couche supérieure du périphyton permet d'ailleurs d'augmenter l'accessibilité et donc la disponibilité en nutriments (McCormick et Stevenson, 1991), mais aussi en lumière.

1.5. L'EFFET DU BROUTAGE SUR LA PARTIE HETEROTROPHE DU BIOFILM

Les études se sont souvent limitées au compartiment algal des biofilms benthiques sans considérer la présence de leur composante hétérotrophe détritique dont la forte contribution dans les flux de nutriments disponibles pour les organismes autotrophes a largement été démontrée (Feminella & Hawkins, 1995, Steinman, 1996). On trouve jusqu'à 108 bactéries par gramme de sédiment sec dans les premiers millimètres avec les abondances les plus élevées dans les sédiments constitués de particules fines et avec une forte teneur en matière organique (Dale, 1974). Les effets directs et indirects (flux de nutriments) du broutage sur la composante hétérotrophe du biofilm sont toutefois particulièrement complexes à aborder du fait du rôle des bactéries dans la boucle microbienne benthique (Manini, 2003). Certains auteurs ont toutefois obtenu des résultats, tel que Hillebrand et al. (2002) qui ont par exemple mis en évidence un effet positif du broutage sur la biomasse bactérienne.

Les brouteurs (gastéropodes, crustacées, larves d'insecte) qui consomment le biofilm ingèrent l'ensemble des composantes de celui-ci, dont les algues comme on a pu le voir précédemment mais également les bactéries (Mulholland et al. 1991). A biomasses égales, les bactéries sont les organismes hétérotrophes des milieux aquatiques les plus riches en nutriments (Liess et Haglund, 2007). Mais si on ne s'intéresse qu'aux biomasses totales, les teneurs en nutriments sont cette fois plus importantes dans la composante algale. Morales et Ward (2000) concluent à une consommation préférentielle des algues sur les bactéries mais rejettent l'idée d'une alimentation sélective. Les brouteurs sont donc des consommateurs généralistes.

Certaines expériences ont par ailleurs montré que les ratios élémentaires des brouteurs suivaient ceux des bactéries qu'ils ingéraient (Grover et Chrzanowski, 2006). Il y aura donc des conséquences sur les réponses des brouteurs suite à la consommation d'un biofilm plus ou moins riche en organismes hétérotrophes. Les teneurs en nutriments recyclés dépendront notamment de la composition du biofilm ingéré initialement (Grover, 2003).

Dans les systèmes aquatiques de faible profondeur, les algues se développent principalement à l'interface eau-sédiment sous forme de biofilms en interaction avec une composante bactérienne hétérotrophe. Ainsi il semble important de considérer conjointement ces deux composantes (autotrophe/hétérotrophe).
En présence de lumière, ces biofilms sont dominés par la présence d'organismes photosynthétiques procaryotes (cyanobactéries) et eucaryotes (algues vertes, algues diatomées) vivant sous une forme unicellulaire, coloniale ou filamenteuse. De par leur composante algale, les biofilms phototrophes contribuent largement à la production primaire et constituent une source de nourriture importante pour les invertébrés brouteurs. L'activité de broutage permet de diminuer significativement la biomasse algale des biofilms mais permet également de stimuler l'activité photosynthétique de ceux-ci. Cette activité photosynthétique va naturellement varier au cours des saisons, tout comme le degré d'auto-phototrophie des biofilms. Ceux-ci vont donc avoir des compositions variables, il apparaît donc nécessaire d'étudier les réponses des brouteurs qui consomment ces biofilms aux compositions différentes.

2. LA REPONSE DES BROUTEURS AUX CARACTERISTIQUES DU BIOFILM

2.1. INTERACTIONS « BROUTEURS-BIOFILMS » REGULEES PAR LA THEORIE DE LA STŒCHIOMETRIE ECOLOGIQUE

Tous les êtres vivants, dont les brouteurs et les biofilms, sont constitués de plusieurs éléments chimiques, plus ou moins associés dans la matière organique, et en quantités plus ou moins variables. A titre d'exemples, peuvent être vités l'azote (N), le phosphore (P), le carbone (C), le fer (Fe), la silice (Si) et le potassium (K). La théorie de la stœchiométrie écologique correspond à un équilibre de plusieurs de ces éléments chimiques dans les interactions et les processus écologiques. Elle prend en compte la composition élémentaire (souvent exprimée sous forme de ratios, par exemple C:N ou N:P) des êtres vivants impliqués dans les interactions, permettant ainsi de considérer explicitement les couplages entre les cycles biogéochimiques et les organismes via les éléments chimiques (Michael Danger, 2007). L'azote et le phosphore sont les deux éléments chimiques les plus analysés car ils sont connus pour limiter la production primaire dans la plupart des écosystèmes aquatiques et terrestres (Danger et al. 2007).

La stœchiométrie écologique repose sur deux principes physiques et physiologiques fondamentaux : la forte homéostasie des consommateurs hétérotrophes et la conservation de la matière au cours de son transfert entre les différents constituants des écosystèmes. L'homéostasie des organismes correspond au contrôle par les êtres vivants de leur composition chimique interne, de sorte que cette

dernière soit moins variable que les ressources qu'ils consomment (Kooijman, 2000). Les ratios élémentaires des consommateurs sont donc censés rester constants quels que soient les rapports élémentaires de la nourriture qu'ils ingèrent (Elser et Urabe, 1999 ; Sterner et Elser 2002). Toutefois, à ce jour, les différents travaux s'intéressant à l'homéostasie stœchiométrique sur divers organismes ont des résultats qui ne respectent pas tous pleinement cette théorie. En effet, bien que certaines études prouvent que la qualité de la nourriture n'a pas d'effet sur les ratios C:N:P du consommateur allant dans le sens de l'homéostasie (Stelzer et Lamberti, 2002 ; Bowman et al., 2005), d'autres ont montré qu'une alimentation riche en P et en N pouvait augmenter le P contenu chez des brouteurs invertébrés (Liess et Hillebrand, 2006 ; Bagett et al. 2013). Le degré d'homéostasie des organismes, en particulier celui des producteurs primaires qui sont à la base de la plupart des réseaux trophiques, va alors jouer un rôle essentiel sur la structure des communautés et sur l'issue des interactions trophiques en contrôlant notamment la quantité d'éléments fixés par rapport à ceux non assimilés et ceux restitués au milieu. Le caractère plus ou moins phototrophe de la source de nourriture va donc avoir des conséquences sur les brouteurs qui vont tenter de respecter l'homéostasie via une alimentation sélective ou des mécanismes d'excrétions différentielles des éléments P et N.

Les producteurs primaires phototrophes représentent l'interface principale entre les compartiments biotiques et abiotiques, de par leur capacité à produire de la matière organique à partir, d'énergie lumineuse, de CO_2 et d'autres éléments inorganiques. De nombreux travaux expérimentaux ont mis en avant une forte variabilité des ratios C:N:P chez ces organismes (Tilman,1982 ; Grover, 1997). Il semble néanmoins que chaque espèce végétale possède un ratio « optimum » (Rhee et Gotham, 1980), qui diffère d'une espèce à l'autre, et qui détermine quel élément chimique est limitant en fonction du ratio disponible dans le milieu. Contrairement aux producteurs primaires, les consommateurs primaires ou supérieurs se nourrissent exclusivement de matière organique. De ce fait, tous les éléments minéraux nécessaires à leur croissance sont ingérés via la matière organique consommée. Selon le principe d'homéostasie précédemment énoncé, ceci conduit donc les brouteurs à une nécessaire régulation de leur composition chimique. Chez ces consommateurs, même si l'homéostasie n'est pas toujours parfaite, les variations sont bien moindres par rapport à celles rencontrées chez les autotrophes (Andersen et Hessen, 1991).

2.2. LES PREFERENCES ALIMENTAIRES DES BROUTEURS

Les producteurs primaires, telles que la composante algale des biofilms, ont généralement des ratios C:N et C:P plus élevés (faibles quantités d'azote et de phosphore) que les consommateurs primaires tels que les brouteurs. Or les sources alimentaires riches en azote et en phosphore sont considérées comme des sources de bonne qualité puisqu'elles vont avoir des quantités de ces éléments proches de celles des brouteurs, minimisant ainsi la masse de nourriture à ingérer pour satisfaire l'acquisition de ces éléments (Bagett et al., 2013). Les concentrations en azote et en phosphore du biofilm variant selon les conditions environnementales, la qualité du biofilm est donc variable. A ce titre, le biofilm ne

constitue donc pas une source de nourriture qualitativement mais aussi quantitativement stable pour les organismes brouteurs.

Peu d'études ont analysé l'influence de la qualité d'une source alimentaire sur les ratios C:N:P des consommateurs du biofilm. En général, les sources alimentaires de bonne qualité stoechiométrique (présentant des ratios C:N:P proches de ceux des consommateurs) améliorent l'état physiologique des consommateurs et sont préférablement consommées quand elles sont disponibles (Flores et al., 2013). Si la qualité n'est pas assez bonne, certains herbivores mangeront plus pour compenser le manque d'azote ou de phosphore ingérés et assimilés. Bien que cette compensation alimentaire ait été observée chez de nombreux organismes (Simpson et Simpson, 1990 ; Rueda et al., 1991 ; Targett et al., 1990 ; Pennings et al., 1993 ; Stachowicz et Hay, 1996), peu d'études ont évalué la façon dont la compensation alimentaire équilibre les effets de la nourriture de pauvre qualité sur les conditions physiologiques des consommateurs. Certains d'entre eux préfèrent d'ailleurs mixer des nourritures de qualité différente afin d'avoir un régime alimentaire équilibré. D'autres parviennent à réduire leurs besoins en nutriments en ne maintenant que des activités vitales telle que la respiration (Hill et al., 2010).

2.3. DES EFFETS SUR LA CROISSANCE DES BROUTEURS

Il a été démontré à plusieurs reprises qu'il existait un lien fort entre la composition élémentaire des consommateurs et leur taux de croissance (Main et al., 1997 ; Gorokhova et Kyle, 2002 ; Elser et al., 2003 ; Liess et Lange, 2011). Cette relation s'explique par le fait que plus le taux de croissance des organismes est élevé, plus les besoins en ARN ribosomal, permettant principalement la synthèse de protéines nécessaires à la croissance, sont forts. Or, cet ARN ribosomal est particulièrement riche en P. Les variations des taux de P entre les espèces peuvent donc s'expliquer par les différences de P contenu dans l'ARN ribosomal (Elser et al. 2003). Cet effet du taux de croissance sur la teneur en P des organismes (appelé «Growth Rate Hypothesis») peut contraindre les espèces à fort taux de croissance à disposer de grandes quantités de P pour pouvoir se développer (Elser 2006). C'est par exemple le cas pour *Potamopyrgus antipodum,* un gastéropode qui a une teneur en P forte, et qui est particulièrement vulnérable aux limitations physiologiques en phosphore (Tibbets et al.,2010). En se nourrissant d'algues de qualité nutritive médiocre (c'est à dire avec une faible quantité de phosphore), cette espèce ralentit sa croissance, retarde sa maturation et réduit sa capacité de reproduction.

2.4. DES EFFETS SUR LE STOCKAGE ENERGETIQUE DES BROUTEURS

Les indicateurs du bon état physiologique d'un organisme incluent les sources d'énergie qu'il est en mesure d'utiliser pour se déplacer, pour se développer, pour se reproduire et pour assurer son intensité de synthèse protéique (Koop et al., 2010). Le glycogène et les triglycérides sont les principaux substrats chez les insectes et les crustacés capables de stocker le surplus d'énergie et d'en libérer si nécessaire (Hervant et al., 1999).

Les triglycérides apparaissent comme étant les ressources énergétiques les plus efficaces car elles fournissent plus d'ATP par unité de masse que le glycogène (Arrese et Soulages, 2010), en particulier pendant les périodes de reproduction et de jeûne. Mais, contrairement au glycogène, les triglycérides nécessitent toujours de l'oxygène pour être métabolisés. Chez l'amphipode, les concentrations des triglycérides atteignent 1% du poids sec de l'organisme (Hervant et al., 1999) contre 2,5 à 4,5% pour les insectes volants avec une phase larvaire aquatiques (Koop et al, 2008). Ces derniers ont une réserve énergétique plus importante pour permettre le vol. Un déficit en triglycérides peut par ailleurs affecter négativement le développement et la fécondité des gonades (Weber et al., 2003).

La quantification conjointe de ces deux composantes est conseillée car le rapport de la quantité de triglycérides sur la quantité de glycogène n'est pas identique pour une quantité spécifique d'énergie stockée. Pour certaines espèces aquatiques, telles que les sangsues, la majorité de l'énergie est stockée sous forme de glycogène (Koop et al., 2008). Les réserves énergétiques stockées dans le glycogène peuvent être mobilisées beaucoup plus rapidement que celles des triglycérides (Hervant et al., 1999) et peuvent en plus être utilisées en condition anaérobie. Ceci est particulièrement utile lorsqu'il y a un déficit en oxygène dans l'environnement (Grieshaber et al., 1994) ou un mouvement intense. Chez les amphipodes (*Gammarus fossarum*, les concentrations en glycogène peuvent atteindre 10% du poids sec de l'individu (Hervant et al., 1999) contre 1,6 à 6% pour les insectes aquatiques (Koop, 2007).

Un organisme est capable de stocker de l'énergie si l'adsorption d'énergie est supérieure à la demande d'énergie minimale pour assurer les fonctions métaboliques élémentaires nécessaires aux déplacements, à la croissance et à la reproduction. Le stockage d'énergie est donc davantage propice lorsque la nourriture est de bonne qualité stœchiométrique et en quantité suffisante. Le glycogène est stocké principalement dans le foie et les muscles alors que les triglycérides sont présents dans les tissus adipeux. Lorsque les sources nutritives deviennent trop limitées, la plupart des espèces peuvent réduire voire stopper les processus consommateurs d'énergie comme le mouvement par exemple (Koop et al. 2010). Salin et al. (2010) sont arrivés aux mêmes conclusions sur des organismes souterrains aquatiques capables d'accumuler de grandes quantités de triglycérides sur des périodes où l'alimentation est en excès. La quantification des lipides apparait ainsi comme un bon moyen afin d'obtenir des indicateurs de l'état physiologique des gastéropodes face à des modifications des disponibilités en ressources nutritives.

2.5. DES EFFETS SUR LES EXCRETIONS DES BROUTEURS ET LE RECYCLAGE DES NUTRIMENTS

2.5.1. LE RECYCLAGE DES NUTRIMENTS PAR LES BROUTEURS

Afin de respecter l'homéostasie, les organismes vont excréter de manière différente selon ce qu'ils ingèrent. Les nutriments qui n'ont pas été assimilés peuvent être excrétés sous forme dissoute ou sous forme solide (pelotes fécales). On parle d'égestion pour ce dernier cas de figure (Wotton et Malmqvist, 2001), c'est à dire l'élimination des matériaux de nourriture non digérés par l'organisme. Elle représente une fraction importante des nutriments libérés par les consommateurs (Grimm, 1988). Ces deux formes (dissoute et solide) diffèrent fondamentalement dans la manière dont elles vont être recyclées :

- Les produits d'excrétion sont solubles et sont donc, en général, facilement disponibles pour l'absorption immédiate alors que les éléments nutritifs liés à l'égestion doivent être d'abord lessivés et / ou minéralisés avant d'être utilisés.
- Les transports de ces deux formes sont différents. Les pelotes fécales vont en effet se déposer au fond de la colonne d'eau alors que les produits solubles vont pouvoir être transportés par l'eau. Ceci peut engendrer des différences spatiales et temporelles dans les disponibilités de ces produits.
- Les ratios de nutriments de ces produits divergent aussi. Une étude sur la régénération de l'azote et du phosphore sur des poissons du lac Malawi (André et al., 2003) a montré que les pelotes fécales avaient des ratios N:P plus faibles que les particules excrétés (12:1 contre 21 :1). Ceci suggère que l'azote est la plupart du temps libéré sous forme dissoute et le phosphore plutôt sous forme solide. Cette différence peut conduire à une augmentation d'azote dissous dans la colonne d'eau alors que les pelotes fécales vont conduire à une augmentation de la disponibilité en phosphore pour le biofilm.

En conséquence, les pelotes fécales des brouteurs peuvent affecter directement la composition du biofilm en réduisant son ratio C:P si elles sont très riches en phosphore (Liess et Haglund, 2007).

Pour une même nourriture donnée et suivant les principes stœchiométriques, un consommateur ayant des teneurs en éléments nutritifs élevées va libérer moins de nutriments qu'un organisme avec des teneurs plus faibles. Excrétion et égestion dépendent donc tous deux des ratios initiaux des organismes. C'est d'ailleurs ce qu'ont montré Elser et Hassett (1994) en étudiant le phénomène de recyclage des nutriments en milieux marins et lacustres. La limitation en phosphore semble être une caractéristique importante des lacs alors que ce phénomène est moins marqué en milieu marin. Lorsqu'un organisme consomme une nourriture avec un ratio N:P plus élevé que le sien, l'animal assimilera davantage le phosphore et recyclera l'azote. Plusieurs études confirment cet aspect, à travers différentes modélisations mathématiques où le broutage permet d'augmenter les taux de recyclage par excrétion, augmentant ainsi les taux d'approvisionnement en éléments nutritifs (Vanni, 1987 et 1996 ; Elser, 1992).

2.5.2. LES CONSEQUENCES DU RECYCLAGE SUR LE BIOFILM : DES EFFETS INDIRECTS DES BROUTEURS

Les brouteurs vont en effet impacter la teneur en éléments nutritifs du biofilm en fonction de la composition du milieu et de leur propre ratio stœchiométrique. Lorsque l'azote est en condition limitée dans le milieu, la présence des brouteurs augmente la quantité d'azote à la fois dans la colonne d'eau mais aussi dans le biofilm. L'effet est d'autant plus important que les brouteurs présentent une concentration en azote basse. Si c'est le phosphore qui est limité, la présence des brouteurs augmente la quantité de phosphore uniquement dans le biofilm, mais les brouteurs avec une concentration en azote basse ont en plus des effets positifs sur la croissance algale (Hillebrand et al, 2001 et 2004). Cette expérience révèle que les effets indirects des brouteurs sur le biofilm sont contrôlés par des contraintes stœchiométriques et par l'excrétion.

D'autres expériences soutiennent l'idée que le pâturage œuvre pour l'enrichissement en éléments nutritifs du biofilm. Frost et Elser (2002) ont mesuré les ratios C:P d'un biofilm avec des intensités de broutage différentes et ont confirmé que ceux-ci étaient significativement plus faibles avec une forte densité de brouteurs. Hunter et al. (1983) ont fait de même pour les rapports C:N. Cette fois les ratios du biofilm diminuent avec l'intensité de broutage. En outre, les algues produisent plus de chlorophylle en présence de brouteurs, peut-être dans le but de compenser les pertes liées au broutage direct.

3. POSITIONNEMENT DU SUJET ET HYPOTHESES TESTEES

Le développement futur de techniques d'ingénierie écologique dans la gestion et l'amélioration de la durée de vie des ouvrages d'infiltration s'appuie, entre autres, sur les relations trophiques existant entre les brouteurs et les biofilms qu'ils consomment. Le LEHNA propose en effet d'instaurer des gastéropodes brouteurs dans les bassins d'infiltration de Crépieux-Charmy afin de lutter contre le colmatage des sédiments lié aux biofilms algaux.

L'analyse bibliographique a mis en avant l'activité nutritive des brouteurs sur les biofilms qui tend à réduire la densité de ces derniers, ainsi que la diversité de composition des biofilms. Ceux-ci vont ainsi présenter des qualités stœchiométriques différentes selon s'ils sont majoritairement phototrophes ou hétérotrophes. Les brouteurs semblent assimiler davantage les algues que les bactéries, bien que ces dernières soient une nourriture de meilleure qualité stœchiométrique possédant les ratios élémentaires les plus proches de ceux des organismes hétérotrophes. Les réponses que vont développer les brouteurs après consommation des biofilms vont également dépendre de la quantité de ces sources alimentaires. Peu d'études ont toutefois analysé l'influence de la qualité d'une source alimentaire sur l'état physiologique des bouteurs et sur leurs ratios élémentaires C:N:P. Or ces points se doivent d'être approfondis pour savoir si l'instauration de brouteurs dans les bassins d'infiltration est une solution pérenne dans le temps et quelle que soit la qualité alimentaire des interfaces « eau-

sédiments » de ces bassins. Sur les bassins d'infiltrations, les qualités stœchiométriques des ressources alimentaires dépendent du degré de phototrophie des interfaces « eau-sédiment ».

La synthèse bibliographique démontre la pertinence des réserves énergétiques et de la croissance comme indicateur de bon état physiologique des brouteurs. Notre approche expérimentale a donc pour objectif de répondre aux questions suivantes :

- Comment la qualité nutritive des biofilms impacte-t-elle la croissance et le stockage énergétique des brouteurs ?
- L'homéostasie des brouteurs peut-elle être modifiée par la qualité nutritive des ressources alimentaires ?

HYPOTHESE TESTEE :

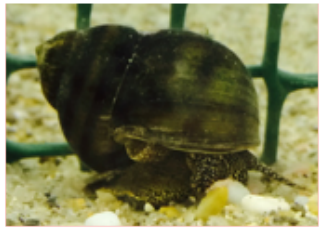
Les sources alimentaires favorisant le bon état physiologique des brouteurs (constitution de réserves énergétiques…) sont celles qui présentent une meilleure qualité stœchiométrique ; c'est à dire celles qui présentent des ratios élémentaires C:N:P proches de ceux des consommateurs. Cette hypothèse se situe dans une approche qualitative.

HYPOTHESE ALTERNATIVE :

L'état physiologique des brouteurs dépend des concentrations en éléments chimiques (carbone, azote, phosphore) des ressources alimentaires, quels que soient les ratios élémentaires de celles-ci. Cette hypothèse se situe dans une approche quantitative.

Figure 1 : Les interactions "biofilms - brouteurs"

BROUTEUR



- Biomasse algale
- Diversité algale et création d'hétérogénéité spatiale
- Activité photosynthétique

- Activité bactérienne
- Biomasse bactérienne

Egestion

Libération de P sous forme solide

Excrétion

Libération de N sous forme dissoute

Biofilm : source alimentaire de composition et de qualité variable

	Biofilm majoritairement autotrophe	Biofilm majoritairement hétérotrophe
Hypothèse testée	Ratios C:N:P élevés par rapport aux ratios C:N:P des brouteurs = qualité moyenne	Ratios C:N:P proches des ratios C:N:P des brouteurs = bonne qualité
	Bonne assimilation	Assimilation moyenne
Hypothèse alternative	Quantités élevées en C, N et P	Quantités faibles en C, N et P

Modification des ratios stœchiométriques du biofilm

Homéostasie | Croissance | Stockage énergétique

- Comment la qualité nutritive des biofilms impacte-t-elle la croissance et le stockage énergétique des brouteurs ?
- L'homéostasie des brouteurs peut-elle être modifiée par la qualité nutritive des biofilms ?

Effets directs des brouteurs sur le biofilm

Effets indirects des brouteurs sur le biofilm

Réponses des brouteurs en fonction de la source alimentaire ingérée

Problèmes soulevés

MATERIELS ET METHODES

Cette partie vise à présenter les stratégies et les choix expérimentaux mis en œuvre pour tester les hypothèses développées précédemment.

L'objectif est de tester les effets de la qualité de trois sources de nourritures différentes sur la constitution des réserves énergétiques (glycogène, triglycérides, protéines) et sur les taux de croissance d'un brouteur, Viviparus viviparus. La stœchiométrie de ces individus sera également déterminée afin d'évaluer si elle varie en fonction de la qualité de la nourriture.

1. CONDITIONS EXPERIMENTALES

1.1. CHOIX DE L'ORGANISME MODELE

Dans notre étude, nous avons choisi le brouteur *Viviparus viviparus* (Linnaeus, 1978), en photographie sur la figure 2. Il s'agit d'un gastéropode prosobranche mesurant de 2 à 4 cm de hauteur, pour 2 à 3 cm de largeur à l'âge adulte. Leur coquille épaisse est de couleur jaune à brun verdâtre avec trois lignes plus foncées, et spiralée à enroulement dextre - ouverture à droite de l'axe médian lorsque la coquille est tenue verticalement, pointes-en haut et ouverture vers soi. Cette espèce est dioïque, c'est-à-dire que les deux sexes sont présents et différenciés. Les mâles se distinguent des femelles par leur tentacule droite, plus épaisse et transformée en organe copulatoire. Ces animaux vivent sur différents supports (rocheux, sableux, ou organiques), dans des cours d'eau à débit lent ou parfois dans des bassins d'eau stagnante. On les retrouve partout en France - notamment dans les lônes du Rhône en région lyonnaise - exceptées dans les régions méditerranéennes (Kupfer et Corolla, 2014).

Ces gastéropodes sont herbivores – détritivores et se procurent leur nourriture à la fois par broutage et par filtration dans une moindre mesure (Hockelmann et Pusch, 2000). Ils se nourrissent principalement de détritus si c'est la source de nourriture la plus abondante, cette part peut constituer jusqu'à 90% des aliments ingérés (Jakubik, 2009). En revanche, si les algues sont abondantes, et c'est le cas dans certains des bassins étudiés, les *V. viviparus* se comportent en brouteurs et consomment principalement des algues vertes et des diatomées (Liess et Kahlert, 2007 ; Jakubik, 2009).

Les *Viviparus viviparus* sont par ailleurs des organismes ovovivipares, mode de reproduction dans lequel les œufs incubent et éclosent dans le ventre de la mère, sans relation nutritive avec celle-ci. La femelle donne donc naissance à des individus entièrement formés. L'ovoviviparité offre une protection pour les jeunes organismes en développement. Leur rôle de brouteur, leur caractère autochtone ainsi que leur grande taille facilitant leur encagement font des *Viviparus viviparus* des candidats idéaux pour être utilisés dans le cadre de notre étude.

Figure 2 : Photographie d'un *Viviparus viviparus*, mâle

1.2. CONDITION D'ELEVAGE DES *VIVIPARUS VIVIPARUS*

Les essais ont été effectués sur des individus précédemment prélevés dans une lône du Rhône au Nord-Est de l'agglomération lyonnaise en novembre 2015. L'ensemble des organismes collectés a été placé dans des aquariums de laboratoire disposés dans une pièce permettant une régulation de la température et de la lumière (température ambiante de 18°C, photopériode de 12 heures) durant les six mois précédant l'expérience.

Les aquariums ont été remplis d'1 cm de sable et de 20 L d'eau déchlorée du réseau. Un bulleur a assuré de manière continue l'oxygénation de l'eau. Les gastéropodes introduits avaient des coquilles mesurant entre 20 et 30 mm de hauteur. Durant ces 6 mois, les *Viviparus viviparus* ont été nourris avec de la TetraMin deux fois par semaine. Le taux de mortalité a été très faible pour cette classe de taille : seulement 0,6 %.

Cette démarche a eu pour objectif d'homogénéiser leur état physiologique avant la réalisation des essais.

1.3. LES SOURCES DE NOURRITURE

Trois traitements ont été testés :

- **La TetraMin**, nourriture pour poissons aux apports protéiques, lipidiques et glucidiques connus et utilisée pour alimenter les *Viviparus viviparus* préalablement à notre essai. Le taux de mortalité pendant les six mois d'acclimatation étant très faible (0,6 %), ce traitement permet de valider le déroulement de notre expérience (témoin). Lorsque la TetraMin devient peu visible dans un des encagements, un apport de 250 mg de cette ressource est apporté dans chaque encagement. Cela correspondait en pratique à une fréquence de deux fois par semaine.

- **Des algues**, directement prélevées sur le bassin d'infiltration 2.2 du champ captant de Crépieux-Charmy le 10 mai 2016. Seule la composante algale du biofilm (en pratique les trois premiers millimètres de biofilm à la surface des sédiments, figures 3 et 4) a été introduit afin de tester l'influence d'une source de nourriture majoritairement phototrophe. Alstyne (1988) a montré qu'au bout de 15 jours, certaines algues augmentaient leurs défenses polyphénoliques, ce qui réduisait l'activité de broutage. Les algues ont donc été congelées le jour même (-20°C) puis lyophilisées. Un apport complémentaire de 250 mg par encagement de ces algues lyophilisées a été apporté lorsque la quantité en algues dans un encagement était visiblement insuffisante.

- **L'horizon sédimentaire** hétérotrophe situé en dessous des 3 mm du tapis algal (figure 4). Celui-ci a été prélevé le même jour et sur le même bassin que les algues. La quantité prélevée a été placé en chambre froide à 4°C pendant la durée de l'expérience. Une épaisseur d'1 cm a été placée dans les aquariums correspondants. Un apport hebdomadaire de 130 g a été apporté dans chaque encagement.

Nous avons choisi deux situations extrêmes, c'est à dire sans mélange de composantes hétérotrophes avec des composantes autotrophes, afin d'éviter les situations de préférence ou de compensation alimentaire décrites par Cruz-Rivera et Hay (2000).

Figure 4 : Composante algale du biofilm

Figure 3 : Photo d'une coupe de substrats de bassin, VEOLIA

1.4. PLAN EXPERIMENTAL

Quatre réplicats d'aquarium sont utilisés pour les 3 différents traitements. Le fond des 12 aquariums est rempli avec 1 cm de sable (calibré et brûlé) et 20 L d'eau déchlorée du réseau. La température de l'eau est maintenue à 18 °C (travail en chambre thermostatée). L'eau est oxygénée de manière continue via un bulleur (figure 5). La moitié de l'eau est renouvelée chaque semaine afin de maintenir des caractéristiques physico-chimiques constantes. Un cycle jour nuit 12/12 est programmé en contrôlée limitée en lumière en suivant les conditions expérimentales utilisées par Burgmer et al. (2010) sur *Bithynia tentaculata* et *Theodoxus fluviatilis* (intensité de 2,0 photon µmol.m^{-2}.s^{-1} au fond des aquariums et 2,45 photon µmol.m^{-2}.s^{-1}).

Neuf escargots sont placés dans chaque aquarium (soit 36 par traitement), séparés en trois lots de 3 escargots par un grillage en plastique (maille de 0,5 cm). Une densité d'environ 100 individus m^{-2} est ainsi maintenue dans chacun des encagements aux différents temps de prélèvement, ce qui simule une densité réaliste du terrain (Liess et Kahlert, 2007). Chaque encagement contient une femelle et deux mâles et sont identifiés par un code individuel au correcteur liquide blanc .

La nourriture est placée en excès pour les trois sources avec des apports répétés en algues, en sédiment et en TetraMin lorsque c'est nécessaire. Le rapport C:N de chaque source de nourriture a été mesuré avant le début de l'expérimentation. Le Carbone Organique Total (COT) et l'azote total (NT) ont été déterminés à l'aide d'un analyseur élémentaire (FlashEA, Thermo Electron Corporation).

L'expérimentation a duré 45 jours. D'après Hervant et al. (1999), les changements d'état physiologique dus à des changements environnementaux se manifestent entre deux et trois semaines. Pour caractériser l'état physiologique au $t_{0,}$ les réserves de 12 gastéropodes sont évaluées initialement. Ensuite, 3 *Viviparus viviparus* par aquarium (soient 12 par traitement) sont prélevés à t_1=15 jours, t_2=30 jours et t_f=45 jours afin de quantifier leurs réserves énergétiques (glycogène, triglycérides, protéines). Ceci revient à collecter les organismes présents dans un compartiment (figure 5) pour chauqe aquarium à chaque temps de prélèvement. Cette procédure (avec des compartiements) permet de maintenir une densité constante en individus durant toute la durée de l'expérimentation. Des mesures physico-chimiques ont aussi lieu sur la colonne d'eau chaque semaine avant le renouvellement de 50 % du volume d'eau.

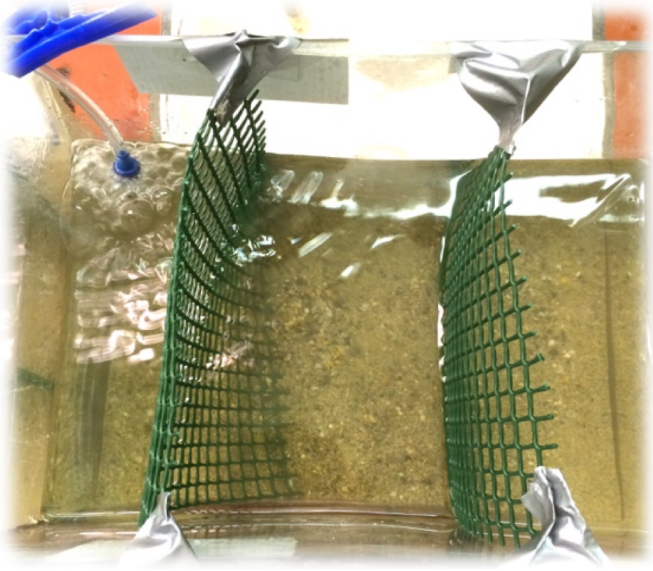


Figure 5 : Mise en place des encagements dans les aquariums

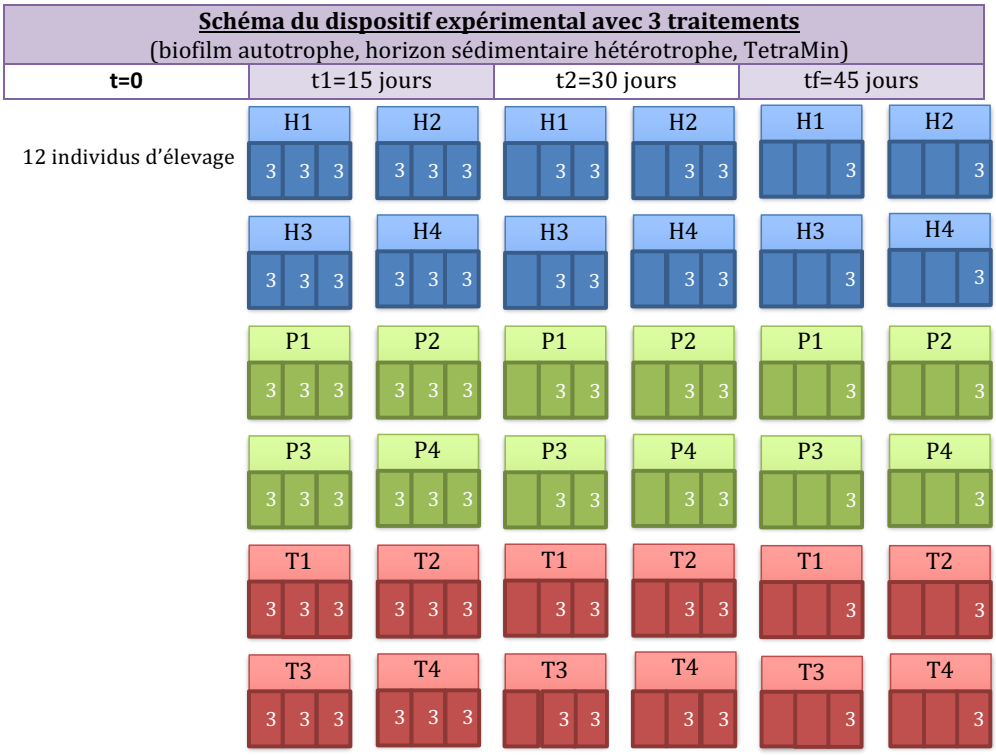
Figure 6 : Ensemble des aquariums de l'expérience

1.5. SUIVI DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DES AQUARIUMS

Des mesures sur la colonne d'eau sont réalisées à t0, t1, t2, et tf, avant que le renouvellement d'eau ait lieu. Afin de vérifier l'état du système pour les *Viviparus viviparus*, le pH, la conductivité et l'oxygénation de la colonne d'eau sont donc mesurées de manière hebdomadaire au moyen d'une sonde multiparamétrique HQ40D (HACH). Les *Viviparus viviparus* préfèrent en effet les eaux neutres et stables (Jakubik, 2009).

1.6. CONCENTRATION EN NO_3^-, NH_4^+ ET PO_4^{3-}

Des échantillons d'eau de chaque aquarium sont également prélevés de manière hebdomadaire au moyen d'une seringue et un volume d'eau de 40 mL est filtré à 0,7 µm (filtre Whatman GF/F, Maidstone, U.K.). L'eau filtrée est stockée à 4 °C pour le dosage ultérieur de la concentration en nutriments (NO_3^-, NH_4^+ et PO_4^{3-}). Ce suivi hebdomadaire permet d'enregistrer d'éventuelles variations des quantités de nutriments (nitrates, phosphates, ammonium) dans la colonne d'eau qui pourraient influencer le développement des communautés microbiennes et des macrophytes. Les mesures ont été réalisées avec un analyseur de nutriments Easychem plus (Systea, Anagni, Italia). En fonction du nutriment mesuré, des réactifs précis sont mélangés à un certain volume d'échantillons. La coloration de la solution est alors mesurée par spectrophotométrie. Elle est ensuite comparée aux valeurs de colorations obtenues pour des standards.



Sources de nourriture :

H — Horizon sédimentaire **hétérotrophe**

P — Algues – biofilm **autotrophe**

T — TétraMin

Le chiffre à coté des lettres correspond au numéro de réplicat.

X — Encagements placés dans l'aquarium avec X le nombre d'individus présents avant le prélèvement t.

Au total : utilisation de 12 aquariums et de 120 escargots.

Figure 7 : Schéma du dispositif expérimental

2. ETAT PHYSIOLOGIQUE DES VIVIPARUS VIVIPARUS

2.1. DOSAGE DES RESERVES ENERGETIQUES

Deux jours avant d'être congelés, les *Viviparus viviparus* sont privés de nourriture afin de vider leurs contenus gastriques. Ils sont ainsi placés dans de l'eau du réseau déchlorée. Les mesures sont effectuées sur 12 individus à t=0 et sur 12 individus de chaque traitement (3 individus par aquarium et 4 réplicats par traitement) à t_1=15 jours, t_2=30 jours et t_f=45 jours. Les individus utilisés pour mesurer les stocks d'énergie ont été préalablement lyophilisés et broyés finement (utilisation d'un broyeur à billes). Les *Viviparus viviparus* sont ensuite stockés à -25°C avant analyse. Les mesures sont effectuées à l'échelle de l'individu. L'extraction et les analyses du glycogène et des triglycérides ont été effectuées selon les protocoles utilisés par Hervant et al., 1995 et Hervant et al., 1996. Toutes les analyses ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre Aquamate (Thermo) à 25°C. Un protocole spécifique a été suivi pour les trois dosages.

2.1.1. DOSAGE DES TRIGLYCERIDES

Pour chaque organisme, 4 mL de Folch 2/1 (= 1 volume de méthanol + 2 volumes de chloroforme) ont été ajoutés, dans des tubes à hémolyse en verre, aux 30 mg de tissus préalablement pesés. Après 30 minutes, ces tubes ont été placés 5 minutes au bain marie (BM à 40°C) après ajout d'1,2 mL de KCl (2 g/L). Cette étape permet de séparer la fraction supérieure (méthanol + KCl) de la fraction inférieure (chloroforme + lipides totaux, dont triglycérides) qui nous intéresse (figure 8). Un volume de 1,5 mL de la fraction inférieure a été récupéré (soit 56% de cette fraction) dans un deuxième tube à hémolyse en verre. Ceux-ci ont ensuite été évaporés sous vide dans un rotavap à 45°C et sous hotte (environ 45' en position V-AL) pour l'évaporation afin d'éviter l'oxygénation des lipides. A l'issue de cette étape, les gouttes de lipide obtenues sont mélangées à 0,5 mL de solution TX (0,2%) + BSA délipidée (3 %). La dernière étape consiste à doser 0,1 mL de ce mélange contre 0,9 mL de solution KITG à 540 nm, contre une gamme glycérol (solution mère à 2,5 mg/mL diluée par 2,5 dans du TX), à 540 nm. Les résultats obtenus sont pondérés par la masse sèche de chaque individu.

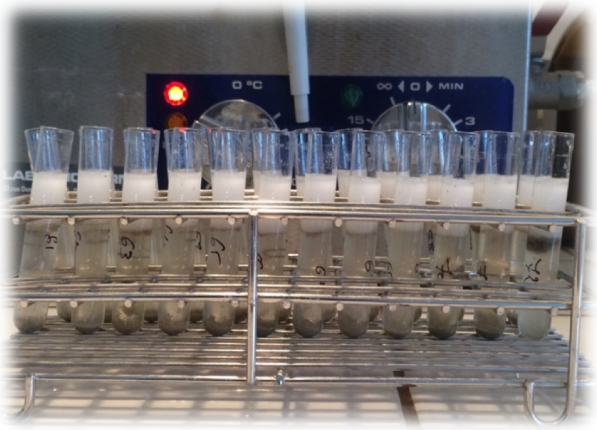


Figure 8 : Séparation des deux fractions au cours de l'extraction des lipides

2.1.2. DOSAGE DU GLYCOGENE

Pour chaque organisme, 1,5 mL de NaOH à 1,5N ont été ajoutés, dans des tubes à hémolyse en PE, aux 30 mg de tissus préalablement pesés. Après 20 minutes, ces tubes ont été placés 40 minutes au bain marie (BM à 75°C). Un broyage à l'ultra-turrax a été nécessaire au cours de cette incubation. 0,8 mL (soit 53,3 % de la fraction de 30 mg) de cette solution ont ensuite été prélevés et mélangés à 4 mL d'éthanol 96 %. Ces mélanges éthanol/NaOH sont mis au repos 12 h à 4°C. Les 0,7 mL restants sont conservés pour le dosage des protéines.

Après la phase de repos, les tubes sont centrifugés et le surnageant de chaque tube est extrait afin de ne conserver que le culot du glycogène au fond. Un mL de solution glucyl dans du tampon NaF est ensuite ajouté dans chaque tube avant d'être placé 30 minutes au bain marie à 38°C. Le glucose obtenu est alors dosé avec le kit GluHK (à 340 nm après 15'). On obtient alors les colorations présentes sur la figure 9. Les résultats obtenus sont pondérés par la masse sèche de chaque individu.

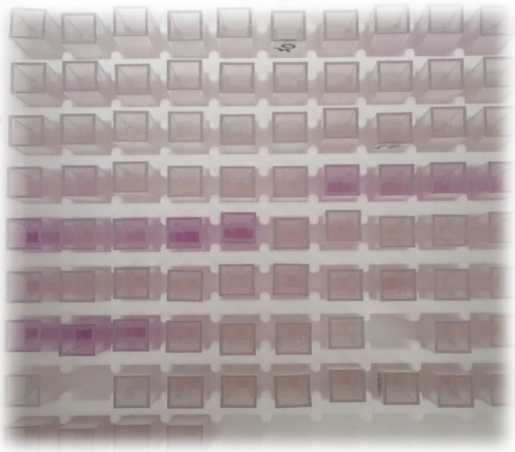


Figure 9 : Dosage du glycogène après ajout du kit GluHK

2.1.3. DOSAGE DES PROTEINES

Les résultats obtenus pour le glycogène et les triglycérides sont rapportés à la quantité de protéine par masse sèche de chaque organisme afin de normaliser l'ensemble des données. En effet, les biais liés à des pesées hétérogènes (collecte de tissus de nature différentes mal broyés (muscles ou viscères) par exemple) seront ainsi limités en rapportant les données de lipides à une quantité de protéine (tissu musculaire essentiellement) obtenue pour les mêmes extraits d'échantillons.

Ainsi, l'extraction des protéines s'effectue suivant le même protocole que le glycogène en conservant les 0,7 mL d'extrait restant. Un volume de 0,8 mL de réactif de Lowry est ajouté à 100 µL de la solution précédente. Après une phase d'incubation à température ambiante de 20 minutes, 400 µL de réactif de Folin sont insérés dans les tubes. Un ml de la solution est finalement dosé par spectrométrie (lecture de la densité optique à 750 nm). Notons que 4 tubes contenant 0, 10, 20 et 30 mg de BSA (à la place

des 30 mg de *Viviparus* viviparus) ont été traités de la même manière (bain-marie et ultra-turrax) afin de produire une gamme étalon.

2.2. MESURE DU TAUX DE CROISSANCE

Nous avons choisi de suivre la croissance des *Viviparus viviparus* vivant le plus longtemps dans notre expérience, c'est à dire ceux qui sont prélevés à tf (soit 36 individus). Ils ont été mesurés aux instants t0 et tf à l'aide d'un pied à coulisse numérique dans le sens suivant (Jakubik, 2009) :

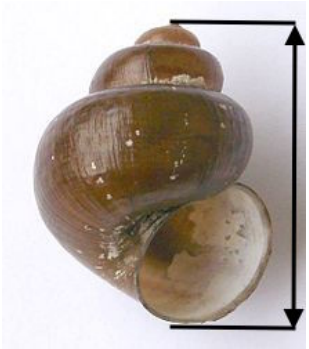


Figure 10 : Position de la mesure de la hauteur des escargots

3. MESURE DES TENEURS EN CARBONE (C), AZOTE (N) ET PHOSPHORE (P) DES INDIVIDUS ET DES SOURCES DE NOURRITURE

3.1. MESURES EFFECTUEES SUR LES *VIVIPARUS VIVIPARUS*

Le but est de déterminer les quantités de carbone organique et azote total contenues dans les différents individus pour étudier leurs ratios élémentaires. Un échantillon par organisme a été préparé sur lequel un réplicat de mesure a été effectué. Seuls les *Viviparus viviparus* du temps tf ont été analysés (après congélation, lyophilisation et broyage suivant le même protocole que celui utilisé pour les réserves énergétiques). Les teneurs en carbone et en azote sont réalisées sur un analyseur élémentaire Flashea 1112 (Thermo scientific). Son principe repose sur une combustion à haute température des échantillons, précédemment pesés dans des creusets d'étain, dans un four rempli d'oxydant (oxydes de cuivre et de cobalt) à 900°C, sous apport d'oxygène pour que la combustion soit complète, notamment pour qu'il n'y ait pas de production de monoxyde de carbone (CO). Cette combustion produit du CO_2 et différents oxydes d'azote qui passent dans un second four (four de réduction). Tous les oxydes d'azote sont alors réduits en diazote N_2. L'eau est piégée et les gaz passent dans une colonne chromatographique qui retient le CO_2 pour faciliter la lecture. Les variations de gaz sont détectées en sortie par un pont de diode, qui va repérer un pic de N_2 puis un pic de CO_2 retardé. Avant de lancer les échantillons, un calibrage est nécessaire à l'aide de standards de sol dont on connait les concentrations en carbone et azote. Ces mesures ont été réalisées en collaboration avec l'équipe E3S du LEHNA.

En ce qui concerne le phosphore total, on applique la méthode d'extraction et de dosage développée Murphy et Riley (1958). Pour chaque individu, une masse sèche (30 mg) d'échantillon broyé est minéralisée à 120°C sous condition acide (H_2SO_4, 3,6 N en solution finale) avec un oxydant fort (persulfate de potassium) afin de transformer tout le phosphore en phosphate. Ensuite, le phosphate est dosé par méthode colorimétrique. Cette dernière consiste à former un complexe molybdate-phosphore jaune instable dans une matrice H_2SO_4 qui est réduit par de l'acide ascorbique pour former un complexe stable coloré en bleu. La densité optique est ensuite mesurée à 880 nm ; la coloration étant stable de 10 minutes à 20 heures après sa formation. Une courbe de calibration est effectuée en parallèle pour quantifier la quantité de phosphate dans les échantillons et ainsi retrouver la quantité de phosphore par masse sèche d'individu.

3.2. MESURES EFFECTUEES SUR LES SOURCES DE NOURRITURE

Les mêmes protocoles que ceux présentés précédemment sont utilisés pour mesurer les teneurs en C, N et P sur les sources de nourriture, mais en réalisant trois mesures distinctes pour chaque source. Comme pour les organismes, la TetraMin et les algues lyophilisées ont été broyées avant les pesées. Un seul changement a été réalisé en ce qui concerne l'analyse du C et du N sur l'horizon sédimentaire hétérotrophe. Une phase d'acidification des sédiments (solution d'HCl à 2 mol/L) a été nécessaire afin d'éliminer le carbone inorganique présent dans les échantillons. Cette étape est répétée jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'effervescence. On utilise dans ce cas des creusets en argent capables de résister à l'acidification. La démarche pour faire la mesure consiste à passer les échantillons à l'étuve à 80 °C pendant 24 heures avant passage à l'analyseur élémentaire.

4. MESURES DES EXCRETIONS EN NUTRIMENTS

Pour les excrétions, nous avons choisi de travailler uniquement avec les individus prélevés à l'instant tf, les mesures sont réalisées à l'échelle de l'individu pour tous les aquariums. Chaque escargot est retiré de l'aquarium et subi 3 rinçages externes de la coquille (successivement à l'eau du réseau, à l'eau du réseau déchlorée et à l'eau de chimie contrôlée). Ils sont placés de manière individuelle dans des béchers de 400 mL (figure 11). Chaque bécher est rempli avec 200 mL d'eau de chimie contrôlée (protocole US EPA). L'eau mise en début d'expérimentation dans les béchers est collectée et prélevée (mesure initiale, t0, réalisation de 3 réplicats).

Des prélèvements d'eau de chaque bécher (20 mL) sont effectués aux temps d'incubation t1 = 2 heures, et t2 = 4 heures). Chaque prélèvement est filtré à 0,7 µm (filtre Whatman GF/F, Maidstone, U.K.) et doit être précis afin de connaître le volume restant dans le bécher (celui-ci permettant de calculer la masse de nutriments présents à chaque temps d'incubation). Les mesures des concentrations en nutriments (NO_3^-, NH_4^+ et PO_4^{3-}) sont réalisées avec un analyseur de nutriments Easychem plus (Systea, Anagni, Italia). Les quantités de nutriments excrétées pour chaque temps sont ensuite recalculées, en prenant en compte les quantités prélevées aux temps précédents. La relation

entre élément excrété et le temps étant linéaires, nous avons pu obtenir des quantités excrétées par heure grâce aux pentes de chaque graphique.

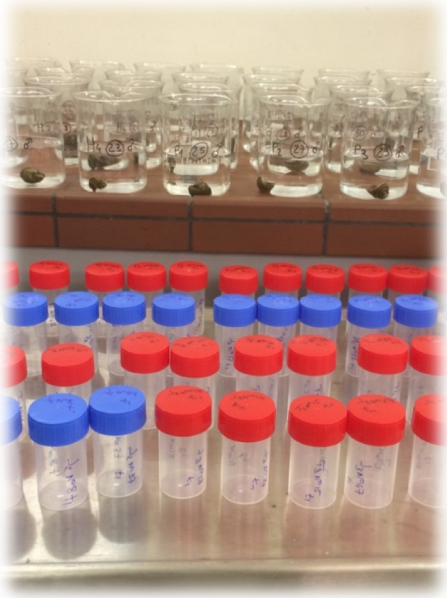


Figure 11 : préparation des béchers et des prélèvements d'eau pour mesurer les quantités de nutriments excrétés

Remarques : *Un protocole avait également été mis en place pour prélever dans ces béchers les pelotes fécales de chaque individu afin de les de quantifier leur teneur en carbone, en azote et en phosphore. Cependant celui-ci n'a pas pu être réalisé en raison des trop faibles quantités prélevées pour certains organismes. Les masses étaient effectivement trop faibles pour pouvoir être détectées par l'analyseur élémentaire.*

5. MODE DE TRAITEMENT DES DONNEES

5.1. REPRESENTATIONS GRAPHIQUES

Il permet une visualisation des valeurs moyennes et des écarts types de certaines variables. L'ensemble des histogrammes ont été réalisés sous Microsoft Excel 2015 (version 15.13.3, Copyright 2015, Microsoft). Tous les graphes ne sont pas exposés, nous nous concentrons sur les plus explicites. Notre démarche consiste à comparer les différents traitements entre eux.

5.2. TRAITEMENT STATISTIQUE

Les qualités des trois sources nutritives (% de carbone, % d'azote, % de phosphore, ratio élémentaire C:N, C:P) ont été comparées avec des analyses de variance à un facteur (ANOVA I). Le même type

d’analyse a été réalisé pour mesurer l’influence des sources nutritives sur les taux d’excrétion (en N et P) mesurés en fin d’expérimentation. Des analyses de variance à deux facteurs (ANOVA II) ont permis de mesurer l’influence du traitement (source de nourriture apportée) et du temps sur l’état physiologique des organismes (triglycérides/protéines et glycogène/protéines). Des tests post-hoc de Tukey (HSD) sont utilisés pour déterminer si des différences significatives par paires sont observées entre les traitements et les temps. Pour toutes les variables, la normalité et l'homoscedasticité des résidus sont testés avec le test de Shapiro-Wilk et le test de Levene, respectivement. La significativité des tests statistiques a été accepté pour un risque de première espèce $\alpha<0.05$.

L’ensemble des analyses a été traité à l’aide du logiciel R v3.1.1 (2014-07-10, The R Foundation for Statistical Computing), disponibles à l’adresse http://cran.r-project.org/.

RESULTATS ET DISCUSSION

Cette partie a pour objectif de présenter les différents résultats obtenus grâce aux protocoles précédemment décrits. Les caractéristiques initiales des trois sources de nourriture et celles des Viviparus viviparus seront d'abord développées. Leur état physiologique sera ensuite étudié plus en profondeur, avec un premier regard sur leur croissance puis un deuxième regard sur leur capacité ou non à faire des réserves énergétiques. Enfin, les résultats de l'expérience des excrétions en nutriments seront décrits.

Ils seront alors discutés afin de valider ou non nos hypothèses initiales.

Remarques :
Pour simplifier la lecture des graphiques et des tableaux, les différents traitements seront désignés et repérés par le code suivant :
- l'horizon sédimentaire hétérotrophe sera désigné par le terme « sédiment » et sera représenté en bleu dans l'ensemble des figures ;
- l'horizon sédimentaire auto-phototrophe sera désigné par le terme « algues » et sera représenté en vert dans l'ensemble des figures ;
- la TetraMin sera représentée en orange.

1. PRESENTATION DES RESULTATS

1.1. CARACTERISTIQUES INITIALES DES SOURCES DE NOURRITURE

Pour caractériser les trois sources de nourriture (les algues, le sédiment et la TetraMin), nous avons utilisé les données obtenues par analyse élémentaire et par extraction-dosage du phosphore. Chaque source de nourriture a été apportée en excès et présente des concentrations en éléments chimiques et des ratios élémentaires stœchiométriques qui lui sont propres. Le tableau suivant regroupe les différents résultats obtenus :

Tableau 1 : Caractéristiques initiales des différentes sources de nourriture

Source de nourriture	mg C / mg de matière sèche	mg N / mg de matière sèche	µg P / mg matière sèche	Ratio élémentaire C:N	Ratio élémentaire C:P
Sédiment	2,1 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	**9,74 ± 0,16**	149,38 ± 27,25
Algues	19,1 ± 0,1	1,5 ± 0,1	3,0 ± 0,5	**14,73 ± 0,04**	170,44 ± 26,85
TetraMin	45,1 ± 0,7	6,5 ± 0,1	7,4 ± 0,3	**8,13 ± 0,02**	157,24 ±7,42

Les trois sources de nourriture présentent des concentrations en carbone, azote et phosphore significativement différentes (p-values < 0,001 pour les trois éléments). La TetraMin est la source la plus riche pour les trois éléments mesurés. Ces éléments chimiques sont par ailleurs 8 à 9 plus concentrés dans le traitement autotrophe que le traitement phototrophe. Concernant les ratios élémentaires stœchiométriques :

- Les ratios C:N sont également significativement différents entre les sources nutritives (p-values < 0,001). Les tests de Tukey indiquent des différences significatives en C:N entre les trois sources nutritives. Les ratios C :N les plus élevés sont mesurés chez les algues, suivis du sédiment et enfin de la TétraMin.
- Les ratios C:P, au contraire, ne sont pas différents de manière significative entre les sources nutritives (p-value = 0,72).

Nous choisissons donc le ratio C:N pour caractériser la qualité stœchiométrique des sources nourriture.

1.2. CARACTERISTIQUES DES *VIVIPARUS VIVIPARUS*

Au cours des 6 semaines d'expérience, **aucun gastéropode n'est mort quelle que soit la source de nourriture** proposée dans les aquariums. L'étude physico-chimique a par ailleurs révélé que les conditions environnementales sont restées stables dans les aquariums au cours des semaines et des changements d'eau. Les données obtenues sont les suivantes :

- Température = 18,6 ± 0,1 °C
- pH = 8,4 ± 0,1
- 0xygène dissous = 9,4 ± 0,1 mg/L
- Conductivité = 340 ± 20 µS/cm
- Les concentrations en ammonium (0,11 mg/L ± 0,07), en phosphate (0,06 mg/L ± 0,03), en nitrate (2,67 mg/L ± 0,7) et en nitrites (0,14 mg/L ± 0,08) sont également restées stables dans chaque aquarium au cours du temps.

Voici les résultats obtenus concernant les ratios stœchiométriques de *Viviparus viviparus* :

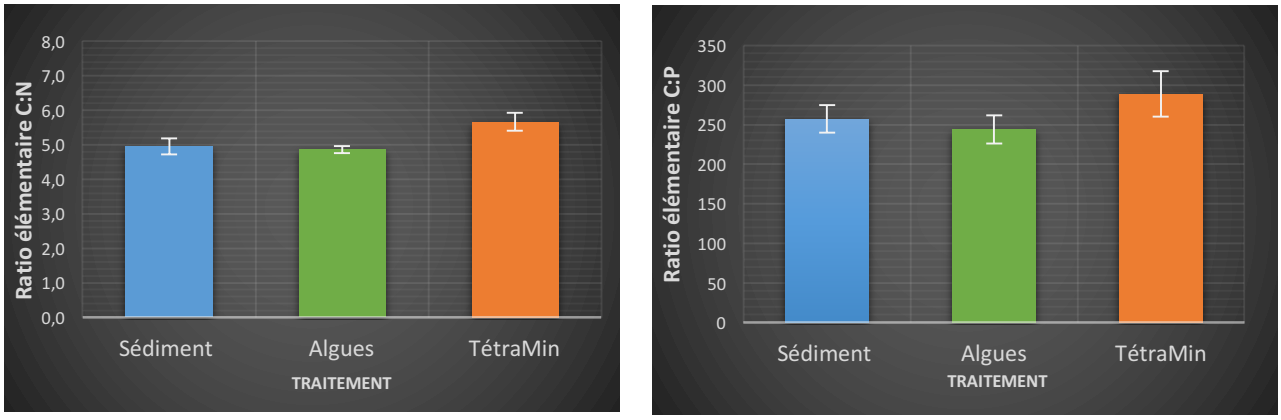


Figure 12 : Ratios élémentaires C:N et C:P de Viviparus viviparus en fonction des sources de nourriture

Le ratio C:P des organismes ne varie pas significativement en fonction des sources nourritures avec une valeur de 264 ± 21 (p-value = 0,165). Ce constat est différent avec le ratio C:N des organismes puisque la nutrition avec du TetraMin conduit en des C:N plus élevés que les des deux autres sources de nourriture (p-value < 0,001). Les algues et le sédiment conduisent en des ratios C:N comparables (4,9 ± 0,1) pour les gastéropodes (p-value = 0,87). Dans tous les cas, le ratio C:N des *Viviparus viviparus* est inférieur à ceux des trois sources de nourriture, la TetraMin étant celle qui a le ratio le plus proche des organismes.

La Tetramin apparaît donc comme étant la source de meilleure qualité stœchiométrique, suivie des algues et du sédiment.

1.3. INFLUENCE DE LA NOURRITURE SUR LA CROISSANCE DES *VIVIPARUS VIVIPARUS*

Comme illustré dans le tableur final en annexe, aucune évolution de la taille de la coquille (selon la méthode développée dans la partie « matériels et méthodes ») n'a été observée. Le taux de croissance des *Viviparus viviparus* n'est donc pas, dans notre cas d'étude, un critère utilisable pour caractériser leur état de santé des gastéropodes. Ceci peut éventuellement s'expliquer par une durée d'expérience qui a été trop courte pour que l'on puisse observer des évolutions significatives, ou alors par une classe de taille des escargots insérés dans les aquariums à t0 non adaptée à une telle mesure. Des mesures

de taux de croissance auraient en effet pu être réalisées sur des escargots plus jeunes, et donc plus petits. Nous orientons donc notre raisonnement sur le stockage des réserves énergétiques.

1.4. INFLUENCE DE LA QUALITE STOECHIOMETRIQUE DES SOURCES DE NOURRITURE SUR LE STOCKAGE ENERGETIQUE DES *VIVIPARUS VIVIPARUS*

Cette partie vise à déterminer si le ratio élémentaire C:N des sources de nourriture, qui est unique à chaque source nutritive (cf 1.1), a un effet sur les réserves énergétiques de *Viviparus viviparus.*

1.4.1 EFFET SUR LES RESERVES LIPIDIQUES

Concernant les triglycérides voici les résultats obtenus :

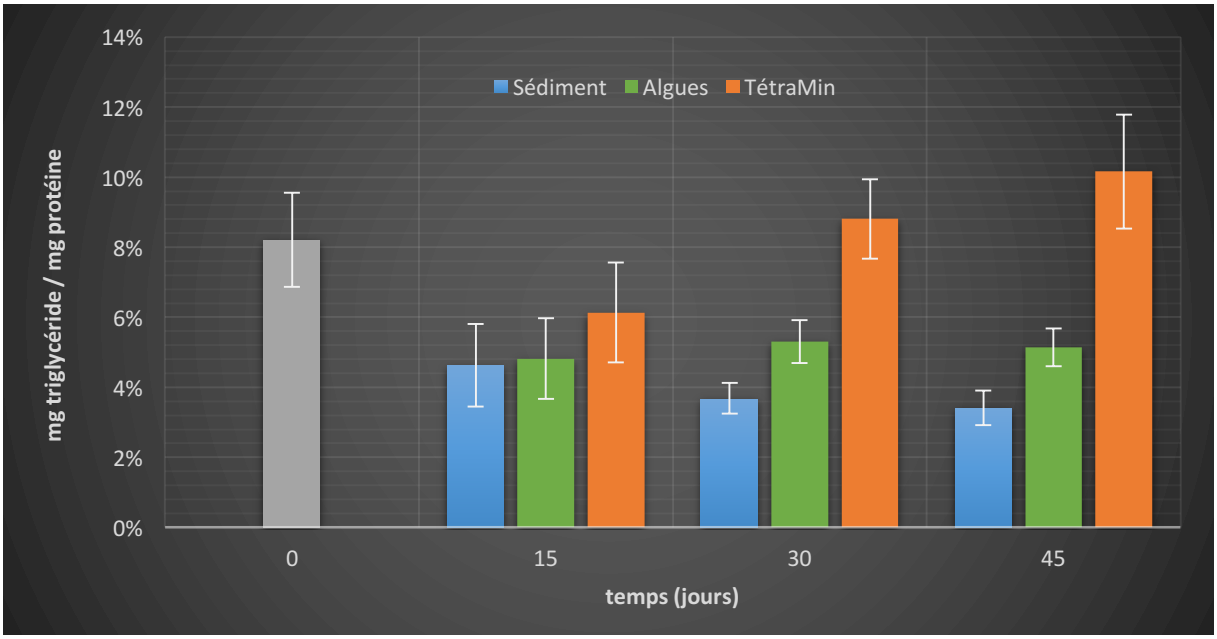


Figure 13 : Taux de triglycérides par masse de protéines en fonction des différents traitements

Plusieurs points sont à noter dans ce graphique :

- Les *Viviparus viviparus* ont des taux lipidiques (pondérés par la quantité de protéine) situés entre 4 et 11 %.
- Une baisse significative des réserves en triglycérides a lieu entre le t0 et les 15 premiers jours d'expérimentation pour les trois traitements.
- L'effet traitement joue un rôle significativement important (p-value < 0,0001), notamment lorsqu'on compare la TetraMin aux deux autres traitements (p-values < 0,00001 dans les deux cas). Après une perte de réserve lipidique sur les 15 premiers jours, les gastéropodes nourris avec de la TetraMin semblent pouvoir reconstruire leurs réserves rapidement (entre le 15ème et le 30ème jour), voir même d'en stocker davantage après six semaines d'expérience.

- Les traitements hétérotrophes (sédiment) et autotrophes (algues) ne permettent pas, par contre, la reconstitution des réserves lipidiques initiales. Le graphique semble aussi indiquer que le traitement algal est plus efficace dans le maintien de ces réserves que celui avec les sédiments. Néanmoins, la différence entre les traitements sédiment et algues n'est pas significative à 5 % (p-value = 8%).

1.4.2 EFFET SUR LES RESERVES GLUCIDIQUES

Voici les résultats obtenus sur le glycogène :

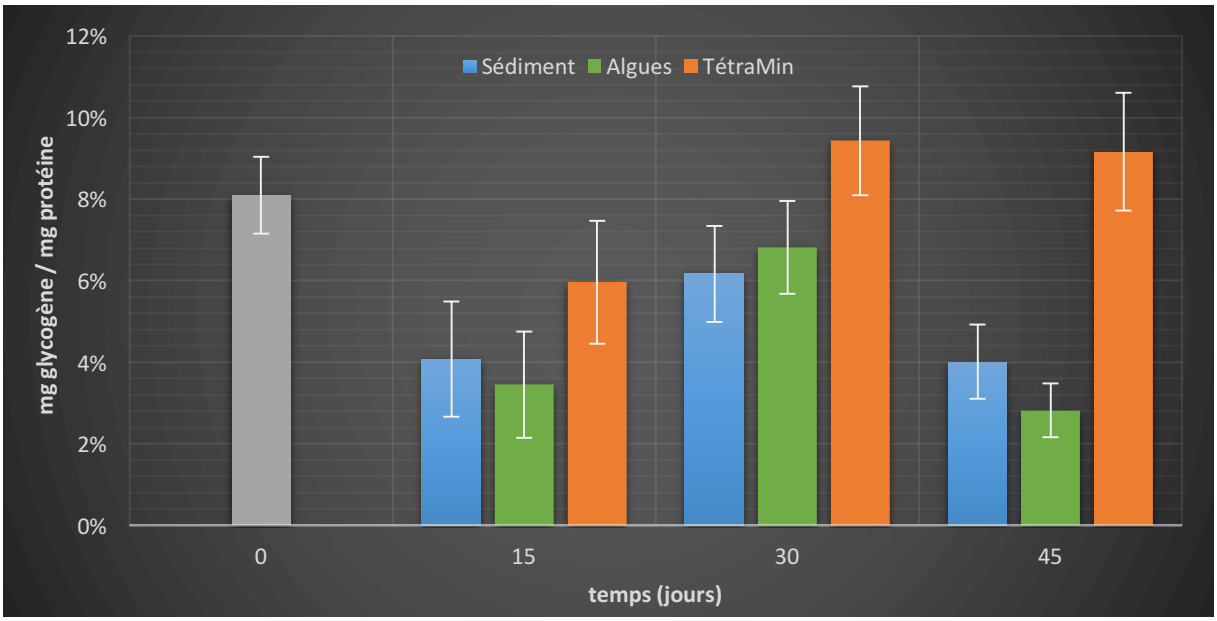


Figure 14 : Taux de glycogène par masse de protéine en fonction des différents traitements

De nouveau, ce graphique révèle plusieurs indications :

- Les *Viviparus viviparus* ont des taux de glycogène (pondérés par la quantité de protéine) situés entre 3 et 11 %.
- Une baisse significative des réserves glucidiques a de nouveau lieu les 15 premiers jours par rapport à t0 pour les trois traitements. On observe également une baisse des réserves glucidiques au temps final (45 jours) pour les traitements hétérotrophes et autotrophes, phénomène non visible avec une nutrition sur la TetraMin. Il est aussi notable que cette baisse en glycogène observée entre le jour 30 et le jour 45 n'a pas été observée pour les triglycérides. Nous apporterons des explications à ce phénomène dans la partie discussion de ce rapport.
- L'effet traitement « ressource nutritives » joue également un rôle significatif sur les taux de glycogène (p-value < 0.0001), notamment lorsqu'on compare la TetraMin aux deux autres traitements (p-values < 0,00001 dans les deux cas). Comme pour les triglycérides, les gastéropodes nourris avec de la TetraMin semblent aussi pouvoir reconstruire leur réserve glucidique plus rapidement (30 jours) après la baisse initiale.

- Les traitements hétérotrophes (sédiment) et autotrophes (algues) ont statiquement des effets semblables sur les réserves glucidiques des *Viviparus viviparus* (p-value = 0,999). On ne peut donc pas cette fois-ci faire de différence entre ces deux sources de nourriture.

Bien que le glycogène soit une ressource énergétique rapidement mobilisable qui peut être absente lorsque les organismes sont maintenus à jeun, on remarque que les stocks glucidiques ne sont jamais nuls. Les trois sources alimentaires peuvent donc être assimilées par *Viviparus viviparus.*

1.4.2 RELATION ENTRE LA QUALITE STOECHIOMETRIQUE D'UNE SOURCE ALIMENTAIRE ET LES RESERVES ENERGETIQUES DE *VIVIPARUS VIVIPARUS*

Nous avons cherché à savoir s'il existait un lien entre la qualité stœchiométrique d'une source de nourriture, caractérisée par son ratio élémentaire C:N, et la capacité des brouteurs à stocker des réserves énergétiques. Le graphique suivant s'intéresse plus particulièrement aux triglycérides, les résultats sur le glycogène présentant des points discutables :

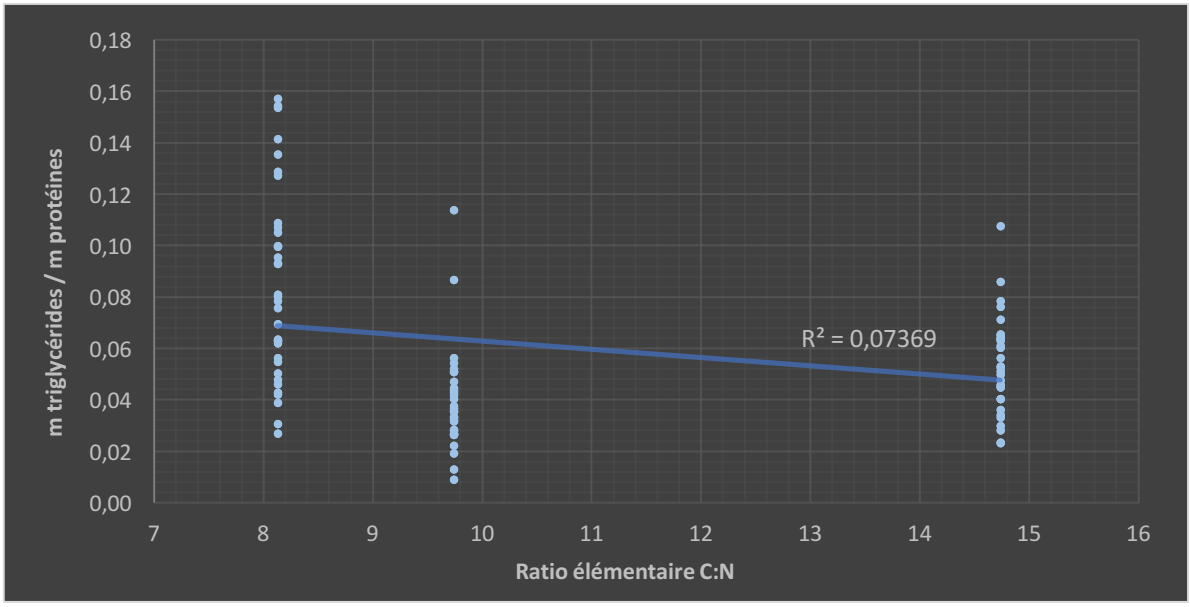


Figure 15 : Rapport masse de triglycérides / masse de protéines en fonction de la qualité stœchiométrique des sources alimentaires

Le coefficient de détermination étant très faible (R^2=7,4%), **il n'y a pas de lien entre la qualité stœchiométrique des sources alimentaires et le stockage des réserves énergétiques chez *Viviparus viviparus*.** La qualité stœchiométrique des ressources apportées ne semble donc pas affecter l'état physiologique des organismes dans notre étude. Pour cette raison, il nous a semblé intéressant d'avoir également une approche quantitative.

1.5. INFLUENCE DES CONCENTRATIONS EN ELEMENTS CHIMIQUES DES SOURCES DE NOURRITURE SUR LE STOCKAGE ENERGETIQUE DES *VIVIPARUS VIVIPARUS*

L'approche quantitative consiste à analyser le rapport « masse de triglycérides / masse de protéines » en fonction des concentrations en carbone, en azote et en phosphore. Pour chacun des graphiques obtenus, on extrait le coefficient de corrélation, la pente et la valeur statistique p-value. Sur la page suivante se trouvent les graphiques correspondants :

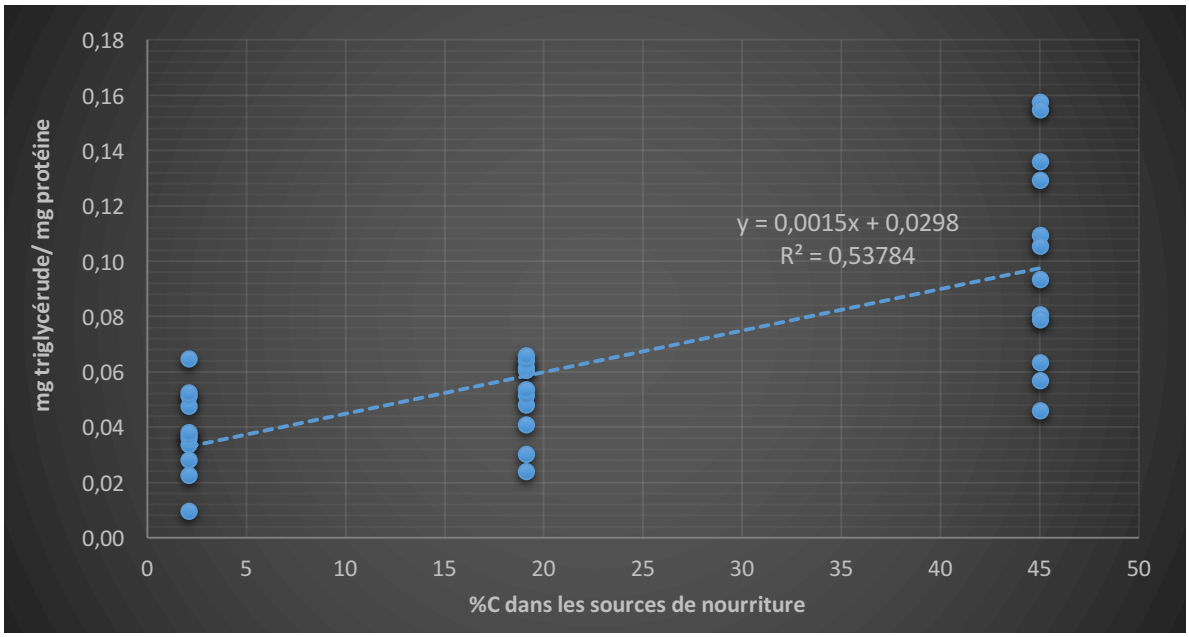


Figure 16 : Rapport masse de triglycérides sur masse de protéines en fonction de la quantité de carbone de la source de nourriture

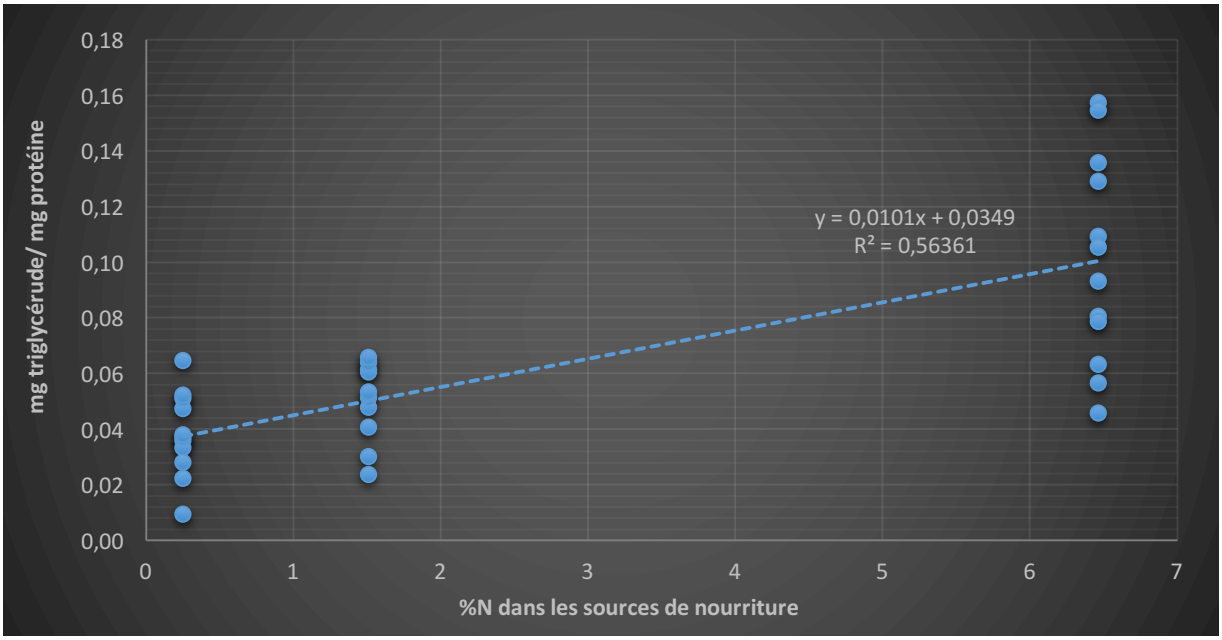


Figure 17 : Rapport masse de triglycérides sur masse de protéines en fonction de la quantité d'azote de la source de nourriture

On observe le même type de corrélation pour les deux espèces chimiques, avec pour le carbone R2=53,8 % (p-value < 0,00001) et pour l'azote R2=56,4 % (p-value < 0,00001). Pour le phosphore qui n'a pas été représenté graphiquement, on obtient un R2 = 54,3 % (p-value < 0,00001). **Il semblerait donc que l'aspect quantitatif prenne le dessus par rapport à l'aspect qualitatif des sources de nourritures**. En effet, plus les sources de nourriture sont concentrées en élément chimique, plus les stockages lipidiques sont importants. Dans notre cas d'étude, la TetraMin apparaît donc comme une très bonne source de nourriture au vue de ses concentrations en carbone et en azote qui sont deux à trois fois plus élevées que celles des algues. De ce fait, le traitement hétérotrophe apparaît moins efficace que le traitement autotrophe pour le stockage énergétique ayant des concentrations 8 à 9 fois plus faibles. Ceci peut donc expliquer les résultats trouvés dans l'analyse de la figure 13 où les réserves lipidiques chez les gastéropodes apparaissent plus élevées au bout de six semaines avec les algues qu'avec le sédiment.

1.6. IMPACT DES SOURCES DE NOURRITURE SUR L'EXCRETION

On a observé précédemment qu'au bout de six semaines, les ratios C:N des organismes (figure 12) pouvaient varier en fonction de la source alimentaire qu'ils ingéraient. En effet avec la TetraMin, source nutritive la plus concentrée en élément chimique et de meilleur qualité stœchiométrique, le ratio C:N des individus est plus élevé. On s'intéresse ainsi aux excrétions en azote et phosphore pour discuter de la stœchiométrie et de l'homéostasie de ces organismes. Pour rappel, elles ont été mesurées à tfinal (6 semaines). Pour l'azote N, nous avons sommé les taux d'excrétion mesurés en nitrates et en ammonium, les nitrites ayant des concentrations très faibles (< 1µg/g sec d'individu).

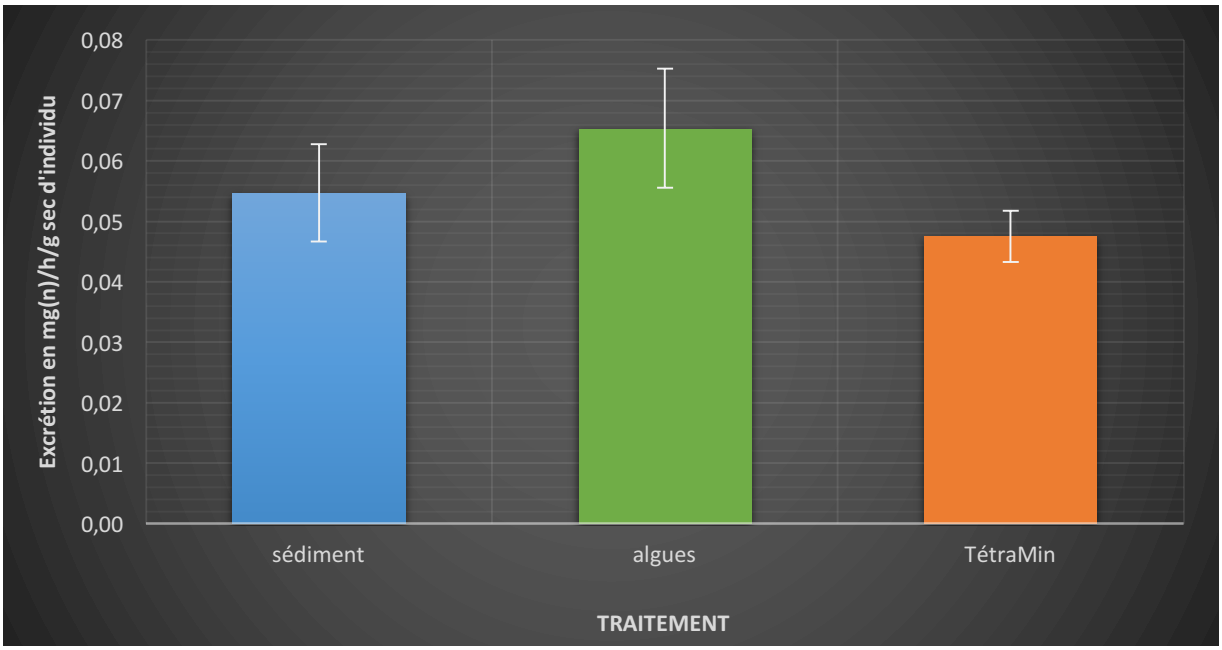


Figure 18 : Excrétion de N en fonction des différents traitements

Les excrétions d'azote sont significativement différentes uniquement entre la TetraMin et les algues (p-value = 0,019) mais pas entre les autres sources de nourriture (p-value = 0,54 entre le sédiment et la TetraMin ; p-value = 0,17 entre le sédiment et les algues, tests de Tukey). Cette expérience ne dessine que des tendances. La plus faible excrétion est observée pour la ressource nutritive présentant le ratio C:N le plus faible et le plus proche de celui des *Viviparus viviparus* (c'est à dire la TetraMin). On note une nouvelle fois la proximité des résultats entre la nutrition sur sédiment et sur les algues.
En ce qui concerne le phosphore, c'est à dire les excrétions sous forme d'ion phosphate, aucune différence significative n'apparaît entre les trois traitements (p-value > 0,05). De plus les quantités excrétées sont très faibles (0,55 ± 0,15 µg(P)/h/g sec d'individu).

Nous avons ensuite cherché à trouver des corrélations entre les excrétions d'azote et la qualité stœchiométrique ou la concentration en azote des différentes sources de nourriture :

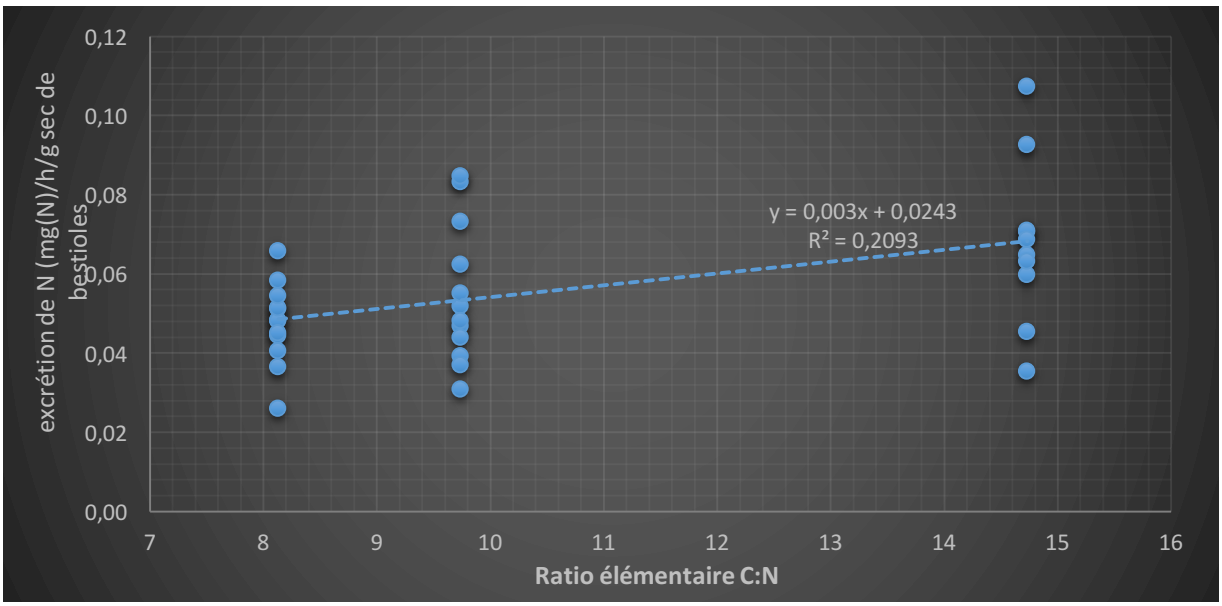


Figure 19 : Excrétion d'azote en fonction de la qualité des ressources alimentaires

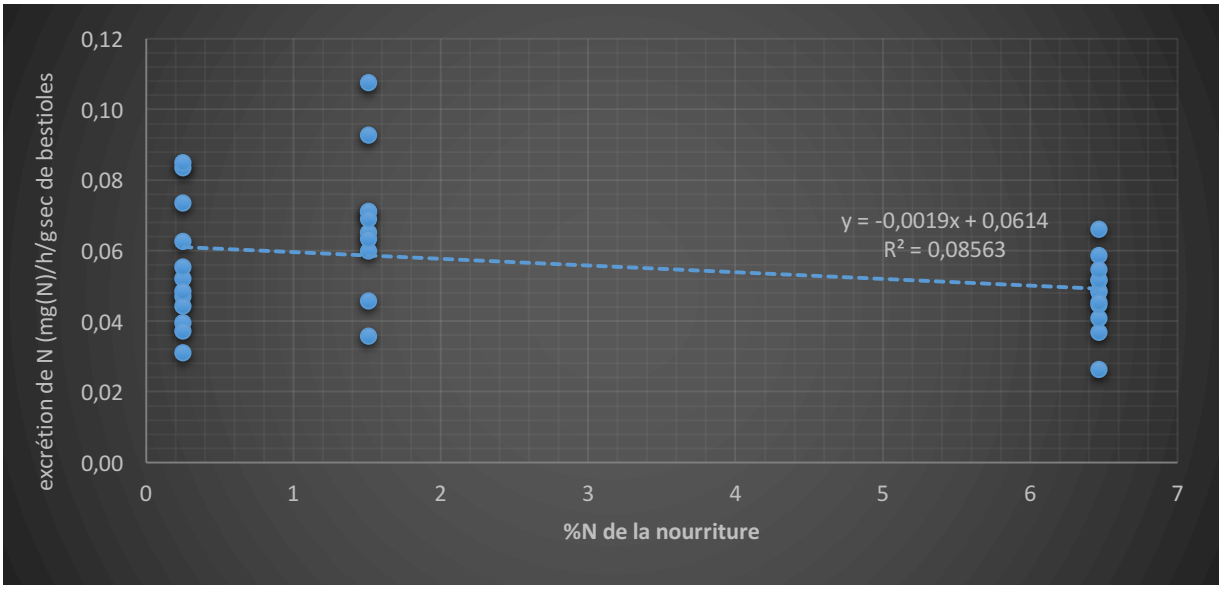


Figure 20 : Excrétion d'azote en fonction de la quantité d'azote dans la nourriture

Une meilleure corrélation apparaît entre les excrétions d'azote et le ratio élémentaire C:N des ressources alimentaires (R2 = 20,9%, p-value < 0,01) qu'entre les excrétions et la quantité d'azote présente dans la nourriture ingérée (R2 = 5,6%, p-value = 0,09).

2. DISCUSSION

Nous avons donc testé l'effet de trois sources de nourriture sur l'état physiologique de *Viviparus viviparus.* Cet état se caractérise entre autre par la capacité des organismes à croître et à stocker des réserves énergétiques.

Les sources alimentaires utilisées dans notre expérience sont significativement différentes dans leurs concentrations en carbone, azote et phosphore mais également dans leur qualité stœchiométrique. La TetraMin apparaît comme la source de meilleure qualité, ayant le ratio C:N le plus proche de celui des Viviparus viviparus (4,9 ± 0,1 pour les escargots, 8,1 ± 0,2 pour la TetraMin), suivie du sédiment (9,7 ± 0,2) et enfin de algues (14,7 ± 0,1). Ces valeurs sont cohérentes avec la thèse de Clémentine François (2015), qui a également travaillé sur ces sources de nourriture. Si on se fie à notre hypothèse, l'horizon sédimentaire hétérotrophe serait donc plus favorable au bon état physiologique des escargots que les autres sources nutritives.

Pour caractériser cet état physiologique, nous nous sommes principalement intéressés aux constitutions des réserves énergétiques et à la croissance des individus. Les résultats sur la taille des coquilles n'étant pas exploitables, comme développés et expliqués dans la partie 1.3, nous nous sommes orientés sur les réserves lipidiques et glucidiques. D'autres facteurs tels que le taux de fécondité, la mobilité, les ratios ARN/ADN pouvaient être également mis en place pour caractériser l'état physiologique des *Viviparus viviparus* (Jakubik, 2009 ; Koop et al., 2011). L'absence de mort au cours de cette expérience et des réserves glucidiques au minimum à 3 mg / mg de protéine sont déjà des bons indicateurs quant au bon état de forme de ces organismes.

Sur l'évolution des réserves glucidiques et lipidiques au cours du temps, on observe un même phénomène : une chute brutale de réserves étudiées les 15 premiers jours quel que soit le traitement nutritif. Ceci peut s'expliquer par un stress lié à l'expérimentation et à la mise en place des individus dans les aquariums. Le fait que ces réserves énergétiques peuvent se reconstituer rapidement avec le traitement à la TetraMin, qui est la source nutritive d'élevage des organismes, semble aller dans le même sens d'un effet de stress initial des organismes dans nos conditions expérimentales. Une deuxième chute assez brutale est également présente à tf pour le glycogène. Cette molécule peut être mobilisée beaucoup plus rapidement que les triglycérides (Hervant et al., 1999) et est donc davantage sensible à des situations de stress. Or à tf, les Viviparus viviparus ont subi un traitement supplémentaire par rapports aux temps t0, t1 et t2 : durant les 48 heures de jeûne précédant la

congélation des individus, l'expérience d'excrétion a été mise place avec des manipulations d'organismes et des prélèvements de 20m L d'eau de chimie les 4 premières heures. Les gastéropodes ont également été rincés trois fois comme indiqués dans le protocole. Ces étapes ont pu être la source d'un stress responsable de cette chute des réserves glucidiques avec les algues et le sédiment. Notons que ce stress n'a pas induit une chute du taux de glycogène entre le jour 30 et le jour 45 pour le traitement à la TetraMin, mais il semble avoir stoppé l'augmentation de la quantité de glycogène au cours du temps pour ce traitement nutritif.

Pour les deux réserves énergétiques considérées, la TetraMin apparaît comme la meilleure source nutritive. Nous distinguons que très peu de différences entre l'horizon sédimentaire hétérotrophe et la composante algale du biofilm. Concernant le glycogène, aucune différence n'est statistiquement visible bien que les deux sources de nourriture aient des qualités stœchiométriques très différentes. Pour les triglycérides, qui sont des réserves de stockage énergétique plus efficaces que le glycogène car elles fournissent plus d'ATP par unité de masse (Arrese et Soulages, 2010) en particulier pendant les périodes de reproduction et de jeûne, nous avons une p-value proche de 0,05 entre les deux traitements (p-value = 0,08). Cette valeur serait probablement amenée à être significative à 0,05 si on augmentait le nombre d'individus. Quoi qu'il en soit, cette tendance d'un meilleur état physiologique des organismes lorsqu'ils se nourrissent sur des algues plutôt que sur du sédiment va à l'encontre de notre hypothèse stœchiométrique initiale[1] car le sédiment présente des ratios élémentaires plus proches des gastéropodes que les algues. Cette absence de validation de notre hypothèse est bien visible sur la figure 15 où les réserves ne varient pas avec les ratios élémentaires des ressources.

Notre approche quantitative semble être plus pertinente pour expliquer les résultats obtenus. En effet, nous avons pu observer de meilleure corrélations entre les réserves lipidiques et les concentrations en carbone (figure 16) ou en azote (figure 17) des sources de nourritures qu'entre les réserves lipidiques et les qualités stœchiométriques de celles-ci (figure 15). Les algues présentent des concentrations 8 à 9 fois plus élevées de ces éléments nutritifs que le biofilm privé de sa composante algale. Les algues présentent en effet davantage de matière organique que les sédiments. Dans ce sens, c'est l'hypothèse alternative qui est validée à savoir : l'état physiologique des brouteurs dépend des concentrations en éléments chimiques (carbone, azote, phosphore) des ressources alimentaires, quels que soient les ratios élémentaires de celles-ci.

Il apparaît par ailleurs intéressant de discuter des hypothèses stœchiométriques développées en synthèse bibliographique ainsi que du phénomène d'homéostasie. Dans notre étude, les *Viviparus viviparus* présentent une relative stabilité dans leurs ratios élémentaires C:P et C:N bien qu'avec le traitement à la TetraMin, une légère augmentation du ratio C:N soit observée. Ceci va à l'encontre des

[1] **Rappel de l'hypothèse initiale** : les sources alimentaires favorisant le bon état physiologique des brouteurs (constitution de réserves énergétiques…) sont celles qui présentent une meilleure qualité stœchiométrique ; c'est à dire celles qui présentent des ratios élémentaires C:N:P proches de ceux des consommateurs. Cette hypothèse se situe dans une approche qualitative.

règles de l'homéostasie qui prévoit que les organismes brouteurs ont des ratios élémentaires stables quelle que soit la nourriture (qualitativement et quantitativement) qu'ils ingèrent (Elser et Urabe, 1999 ; Sterner et Elser, 2002 ; Stelzer et Lamberti, 2005). Ce non respect de ces principes a déjà été mis en évidence dans plusieurs travaux comme dans ceux de Liess et Hillebrand (2006) qui ont montré qu'une alimentation riche en P et en N pouvait augmenter le contenu en P chez des brouteurs invertébrés. Bagget et al. (2013) ont également suggéré qu'une nourriture trop riche pouvait altérer la stœchiométrie des consommateurs, mais que ces effets étaient spécifique d'une espèce à une autre et dépendaient notamment des régimes alimentaires, des phénomènes de nutrition compensatoire des brouteurs. Notons aussi que cette légère augmentation a été observée après six semaines pour le traitement à la TetraMin à un instant donné, il serait également intéressant de suivre ces ratios dans le temps, et probablement plus longtemps, afin de suivre les potentiels changements de stœchiométrie interne des organismes suivant les différentes sources alimentaires. Cela permettrait d'avoir un test plus efficace de l'hypothèse d'homéostasie chez les gastéropodes étudiés.

Dans le même sens, la TetraMin présentant les ratios C:N les plus élevés, c'est avec ce traitement que nous devrions avoir observé le d'excrétion d'azote si on respecte les théories stœchiométriques (moins besoin d'assimiler le N dans ce traitement par rapport aux autres traitements). Or d'après les figures 18 et 19, ce n'est pas le cas, nous obtenons même l'effet inverse. Une analyse plus fine sur ces excrétions est ainsi à envisager notamment sur les quantités de carbone biodisponibles sur les différentes sources de nourriture, afin de déterminer si les C:N sont suffisamment précis pour décrire les ratios des sources élémentaires réellement assimilables par les organismes. Pour les ratios C:P, nous n'avons pas observé d'excrétion significatives en phosphores dans nos traitements. Il serait sans doute pertinent d'analyser les contenus des pelotes fécales de gastéropodes. En effet, André et al. (2003) ont montré que les pelotes fécales avaient des ratios N:P plus faibles que les particules excrétés (12:1 contre 21 :1). Ceci suggère que l'azote est la plupart du temps libéré sous forme dissoute et le phosphore plutôt sous forme solide. Dans notre protocole expérimental, une analyse individuelle des quantités de phosphore dans les pelotes fécales n'a pas été possible en raison des trop faibles quantités prélevées. Une idée pour palier à ce problème serait de mélanger les égestions par traitement et de faire une analyse plus globale pour mieux comprendre la dynamique d'assimilation du P dans nos différentes conditions expérimentales.

Conclusions et Perspectives de travail

D'après nos résultats expérimentaux, les réserves énergétiques, plus particulièrement le taux de triglycérides (lipides) est un indicateur de bon état physiologique des brouteurs. Nous ne pouvons pas conclure sur le taux de croissance, notre protocole nécessitant des modifications. Nous sommes toutefois parvenus à réfuter notre hypothèse initiale : en effet ce ne sont pas les sources de nourriture de meilleure qualité stœchiométrique qui favorisent la constitution de réserves énergétiques mais plutôt la quantité d'éléments chimiques présents dans celles-ci.

L'absence de mortalité et la présence de réserves énergétiques (glucidiques et lipidiques) après six semaines d'expérience quelle que soit la ressource nutritive montrent bien que les *Viviparus viviparus* peuvent à la fois se nourrir d'un biofilm totalement autotrophe mais aussi de l'horizon sédimentaire hétérotrophe situé en dessous du tapis algal. Aucune différence statistique n'a pu être mise en évidence sur les réserves lipidiques et les réserves glucidiques entre ces deux traitements bien qu'ils présentent pourtant des qualités stœchiométriques et des quantités en éléments chimiques différentes. *Viviparus viviparus* ne présente donc pas de forte spécialisation alimentaire. Le régime alimentaire de ces organismes est bien généraliste.

D'un point de vue opérationnel, les *Viviparus viviparus* sont ainsi des herbivores qui se révèleront efficaces quelles que soient les conditions nutritives disponibles. Ils pourront de ce fait être insérés au sein des différents bassins d'infiltration de Crépieux-Charmy qui présentent des qualités et des densités de biofilms variables. Ceci est très prometteur quant à la mise en place de cet organisme in situ dans un but d'ingénierie écologique. Il doit toutefois pouvoir se maintenir. Une approche à préconiser pour poursuivre ce travail de fin d'étude est de mettre en place des tests in situ à long terme avec des mesures de mortalité et des réserves énergétiques au cours du temps sur les gastéropodes, et sur plusieurs saisons.

Une autre perspective de travail, en laboratoire cette fois, est de tester plus spécifiquement les choix alimentaires de *Viviparus viviparus* en lui proposant, au sein de même aquarium, un mélange des deux sources alimentaires et en faisant varier le degré d'autotrophie. Bien que ces organismes soient capables d'assimiler des biofilms de compositions et de qualité stœchiométriques différentes, ceux-ci ont peut-être des préférences alimentaires lorsque les différentes sources de nourriture sont présentes dans le milieu.

Bibliographie

Alstyne K. (1988). *Herbivore grazing increases polyphenolic defenses in the intertidal brown alga Fucus Distichus*. Ecology 69(3) : 655–663

Baggett L., Heck K., Frankovich T., Armitage A., Fourqurean J. (2013). *Herbivore grazing increases polyphenolic defenses in the intertidal brown alga Fucus Distichus*. Marine Biology 160 : 169-180

Bullery F., Russel B.D., Connel S.D. (2012). *Context-dependency in the effects of nutrient loading and consumers on the availability of space in marine rocky environments*. Plos One 7(3) : e22825

Chesseman B., Westhorpe D., Mitrovic S., Hardwick L. (2009). *Trophic linkages between periphyton and grazing macroinvertebrates in rivers with different levels of catchment development*. Hydrobiologia 625 : 135–150

Cruz-Rivera E., Hay M. (2000). *Can quantity replace quality ? Food choice, compensatory feeding, and fitness of marine mesograzers.* Hydrobiologia 81(1) : 201-219

Dale (1974). *Bacteria in intertidal sediments: factors related to their distribution.* Limnology Ocenanorgraphy 19(3) : 509-518

Danger M., Oumarou C., Benest D., Lacroix G. (2007). *Bacteria can control stoichiometry and nutrient limitation of phytoplankton.* Functional Ecology 21 : 202-210

Danger M. (2007). *Des interactions entre organismes au fonctionnement des écosystèmes : apports des approches stoechiométriques.* Thèse sci. : Université Pierre et Marie Curie.

Eriksson B., Rubach A., Batsleer J., Hillebrand H. (2012). *Cascading predator control interacts with productivity to determine the trophic level of biomass accumulation in a benthic food web*. Ecol Res 27 : 203-210

Fitter A., Hillebrand H. (2009). *Microbial food web structure affects bottom-up effects and elemental stoichiometry in periphyton assemblages*. Lymnology Oceanography 54(6) : 2183-2200

Flores L., Larranaga A., Elosegi A. (2014). *Compensatory feeding of a stream detritivore alleviates the effects of poor food quality when enough food is supplied*. Freshwater Science 33(1) : 134-141

Foucreau N., Cottin D., Piscart C., Hervant F. (2014). *Physiological and metabolic responses to rising temperature in Gammarus pulex (Crustacea) populations living under continental or Mediterranean climates*. Comparative Biochemisstry and Physiology, Part A 168 : 69-75

Gette-Bouvarot M. (2014) *Rôle du compartiment biologique dans le processus de colmatage et décolmatage de bassins d'infiltration*. Thèse sci. : Ecole doctorale Chimie de Lyon (Chimie, Procédés, Environnement).

Gette-Bouvarot M., Volatier L., Lassabatere L., Lemoine D., Simon L, Delolme C., Mermillot-Blondin F. (2015). *Ecological Engineering Approaches to Improve Hydraulic Properties of Infiltration Basins Designed for Groundwater Recharge*. Environmental Science & Technology 49 : 9936-9944

Higgins K., Vanni M., Gonzalez M. (2006). *Detritivory and the stoichiometry of nutrient cycling by a dominant fish species in lakes of varying productivity.* Oikos 00 : 0

Hill W. (1992). *Food limitation and Interspecific Competition in snail-dominated streams*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 49 : 1257-1267

Hill W., Smith J., Stewart A. (2010). *Light, nutrients, and herbivore growth in oligotrophic streams*. Ecology 91(2) : 518-527

Hillebrand H. (2009). *Meta-analysis of grazer control of periphyton biomass across aquatic ecosystems*. J.Phycol 45 : 798-806

Hillebrand H., de Montpellier G., Liess A. (2004). *Effects of macrograzers and light on periphyton stoichiometry*. Oikos 106 : 93-104

Hillebrand H., Kahlert M. (2001). *Effect of grazing and nutrient supply on periphyton biomass and nutrient stoichiometry in habitats of different productivity*. Limnology Oceanogrpahy 46(8) : 1881-1898

Hillebrand H., Kahlert M., Haglund A.L., Berninger U., Nagel S., Wickham S. (2002). *Control of microbenthic communities by grazing and nutrient supply*. Ecology 83(8) : 2205-2219

Jakubik B. (2009a). *Food and feeding of Viviparus viviparus (Gasteropoda) in dam reservoir and river habitats.* Polish Journal of Ecology 57 : 321-330

Jakubik B. (2009b). *Reproduction of the freshwater snail Viviparus contectus (Millet, 1813).* Folia Malacologica 17 : 223-230

Jakubik B. (2012). *Life strategies of Viviparidae (Gastropoda: Caenogastropoda: Architaenioglossa) in various aquatic habitats: Viviparus viviparus (Linnaeus, 1758) and V. vontectus (Millet, 1813)*. Folia Malacologica 20(3) : 145-179

Jakubik B. (2012). *Invertebrate reproduction in astatic water bodies: egg number – body weight relationship in viviparus viviparus (l.) from oxbow lakes.* Polish Journal of Ecology 60(2) : 363-374

Jully M. (2015) *Etude de l'impact des flux de nutriments et de la pression d'herbivorie de Viviparus viviparus sur des biofilms de bassins d'infiltration*. Master 2 Ecosciences, Microbiologie : Université Claude Bernard Lyon 1

Knoll L., MvIntyre P., Vanni M., Flecker A. (2009) *Feedbacks of consumer nutrient recycling on producer biomass and stoichiometry : separating direct and indirect effects*. Oikos 118 : 1732-1742

Komulaysen S.F. (2006) *Diets of Periphytonic Invertebrates in a Small River*. Russian Journal of Ecology 37(5) : 372-378

Koop J., Winkelmann C., Becker J., Hellmann C., Ortmann C. (2011). *Physiological indicators of fitness in benthic invertebrates : a useful measure for ecological health assessment and experimental ecology*. Aquatic Ecology 45 : 547-559

Liess A., Haglund A.L. (2007). *Periphyton responds differentially to nutrients recycled in dissolved or faecal pellet form by the snail grazer Theodoxus fluviatilis.* Arch. Hydrobiology 159(4) : 433–453

Liess A., Hillebrand H. (2004). *Direct and indirect effects in herbivore – periphyton interactions.* Arch. Hydrobiology 159(4) : 433–453

Liess A., Lange K. (2011). *The snail Potamopyrgus antipodarum grows faster and is more active in the shade, independent of food quality.* Freshwater Biology 52 : 1997-2008

Morales J., Ward A. (2000). *Differential incorporation of algae and bacteria by Elimia clara (Prosobranchia:Pleuroceridae)— a study using dual-labeled epilithon.* Journal of the North American Benthological Society 2 : 289-297

Murphy J., Riley J.P. (1958). *A single solution method for the determination of soluble phosphate in sea water.* J. Mar. Biol. Assoc. *UK 37 : 9-14*

Peace A., Zhao Y., Loladze I., Elser J., Khuang Y. (2013). *A stoichiometric producer-grazer model incorporating the effects of excess food-nutrient content on consumer dynamics.* Mathematical Biosciences 244 : 107-115

Reyjol Y., Léna J.P., Hervant F., Pont D. (2009). *Effects of temperature on biological and biochemical indicators of the life-history strategy of bullhead Cottus gobio.* Journal of Fish Biology 75 : 1427-1445

Rosemond A., Mulholland P., Elwood J. (1993). *Top-down and bottom-up control of stream periphyton : effects of nutrients and herbivores.* Ecology 74(4) : 1264-1280

Salin K., Voituron Y., Mourin J., Hervant F. (2010). *Cave colonization without fasting capacities: An example with the fish Astyanax fasciatus mexicanus.* Comparative Biochemisstry and Physiology, Part A 156 : 451-457

Sturt M., Jansen M., Harrison C. (2011). *Invertebrate grazing and riparian shade as controllers of nuisance algae in a eutrophic river.* Freshwater Biology 56 : 2580-2593

Villemin H. (2015) *Contribution à une meilleure compréhension de fonctionnement du champ cpatant de Crépieux-Charmy*. TFE : ENTPE

ANNEXES : TABLEAUX DE RESULTATS

Annexe A : Résultats bruts des mesures effectuées sur les *Viviparus viviparus* 50

Annexe B : Suite des résultats bruts des mesures effectuées sur les *Viviparus viviparus*.....54

Annexe C : Résultats bruts des mesures effectuées sur les *Viviparus viviparus* au temps final.....58

Annexe D : Mesures physico-chimiques des aquariums 60

Annexe E : Mesures des concentrations en ammonium, phosphates, nitrates et nitrites de l'eau des aquariums.....61

Annexe F : Résultats buts des mesures effectuées sur les trois sources de nourriture 62

Annexe A : Résultats bruts des mesures effectuées sur les *Viviparus viviparus*

Code de l'échantillon	Numéro de l'escargot	Traitement	Réplicat de l'aquarium	temps	sexe	nombre de petits si sexe F	poids (mg)	µmol glycosyl / mg masse sèche	mg glycosyl / mg masse sèche
t0-1	1	NA	NA	t0	M	0	197,5	3,828	0,0230
t0-2	2	NA	NA	t0	F	2	99,1	4,035	0,0242
t0-3	3	NA	NA	t0	M	0	90,2	4,465	0,0268
t0-4	4	NA	NA	t0	M	0	92,8	7,411	0,0445
t0-5	5	NA	NA	t0	F	4	167,5	5,550	0,0333
t0-6	6	NA	NA	t0	M	0	67,9	3,346	0,0301
t0-7	7	NA	NA	t0	M	0	81,9	2,043	0,0184
t0-8	8	NA	NA	t0	M	0	113,6	3,093	0,0186
t0-9	9	NA	NA	t0	M	0	102	3,834	0,0230
t0-10	10	NA	NA	t0	M	0	113,1	7,129	0,0428
t0-11	11	NA	NA	t0	F	7	143,4	2,933	0,0176
t0-12	12	NA	NA	t0	M	0	70,5	4,793	0,0345
T2 t1	13	T	2	t1	M	0	78,3	7,336	0,0528
T2 t1	14	T	2	t1	M	0	60,6	1,738	0,0156
P4 t1	15	P	4	t1	M	0	106,5	4,638	0,0278
T2 t1	16	T	2	t1	F	5	144,8	7,324	0,0439
H1 t1	17	H	1	t1	F	3	106,4	6,584	0,0395
H1 t1	18	H	1	t1	M	0	105,5	3,799	0,0228
H1 t1	19	H	1	t1	M	0	217,7	3,954	0,0237
P4 t1	20	P	4	t1	M	0	98,9	6,825	0,0409
P4 t1	21	P	4	t1	F	6	60,2	2,622	0,0315
T1 t1	22	T	1	t1	M	0	144,2	2,043	0,0118
T1 t1	23	T	1	t1	F	0	201,9	1,537	0,0089
T1 t1	24	T	1	t1	M	0	159	1,824	0,0108
T3 t1	25	T	3	t1	M	0	176,79	1,302	0,0081
T3 t1	26	T	3	t1	M	0	186	4,552	0,0267
T3 t1	27	T	3	t1	F	1	241	1,767	0,0107
P1 t1	28	P	1	t1	F	0	234,4	5,579	0,0347
P1 t1	29	P	1	t1	M	0	172,6	1,204	0,0076
P1 t1	30	P	1	t1	M	0	219,1	0,630	0,0036
P2 t1	31	P	2	t1	M	0	143,8	1,067	0,0064
P2 t1	32	P	2	t1	M	0	136,7	1,038	0,0065

P2 t1	33	P	2	t1	F	1	534,9	2,749	0,0163
P3 t1	34	P	3	t1	M	0	100,2	0,504	0,0041
P3 t1	35	P	3	t1	M	0	126,2	2,008	0,0117
P3 t1	36	P	3	t1	F	3	290,1	0,338	0,0021
H2 t1	37	H	2	t1	F	0	151,3	0,630	0,0035
H2 t1	38	H	2	t1	M	0	128,1	0,613	0,0039
H2 t1	39	H	2	t1	M	0	84,1	1,256	0,0072
H3 t1	40	H	3	t1	M	0	251,6	0,349	0,0020
H3 t1	41	H	3	t1	M	0	205,5	4,781	0,0276
H3 t1	42	H	3	t1	F	1	166,3	1,497	0,0090
H4 t1	43	H	4	t1	M	0	143,7	1,560	0,0093
H4 t1	44	H	4	t1	F	3	297	4,138	0,0244
H4 t1	45	H	4	t1	M	0	168,1	1,905	0,0114
T4 t1	46	T	4	t1	F	1	219,9	4,942	0,0285
T4 t1	47	T	4	t1	M	0	209,1	3,495	0,0204
T4 t1	48	T	4	t1	M	0	186,6	3,679	0,0212
T1 t2	49	T	1	t2	F	2	186,3	5,763	0,0340
T1 t2	50	T	1	t2	M	0	221,6	5,332	0,0304
T1 t2	51	T	1	t2	M	0	282,5	4,241	0,0239
T2 t2	52	T	2	t2	M	0	303,3	4,672	0,0282
T2 t2	53	T	2	t2	M	0	180,7	4,999	0,0295
T2 t2	54	T	2	t2	F	1	156,5	3,731	0,0218
T4 t2	55	T	4	t2	M	0	166,4	5,711	0,0344
T4 t2	56	T	4	t2	M	0	151,3	5,579	0,0337
T4 t2	57	T	4	t2	F	0	328,2	5,401	0,0334
H1 t2	58	H	1	t2	M	0	260,6	3,145	0,0186
H1 t2	59	H	1	t2	M	0	198,1	3,168	0,0189
H1 t2	60	H	1	t2	F	3	285,5	6,791	0,0403
H2 t2	61	H	2	t2	F	1	180	5,792	0,0346
H2 t2	62	H	2	t2	M	0	105	3,713	0,0222
H2 t2	63	H	2	t2	M	0	156,1	4,064	0,0245
H3 t2	64	H	3	t2	M	0	110,6	4,615	0,0267
H3 t2	65	H	3	t2	F	7	220,1	4,339	0,0244
H3 t2	66	H	3	t2	M	0	66,4	2,140	0,0167
H4 t2	67	H	4	t2	M	0	159,5	0,986	0,0054
H4 t2	68	H	4	t2	F	3	207,6	7,646	0,0476
H4 t2	69	H	4	t2	M	0	105,6	1,095	0,0066
T3 t2	70	T	3	t2	M	0	235	8,783	0,0478

T3 t2	71	T	3	t2	F	5	253,1	8,685	0,0506
T3 t2	72	T	3	t2	M	0	210	8,427	0,0458
P1 t2	73	P	1	t2	F	0	45,9	0,533	0,0050
P1 t2	74	P	1	t2	M	0	122,6	7,623	0,0467
P1 t2	75	P	1	t2	M	0	193,7	4,994	0,0288
P2 t2	76	P	2	t2	F	0	120,5	2,002	0,0121
P2 t2	77	P	2	t2	M	0	98,7	6,842	0,0382
P2 t2	78	P	2	t2	M	0	189,3	4,592	0,0275
P3 t2	79	P	3	t2	F	6	198,9	4,161	0,0247
P3 t2	80	P	3	t2	M	0	100,8	2,852	0,0170
P3 t2	81	P	3	t2	M	0	183,7	7,284	0,0405
P4 t2	82	P	4	t2	M	0	154,9	5,527	0,0357
P4 t2	83	P	4	t2	F	8	245,1	5,470	0,0324
P4 t2	84	P	4	t2	M	0	115	4,569	0,0274
T1 tf	E1	T	1	tf	M	0	194,5	6,027	0,0386
T1 tf	E2	T	1	tf	M	0	289,6	5,286	0,0315
H1 tf	E3	H	1	tf	M	0	107	1,767	0,0100
H1 tf	E4	H	1	tf	M	0	133,9	3,265	0,0207
T2 tf	E5	T	2	tf	M	0	248,9	4,890	0,0300
T2 tf	E6	T	2	tf	M	0	277	5,763	0,0364
H2 tf	E7	H	2	tf	M	0	95,6	1,543	0,0089
H2 tf	E8	H	2	tf	M	0	110,6	2,123	0,0133
T3 tf	E9	T	3	tf	M	0	234,1	7,066	0,0436
T3 tf	E10	T	3	tf	M	0	209,2	7,657	0,0436
H3 tf	E11	H	3	tf	M	0	252,2	2,037	0,0118
H3 tf	E12	H	3	tf	M	0	183,1	3,507	0,0225
T4 tf	E13	T	4	tf	M	0	251,5	5,682	0,0330
T4 tf	E14	T	4	tf	M	0	234,6	3,512	0,0226
H4 tf	E15	H	4	tf	M	0	121,6	4,385	0,0279
H4 tf	E16	H	4	tf	M	0	213,5	2,473	0,0127
P1 tf	E17	P	1	tf	M	0	177,5	1,779	0,0104
P1 tf	E18	P	1	tf	M	0	116,7	1,675	0,0101
P2 tf	E19	P	2	tf	M	0	242,6	4,046	0,0239
P2 tf	E20	P	2	tf	M	0	137,2	2,043	0,0117
P3 tf	E21	P	3	tf	M	0	135,9	0,475	0,0031
P3 tf	E22	P	3	tf	M	0	154,1	1,463	0,0089
P4 tf	E23	P	4	tf	M	0	97,8	3,248	0,0202
P4 tf	E24	P	4	tf	M	0	129,7	0,493	0,0031

H2 tf	E25	H	2	tf	F	3	210,8	5,372	0,0329
T3 tf	E26	T	3	tf	F	3	199,6	3,495	0,0217
P4 tf	E27	P	4	tf	F	1	147	1,555	0,0099
T4 tf	E28	T	4	tf	F	2	198,2	8,329	0,0493
T2 tf	E29	T	2	tf	F	0	164,2	3,558	0,0213
P2 tf	E30	P	2	tf	F	10	111,5	2,284	0,0137
H4 tf	E31	H	4	tf	F	2	188,8	0,935	0,0056
P1 tf	E32	P	1	tf	F	5	191,6	0,602	0,0037
T1 tf	E33	T	1	tf	F	1	126,7	0,780	0,0046
H1 tf	E34	H	1	tf	F	6	276	3,960	0,0232
H3 tf	E35	H	3	tf	F	0	201,2	0,986	0,0057
P3 tf	E36	P	3	tf	F	4	273	0,688	0,0043

Annexe B : Suite des résultats bruts des mesures effectuées sur les *Viviparus viviparus*

Code de l'échantillon	m triglycéride (mg)	mg triglycéride / mg masse sèche	m protéine (mg)	mg protéine / mg masse sèche	mg triglycérides / mg protéines	mg glycosyl / lmg protéines
t0-1	0,684	0,0228	7,193	0,2398	0,0951	0,0032
t0-2	0,809	0,0270	8,414	0,2805	0,0961	0,0029
t0-3	1,515	0,0505	11,408	0,3803	0,1328	0,0023
t0-4	0,934	0,0311	12,303	0,4101	0,0759	0,0036
t0-5	0,615	0,0205	11,460	0,3820	0,0537	0,0029
t0-6	0,421	0,0211	6,780	0,3390	0,0622	0,0044
t0-7	0,303	0,0151	8,913	0,4457	0,0340	0,0021
t0-8	1,121	0,0374	9,756	0,3252	0,1149	0,0019
t0-9	0,384	0,0128	5,833	0,1944	0,0658	0,0039
t0-10	0,903	0,0301	12,596	0,4199	0,0717	0,0034
t0-11	0,853	0,0284	8,328	0,2776	0,1024	0,0021
t0-12	0,740	0,0247	9,602	0,3841	0,0771	0,0036
T2 t1	1,121	0,0374	11,253	0,4501	0,0997	0,0047
T2 t1	0,834	0,0334	5,420	0,2710	0,1539	0,0029
P4 t1	1,440	0,0480	13,370	0,4457	0,1077	0,0021
T2 t1	1,615	0,0538	12,682	0,4227	0,1274	0,0035
H1 t1	0,659	0,0220	12,854	0,4285	0,0513	0,0031
H1 t1	1,015	0,0338	11,684	0,3895	0,0869	0,0020
H1 t1	1,284	0,0428	11,271	0,3757	0,1139	0,0021
P4 t1	1,046	0,0349	12,148	0,4049	0,0861	0,0034
P4 t1	0,559	0,0186	7,106	0,4738	0,0787	0,0044
T1 t1	0,446	0,0153	11,494	0,3696	0,0388	0,0010
T1 t1	0,503	0,0170	10,892	0,3491	0,0462	0,0008
T1 t1	0,453	0,0148	7,106	0,2338	0,0637	0,0015
T3 t1	0,496	0,0171	9,051	0,3121	0,0548	0,0009
T3 t1	0,334	0,0114	10,823	0,3525	0,0309	0,0025
T3 t1	0,390	0,0124	9,085	0,3059	0,0429	0,0012
P1 t1	0,515	0,0186	16,570	0,5734	0,0311	0,0021
P1 t1	0,303	0,0100	12,974	0,4568	0,0233	0,0006
P1 t1	0,321	0,0100	11,408	0,3645	0,0282	0,0003

P2 t1	0,359	0,0113	7,175	0,2400	0,0500	0,0009
P2 t1	0,484	0,0159	9,171	0,3184	0,0528	0,0007
P2 t1	0,471	0,0159	14,196	0,4670	0,0332	0,0011
P3 t1	0,340	0,0114	11,339	0,5178	0,0300	0,0004
P3 t1	0,471	0,0149	13,800	0,4452	0,0342	0,0008
P3 t1	0,528	0,0176	8,277	0,2894	0,0638	0,0003
H2 t1	0,484	0,0162	8,896	0,2763	0,0544	0,0004
H2 t1	0,128	0,0042	9,842	0,3490	0,0130	0,0004
H2 t1	0,240	0,0098	7,451	0,2380	0,0322	0,0010
H3 t1	0,434	0,0134	9,688	0,3018	0,0448	0,0002
H3 t1	0,240	0,0087	12,509	0,4009	0,0192	0,0022
H3 t1	0,346	0,0111	10,892	0,3631	0,0318	0,0008
H4 t1	0,340	0,0122	12,871	0,4262	0,0264	0,0007
H4 t1	0,284	0,0090	10,496	0,3441	0,0271	0,0023
H4 t1	0,490	0,0160	12,097	0,4019	0,0405	0,0009
T4 t1	0,421	0,0144	8,776	0,2813	0,0480	0,0032
T4 t1	0,540	0,0179	12,836	0,4154	0,0421	0,0016
T4 t1	0,390	0,0125	14,402	0,4601	0,0271	0,0015
T1 t2	0,965	0,0299	10,341	0,3391	0,0933	0,0033
T1 t2	0,796	0,0267	11,460	0,3627	0,0695	0,0027
T1 t2	0,878	0,0264	11,563	0,3613	0,0759	0,0021
T2 t2	0,765	0,0277	12,148	0,4077	0,0630	0,0023
T2 t2	1,284	0,0437	13,439	0,4406	0,0955	0,0022
T2 t2	0,653	0,0194	12,940	0,4201	0,0504	0,0017
T4 t2	0,684	0,0218	11,012	0,3683	0,0621	0,0031
T4 t2	1,146	0,0397	11,460	0,3846	0,1000	0,0029
T4 t2	1,065	0,0346	7,519	0,2584	0,1417	0,0044
H1 t2	0,309	0,0103	11,701	0,3836	0,0264	0,0016
H1 t2	0,328	0,0101	12,234	0,4051	0,0268	0,0015
H1 t2	0,484	0,0149	14,454	0,4770	0,0335	0,0028
H2 t2	0,515	0,0169	14,557	0,4836	0,0354	0,0024
H2 t2	0,778	0,0258	13,800	0,4585	0,0564	0,0016
H2 t2	0,759	0,0242	17,672	0,5910	0,0429	0,0014
H3 t2	0,496	0,0162	11,339	0,3646	0,0438	0,0024
H3 t2	0,396	0,0132	13,903	0,4345	0,0285	0,0018
H3 t2	0,271	0,0087	13,869	0,6030	0,0196	0,0012
H4 t2	1,015	0,0332	3,562	0,1089	0,2850	0,0015
H4 t2	0,428	0,0131	11,305	0,3912	0,0378	0,0042

H4 t2	0,340	0,0119	8,087	0,2696	0,0421	0,0008
T3 t2	0,871	0,0295	10,737	0,3244	0,0812	0,0044
T3 t2	1,371	0,0480	12,802	0,4143	0,1071	0,0040
T3 t2	1,321	0,0424	13,249	0,4003	0,0997	0,0035
P1 t2	0,284	0,0146	7,864	0,4139	0,0361	0,0006
P1 t2	0,571	0,0183	14,144	0,4811	0,0404	0,0033
P1 t2	1,121	0,0344	14,695	0,4710	0,0763	0,0020
P2 t2	1,140	0,0395	20,958	0,7009	0,0544	0,0006
P2 t2	0,803	0,0258	12,320	0,3826	0,0652	0,0031
P2 t2	0,809	0,0264	12,596	0,4185	0,0642	0,0022
P3 t2	0,721	0,0228	16,089	0,5310	0,0448	0,0015
P3 t2	0,646	0,0205	11,443	0,3789	0,0565	0,0015
P3 t2	0,690	0,0212	15,228	0,4700	0,0453	0,0027
P4 t2	0,696	0,0211	11,047	0,3959	0,0630	0,0032
P4 t2	0,646	0,0207	14,075	0,4630	0,0459	0,0023
P4 t2	0,771	0,0241	10,823	0,3608	0,0713	0,0025
T1 tf	1,328	0,0432	9,791	0,3484	0,1356	0,0039
T1 tf	1,115	0,0353	13,886	0,4598	0,0803	0,0023
H1 tf	0,378	0,0125	10,600	0,3323	0,0356	0,0009
H1 tf	0,753	0,0231	15,916	0,5604	0,0473	0,0013
T2 tf	1,278	0,0423	9,911	0,3383	0,1289	0,0030
T2 tf	0,915	0,0297	8,397	0,2946	0,1090	0,0043
H2 tf	0,140	0,0045	15,297	0,4903	0,0092	0,0006
H2 tf	1,215	0,0411	18,859	0,6548	0,0644	0,0007
T3 tf	0,728	0,0221	12,888	0,4414	0,0565	0,0034
T3 tf	2,003	0,0659	12,733	0,4029	0,1573	0,0034
H3 tf	0,471	0,0151	14,161	0,4553	0,0333	0,0008
H3 tf	0,296	0,0098	13,370	0,4758	0,0222	0,0017
T4 tf	1,228	0,0390	7,950	0,2564	0,1544	0,0042
T4 tf	0,959	0,0308	12,217	0,4363	0,0785	0,0018
H4 tf	0,546	0,0177	10,737	0,3794	0,0509	0,0026
H4 tf	0,378	0,0118	13,542	0,3869	0,0279	0,0009
P1 tf	0,584	0,0200	14,437	0,4672	0,0404	0,0007
P1 tf	1,009	0,0334	16,484	0,5532	0,0612	0,0006
P2 tf	0,334	0,0112	14,196	0,4654	0,0235	0,0017
P2 tf	0,590	0,0204	9,791	0,3118	0,0603	0,0012
P3 tf	0,778	0,0260	NA	NA	NA	NA
P3 tf	1,009	0,0335	15,848	0,5354	0,0637	0,0006

P4 tf	0,646	0,0237	13,559	0,4692	0,0477	0,0015
P4 tf	0,640	0,0213	12,509	0,4420	0,0512	0,0003
H2 tf	0,546	0,0178	14,867	0,5057	0,0368	0,0022
T3 tf	1,053	0,0366	11,322	0,3904	0,0930	0,0019
P4 tf	0,753	0,0243	11,477	0,4041	0,0656	0,0009
T4 tf	0,784	0,0261	12,441	0,4092	0,0630	0,0040
T2 tf	1,278	0,0394	12,148	0,4049	0,1052	0,0018
P2 tf	0,659	0,0202	12,389	0,4143	0,0532	0,0011
H4 tf	0,546	0,0179	10,479	0,3516	0,0521	0,0005
P1 tf	0,509	0,0167	17,259	0,5910	0,0295	0,0002
T1 tf	1,184	0,0367	25,948	NA	0,0456	0,0002
H1 tf	0,490	0,0155	12,974	0,4226	0,0378	0,0018
H3 tf	0,571	0,0183	16,863	NA	NA	NA
P3 tf	0,478	0,0152	15,985	0,5589	0,0299	0,0003

Annexe C : Résultats bruts des mesures effectuées sur les *Viviparus viviparus* au temps final

Code de l'échantillon	taille t0 (mm)	taille tf (mm)	%N	%C	P total en mg / g sec de bestioles	C:N	C:P	N:P	excrétion de PO4 en µg(P)/h/g sec de bestioles	excrétion de NO3 en mg(N)/h/g sec de bestioles	excrétion de NH4 en mg(N)/h/g sec de bestioles
T1 tf	25,57	25,4	7,58	34,91	4,272	5,371	210,740	39,239	0,196	0,017	0,031
T1 tf	26,48	26,46	7,45	36,56	3,573	5,723	263,860	46,102	0,425	0,013	0,024
H1 tf	23,57	23,97	8,49	34,96	3,755	4,801	240,108	50,009	1,313	0,037	0,046
H1 tf	25,62	25,88	8,94	36,60	3,559	4,773	265,151	55,548	1,055	0,028	0,046
T2 tf	25,59	25,83	8,06	38,11	3,628	5,517	270,895	49,098	0,265	0,014	0,027
T2 tf	22,09	22,31	6,54	36,49	3,056	6,512	307,909	47,282	0,230	0,010	0,016
H2 tf	25,03	25,28	10,59	39,35	3,846	4,333	263,817	60,883	1,041	0,032	0,052
H2 tf	22,42	22,67	9,87	37,23	4,215	4,398	227,785	51,787	0,726	0,024	0,038
T3 tf	25,81	25,88	7,51	38,10	3,491	5,922	281,463	47,530	0,456	0,018	0,033
T3 tf	24,03	24,19	7,02	35,82	3,205	5,954	288,217	48,409	0,366	0,019	0,025
H3 tf	29,21	29,25	7,83	31,66	2,948	4,714	276,910	58,741	0,452	0,016	0,023
H3 tf	27,24	27,13	8,23	36,06	3,078	5,112	302,053	59,085	0,616	0,020	0,032
T4 tf	23,87	24,02	6,97	36,12	2,932	6,049	317,700	52,524	0,366	0,014	0,035
T4 tf	26,86	26,83	8,35	38,60	3,696	5,394	269,317	49,927	0,584	0,018	0,040
H4 tf	21,66	21,93	8,75	38,65	3,908	5,150	255,061	49,522	0,079	0,022	0,033
H4 tf	26,53	26,83	7,09	30,93	3,002	5,092	265,712	52,185	0,287	0,015	0,032
P1 tf	27,58	27,59	8,06	34,70	3,381	5,025	264,671	52,672	0,521	0,021	0,039
P1 tf	25,26	25,23	9,59	38,57	3,905	4,693	254,696	54,267	1,416	0,034	0,058
P2 tf	25,63	25,62	7,62	33,81	3,390	5,177	257,165	49,673	0,481	0,014	0,021
P2 tf	23,12	23,15	7,57	31,95	3,160	4,922	260,725	52,972	0,114	0,025	0,040
P3 tf	28,13	28,23	9,65	37,17	3,071	4,493	312,113	69,465	0,877	0,033	0,038
P3 tf	26,76	26,78	9,64	38,85	4,152	4,702	241,250	51,303	0,622	0,024	NA
P4 tf	26,75	26,64	9,16	37,61	3,759	4,791	258,016	53,854	0,901	0,038	0,070
P4 tf	23,75	23,89	8,68	36,70	4,216	4,933	224,494	45,509	0,778	0,025	0,046
H2 tf	26,5	26,49	7,53	36,67	2,990	5,684	316,303	55,646	0,555	0,015	0,022
T3 tf	28,28	28,47	7,96	35,58	1,747	5,212	525,071	100,749	0,347	0,016	0,030
P4 tf	26,2	26,12	7,90	33,96	3,061	5,016	286,069	57,030	0,756	0,023	0,046
T4 tf	23,54	23,53	7,28	37,97	3,165	6,085	309,413	50,851	0,549	0,016	0,035
T2 tf	22,93	23,08	6,93	36,68	4,471	6,178	211,562	34,246	0,628	0,021	0,045
P2 tf	25,14	25,14	8,35	34,35	4,945	4,798	179,135	37,332	0,526	0,030	NA
H4 tf	25,56	25,42	5,59	28,25	4,108	5,891	177,319	30,100	0,380	0,017	0,027
P1 tf	31,83	31,87	8,93	35,61	4,453	4,654	206,211	44,312	0,351	0,021	0,042

T1 tf	31,74	31,72	10,62	37,26	4,502	4,094	213,400	52,128	0,180	0,025	0,029
H1 tf	30,69	30,84	7,34	33,38	2,920	5,303	294,826	55,600	0,466	0,012	0,018
H3 tf	34,46	34,52	8,98	32,97	4,148	4,283	204,988	47,861	0,353	0,020	0,028
P3 tf	29,37	29,43	8,01	35,44	4,975	5,160	183,709	35,606	0,477	0,015	0,030

Annexe D : Mesures physico-chimiques des aquariums

	température (°C)							pH						
aquarium	t0	t0 bis	t1	t1 bis	t2	t2 bis	tf	t0	t0 bis	t1	t1 bis	t2	t2 bis	tf
H1	18,6	18,4	18,5	18,6	18,6	18,7	18,5	8,23	8,36	8,49	8,49	8,56	8,60	8,50
H2	18,9	18,5	18,6	18,8	18,8	18,8	18,7	8,16	8,31	8,48	8,52	8,57	8,61	8,50
H3	18,9	18,4	18,6	18,8	18,7	18,9	18,6	8,25	8,40	8,49	8,52	8,57	8,60	8,51
H4	18,6	18,2	18,4	18,6	18,5	19,0	18,3	8,20	8,33	8,48	8,51	8,56	8,58	8,53
T1	18,6	18,4	18,5	18,7	18,7	18,8	18,6	8,18	8,20	8,39	8,37	8,46	8,50	8,42
T2	18,8	18,4	18,6	18,8	18,7	18,8	18,7	8,22	8,28	8,36	8,40	8,44	8,47	8,37
T3	18,8	18,5	18,6	18,8	18,9	18,9	18,7	8,15	8,26	8,34	8,39	8,46	8,50	8,40
T4	18,7	18,4	18,6	19,0	18,8	19,0	18,6	8,17	8,21	8,35	8,40	8,45	8,49	8,45
P1	18,4	18,2	18,4	18,5	18,4	18,5	18,2	8,24	8,29	8,38	8,37	8,43	8,47	8,42
P2	18,4	18,2	18,4	18,4	18,4	18,5	18,1	8,29	8,40	8,42	8,40	8,46	8,49	8,45
P3	18,4	18,2	18,3	18,3	18,3	18,4	18,0	8,24	8,34	8,40	8,36	8,40	8,47	8,42
P4	18,6	18,1	18,4	18,4	18,3	18,4	18,1	8,18	8,26	8,39	8,37	8,43	8,47	8,41
Moyenne général	**18,6**	**18,3**	**18,5**	**18,6**	**18,6**	**18,7**	**18,4**	**8,2**	**8,3**	**8,4**	**8,4**	**8,5**	**8,5**	**8,4**
Ecart type	**0,1**	**0,1**	**0,1**	**0,2**	**0,2**	**0,2**	**0,2**	**0,0**	**0,1**	**0,0**	**0,1**	**0,1**	**0,1**	**0,0**

	conductivité (µS/cm)							oxygène dissous (mg/L)						
aquarium	t0	t0 bis	t1	t1 bis	t2	t2 bis	tf	t0	t0 bis	t1	t1 bis	t2	t2 bis	tf
H1	373	393	380	362	363	372	362	8,88	9,36	9,47	9,45	9,63	9,50	9,67
H2	366	389	371	365	365	365	356	8,81	9,35	9,45	9,47	9,61	9,49	9,65
H3	373	398	368	366	371	377	367	8,64	9,34	9,44	9,46	9,58	9,47	9,64
H4	359	380	359	360	360	362	385	8,84	9,35	9,47	9,49	9,60	9,48	9,66
T1	342	354	363	350	346	345	339	8,84	9,33	9,46	9,46	9,65	9,50	9,67
T2	331	348	346	345	343	344	340	8,83	9,23	9,40	9,43	9,58	9,45	9,56
T3	332	351	351	351	349	349	343	8,87	9,25	9,45	9,47	9,61	9,51	9,62
T4	318	313	336	345	344	348	370	8,89	9,28	9,42	9,44	9,61	9,48	9,59
P1	328	326	324	332	332	331	345	8,94	9,38	9,47	9,52	9,68	9,53	9,72
P2	351	365	344	344	340	336	353	8,71	9,34	9,52	9,56	9,68	9,56	9,72
P3	342	341	332	336	334	335	348	8,91	9,38	9,48	9,57	9,70	9,57	9,78
P4	328	320	329	335	336	334	343	8,84	9,34	9,47	9,56	9,67	9,57	9,74
Moyenne général	**345,3**	**356,5**	**350,3**	**349,3**	**348,6**	**349,8**	**354,3**	**8,8**	**9,3**	**9,5**	**9,5**	**9,6**	**9,5**	**9,7**
Ecart type	**16,0**	**23,8**	**15,1**	**9,8**	**10,8**	**12,8**	**11,5**	**0,1**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**	**0,0**

Annexe E : Mesures des concentrations en ammonium, phosphates, nitrates et nitrites de l'eau des aquariums

T	N-NO2 (µg/L)	N-NO3 (mg/L)	N-NH4 (mg/L)	P-P04 (µg/L)
t0	2,59	1,55	0,28	15,46
t0 bis	295,44	2,18	0,67	40,60
t1	442,34	3,40	0,14	90,42
t1 bis	345,05	3,77	0,02	133,32
t2	206,80	4,38	0,02	158,46
t2 bis	123,57	3,85	0,02	142,40
Tf	65,34	4,56	0,04	118,93

H	N-NO2 (µg/L)	N-NO3 (mg/L)	N-NH4 (mg/L)	P-P04 (µg/L)
t0	4,66	1,73	0,18	19,17
t0 bis	16,38	2,41	0,08	70,07
t1	20,54	1,72	0,05	76,47
t1 bis	46,12	1,62	0,04	75,31
t2	72,70	2,22	0,04	95,40
t2 bis	39,96	1,34	0,04	59,45
Tf	52,82	2,11	0,04	45,34

P	N-NO2 (µg/L)	N-NO3 (mg/L)	N-NH4 (mg/L)	P-P04 (µg/L)
t0	11,20	1,44	0,11	13,33
t0 bis	142,40	2,03	0,24	26,86
t1	169,09	2,30	0,06	23,43
t1 bis	159,33	2,97	0,04	25,90
t2	142,70	3,55	0,04	29,03
t2 bis	97,15	3,14	0,04	20,00
Tf	103,04	3,82	0,04	18,86

Annexe F : Résultats buts des mesures effectuées sur les trois sources de nourriture

Code nourriture	Type de nourriture	N° réplicat	%N	%C	%P	N:P	C:N	C:P
TETRA_1	TETRA	1	6,537	45,627	0,716	20,2	8,1	164,4
TETRA_2	TETRA	2	6,516	45,474	0,727	19,8	8,1	161,2
TETRA_3	TETRA	3	6,350	44,082	0,778	18,0	8,1	146,1
ALGUE_1	ALGUE	1	1,505	18,947	0,239	13,9	14,7	204,7
ALGUE_2	ALGUE	2	1,509	19,133	0,379	8,8	14,8	130,2
ALGUE_3	ALGUE	3	1,532	19,343	0,283	12,0	14,7	176,5
SED_1	SEDIMENT	1	0,276	2,359	0,033	18,3	10,0	182,9
SED_2	SEDIMENT	2	0,227	1,872	0,045	11,3	9,6	108,5
SED_3	SEDIMENT	3	0,261	2,155	0,035	16,3	9,6	156,7