

INFLUENCE DU NITRATE SUR LA STRUCTURE ET LE FONCTIONNEMENT DES BIOFILMS AQUATIQUES D'EAU DOUCE AFFECTES PAR LES ACTIVITES MINIERES

Par

Cassandra Madru

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.) en sciences de l'eau

Jury d'évaluation

Présidente du jury et
examinatrice interne

Isabelle Laurion
Centre Eau Terre Environnement,
Institut national de la recherche scientifique

Examineur externe

Vincent Fugère
Département des sciences de l'environnement
Université du Québec à Trois-Rivières

Directeur de recherche

Jérôme Comte
Centre Eau Terre Environnement,
Institut national de la recherche scientifique

Codirectrice de recherche

Isabelle Lavoie
Centre Eau Terre Environnement,
Institut national de la recherche scientifique

Codirecteur de recherche

Claude Fortin
Centre Eau Terre Environnement,
Institut national de la recherche scientifique

Directrice de recherche

Soizic Morin
Institut national de recherche pour l'agriculture,
l'alimentation et l'environnement

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu ma direction, les Pr Jérôme Comte et Soizic Morin, ainsi que ma codirection, les Pr Isabelle Lavoie et Claude Fortin, pour m'avoir offert l'opportunité de travailler sur ce projet de maîtrise.

Merci Jérôme pour ton soutien et ta compréhension tout au long de cette maîtrise, en espérant avoir cumulé le quota de malchance pour tous tes étudiants à venir. Mais on y est ! Merci Claude pour ton aide précieuse avec la physico-chimie du projet, sans toi, on aurait été perdus. Merci Isabelle pour ton expertise sur les diatomées et pour m'avoir laissé ton bureau, un espace de rédaction idéal avec toutes tes plantes. Sans oublier Soizic, merci pour ton accueil chaleureux à l'INRAE, ta bonne humeur et ton sourire. Tes mails sont toujours bons pour le moral ! Enfin, un immense merci à vous quatre pour votre aide précieuse sur ce mémoire, votre temps et vos commentaires constructifs.

Je remercie également les partenaires du projet, notamment la mine LaRonde, pour l'accès au site et le temps qu'ils m'ont accordé.

Un grand merci à l'équipe du laboratoire de Jérôme Comte : Charis, Aurélie, Emmy, Martial, Christophe, Valentine, Maude, Alizée et Thomas, pour la bonne ambiance que chacun apporte à sa façon, faisant du labo un endroit où il fait bon travailler. Un remerciement tout particulier à Thomas pour son aide avec les données de séquençage problématiques et le temps investi. Merci aussi à Christophe pour ton soutien au début des analyses de métabarcoding lorsque j'étais en France. Je tiens également à remercier Laura, de l'équipe d'Isabelle Lavoie, pour son aiguillage sur les acides gras.

Sur un plan plus personnel, merci Charis Wong pour ta présence, ta gentillesse et ton écoute précieuse. Merci Valentine Cyriaque alias « pingouin » pour ton soutien émotionnel et tes bonnes ondes. Et bien sûr, merci Aurélie Beaulieu-Laliberté d'avoir été là ! Tu as été mon roc tout au long de cette maîtrise. On a évolué ensemble, ri, râlé, mais on a réussi !

Enfin, un merci tout particulier à ma mère, Corine Madru, pour son soutien indéfectible et ses encouragements. Merci de m'avoir permis de partir étudier à l'étranger et d'avoir cru en moi, même si ce n'est pas toujours évident de suivre ce que je fais. Il y a eu des hauts et des bas, mais tu as toujours été là pour m'aider et m'encourager avec bienveillance.

RESUME

Le secteur minier est en pleine expansion au Québec, entraînant des préoccupations environnementales en raison du rejet de contaminants, notamment le nitrate, dans les écosystèmes aquatiques. Malgré les réglementations en vigueur, les rejets de nitrate ne font pas l'objet d'un suivi systématique, alors qu'ils contribuent à l'eutrophisation et influencent les cycles biologiques des organismes aquatiques. Afin d'atténuer ces effets, le COREM (Consortium de recherche appliquée en traitement et transformation des substances minérales) a développé une technologie innovante visant à réduire leur concentration dans les effluents miniers. Ce projet de maîtrise évalue les effets du nitrate issu de l'industrie minière sur les biofilms à l'aide d'une approche de biosurveillance multi-descripteurs. Les biofilms, reconnus pour leur sensibilité aux fluctuations environnementales, ont été étudiés dans des conditions naturelles ainsi qu'au sein d'expériences en mésocosmes. La qualité nutritionnelle des biofilms exposés aux effluents en milieu naturel a été analysée par le profilage des acides gras, et les communautés microbiennes ont été caractérisées par séquençage à haut débit des marqueurs taxonomiques des bactéries, eucaryotes et champignons. Les résultats montrent une diminution de la qualité nutritionnelle des biofilms exposés aux effluents miniers ainsi qu'une restructuration de leurs communautés microbiennes. Les facteurs physico-chimiques jouent donc un rôle clé dans la structuration des communautés périphytiques. Les expériences en mésocosmes ont confirmé que l'exposition au nitrate induit des modifications significatives de la composition taxonomique et des profils biochimiques des biofilms, mettant en évidence leur rôle dans la réponse des communautés. Ces résultats soulignent l'intérêt des biofilms comme bioindicateurs des effets des effluents miniers et démontrent les bénéfices de réduire davantage les rejets de nitrate dans l'environnement.

Mots-clés : Biofilm, effluents miniers, nitrate, communautés microbiennes, acides gras

ABSTRACT

The mining sector in Quebec is undergoing rapid expansion, raising concerns about the discharge of pollutants, particularly nitrate, into aquatic ecosystems. Despite the existence of regulatory frameworks, there is a lack of systematic monitoring of nitrate discharges, even though they contribute to eutrophication and disrupt the biological cycles of aquatic organisms. To mitigate these effects, COREM (Consortium for applied research in mineral processing and treatment) has developed an innovative technology to reduce nitrate concentrations in mining effluents. This Master's project aims to assess the impact of mining-derived nitrate on biofilms using a multi-descriptor biomonitoring approach. Biofilms, which are recognised for their sensitivity to environmental fluctuations, have been extensively studied in both natural settings and mesocosm experiments. The nutritional quality of the biofilms exposed to effluent in the natural environment was determined by fatty acid profiling, while microbial communities were characterised by high-throughput sequencing of bacterial, eukaryotic and fungal taxonomic markers. The results indicate a decline in the nutritional quality of biofilms exposed to mine effluents, accompanied by a restructuring of their microbial communities. This finding highlights the critical role of physico-chemical factors in shaping periphytic communities. Mesocosm experiments confirmed that nitrate exposure induced significant changes in the taxonomic composition and biochemical profiles of biofilms, underlining their role in community responses. The findings underscore the potential of biofilms as bioindicators to monitor the impact of mining effluents and demonstrate the importance of reducing nitrate discharges into the environment.

Key words : biofilm, mining effluent, nitrate, microbial communities, fatty acids

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	iii
RESUME	v
ABSTRACT	vii
TABLE DES MATIERES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX	xii
LISTE DES FIGURES	xiii
LISTE DES ABREVIATIONS.....	xvi
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Le secteur minier au Québec.....	1
1.2 Répercussions sur les milieux récepteurs	3
1.3 Problématique du nitrate.....	5
1.4 Contexte de l'étude	7
1.5 Le biofilm comme bioindicateur	8
1.5.1 Définition	8
1.5.2 Le biofilm : un outil de bio-suivi des milieux aquatiques	10
1.6 La place de la génomique dans l'étude des biofilms	12
1.7 Rôle des acides gras	13
1.7.1 Identification de biomarqueurs lipidiques	14
1.8 Projet de recherche	15
1.9 Objectifs et hypothèses de recherche	16
2. CHAPITRE 1 : L'INDUSTRIE MINIÈRE AURIFÈRE : UNE SOURCE DE STRESS ENVIRONNEMENTAL POUR LES MILIEUX RÉCEPTEURS.....	18
2.1 Méthodologie	20
2.1.1 Échantillonnage de terrain	20
2.1.2 Analyses sur le biofilm benthique.....	23
2.1.2.1 Identification des assemblages de diatomées et des formes tératologiques.....	23
2.1.2.2 Caractérisation de la structure des communautés bactériennes et algales	24
2.1.2.3 Analyse des acides gras	25
2.1.2.4 Analyses statistiques	26

2.2 Résultats	27
2.2.1 Paramètres physico-chimiques des sites d'échantillonnage	27
2.2.2 Analyse de la qualité nutritionnelle du biofilm	29
2.2.3 Analyse de la composante eucaryote du biofilm	31
2.2.3.1 Observations au microscope des diatomées	31
2.2.3.2 Analyses taxonomiques des communautés eucaryotes par metabarcoding	33
2.2.4 Analyses de la composante bactérienne du biofilm	37
2.3 Discussion	39
2.3.1 Implication des activités minières dans la chimie du cours d'eau	39
2.3.2 Influence des conditions environnementales sur les communautés microbiennes (procaryotes et eucaryotes)	40
2.3.3 Effet du gradient environnemental sur la qualité nutritionnelle du biofilm	42
2.4 Conclusion	45
3. CHAPITRE 2 : INFLUENCE DU NITRATE DANS LES CHANGEMENTS DE COMMUNAUTÉS	48
3.1 Méthodologie	49
3.1.1 Dispositif expérimental	49
3.1.2 Caractérisation de la structure des communautés benthiques	51
3.1.3 Analyse des acides gras	51
3.1.4 Analyses statistiques	52
3.2 Résultats	53
3.2.1 Analyses des communautés de biofilm	53
3.2.1.1 Composante bactérienne	53
3.2.1.2 Composante eucaryote	56
3.2.1.3 Composante fongique	60
3.2.2 Analyse des profils lipidiques	63
3.2.2.1 Gradient minier	63
3.2.2.2 Gradient de nitrate	65
3.3 Discussion	67
3.3.1 Restructuration des communautés de biofilm en réponse à un gradient chimique	67

3.3.2 Contribution spécifique du nitrate.....	70
3.3.3 Influence du nitrate sur la qualité nutritionnelle du biofilm	73
3.4 Conclusion	74
4. CONCLUSION	78
5. BIBLIOGRAPHIE	82
6. ANNEXE I : MATERIEL SUPPLEMENTAIRE CHAPITRE 1	103

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : EXIGENCES DE REJET DE L'EFFLUENT FINAL (DIRECTIVE 019 SUR L'INDUSTRIE MINIERES, MELCCFP, 2025)	5
TABLEAU 2. LES ACIDES GRAS, INDICATEURS DE CLASSES PHYLOGENETIQUES	15
TABLEAU 3 : VARIATIONS DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES LE LONG DU GRADIENT D'EXPOSITION AUX EFFLUENTS MINIERES	28
TABLEAU 4 : CONTRIBUTIONS DES PRINCIPALES ESPECES EUCARYOTES AUX DISSIMILARITES ENTRE LES SITES (SIMPER).....	36
TABLEAU 5 : CONTRIBUTIONS DES PRINCIPALES ESPECES BACTERIENNES AUX DISSIMILARITES ENTRE LES SITES (SIMPER).....	39
TABLEAU 6 : COMPOSITION CHIMIQUE DE L'EAU RECONSTITUEE DES MESOCOSMES POUR LES DEUX GRADIENTS D'EXPOSITION.....	50
TABLEAU 7 : ANALYSE SIMPER DES PRINCIPAUX TAXONS CONTRIBUANT A LA DISSIMILARITE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES LE LONG DES GRADIENTS MINIER (A) ET DE NITRATE (B) SEULS LES TAXONS AYANT LA PLUS FORTE CONTRIBUTION SONT AFFICHES.	56
TABLEAU 8 : ANALYSE SIMPER DES PRINCIPAUX TAXONS CONTRIBUANT A LA DISSIMILARITE DES COMMUNAUTES EUCARYOTES LE LONG DES GRADIENTS MINIER (A) ET DE NITRATE (B) SEULS LES PRINCIPAUX CONTRIBUTEURS A LA DISSIMILARITE SONT ILLUSTRÉS.	60
TABLEAU 9 : ANALYSE SIMPER DES PRINCIPAUX TAXONS CONTRIBUANT A LA DISSIMILARITE DES COMMUNAUTES FONGIQUES LE LONG DES GRADIENTS MINIER (A) ET DE NITRATE (B). SEULS LES PRINCIPAUX CONTRIBUTEURS A LA DISSIMILARITE SONT ILLUSTRÉS	63
TABLEAU 10 : PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES OBSERVES AUX 3 SITES LORS DES 2 CAMPAGNES D'ECHANTILLONNAGE	103
TABLEAU 11 : LISTE DES DIATOMEES IDENTIFIEES AUX SITES D'ECHANTILLONNAGE. CORRESPONDANCE ENTRE LES CODES DES DIATOMEES UTILISES DANS LA FIGURE 9 ET LEURS NOMS SCIENTIFIQUES COMPLETS. CE TABLEAU PERMET D'IDENTIFIER PRECISEMENT CHAQUE TAXON PRESENT AUX DIFFERENTS SITES D'ECHANTILLONNAGE.....	103

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : MINES ACTIVES ET EN MAINTENANCE AU QUEBEC EN 2024 (MINISTÈRE DE L'ÉNERGIE ET DES RESSOURCES NATURELLES)	2
FIGURE 2 : SCHEMA REPRESENTANT LES IMPACTS DU PROCESSUS D'EUTROPHISATION DES COURS D'EAU.....	ERREUR ! LE SIGNET N'EST PAS DEFINI.
FIGURE 3 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA COMPOSITION D'UN BIOFILM BENTHIQUE	9
FIGURE 4 : LOCALISATION DES SITES D'ÉCHANTILLONNAGE.....	ERREUR ! LE SIGNET N'EST PAS DEFINI.
FIGURE 5 : PHOTOGRAPHIES DES SITES D'ÉCHANTILLONNAGE (A : AMONT, B : EFFLUENT, C : AVAL)	ERREUR ! LE SIGNET N'EST PAS DEFINI.
FIGURE 6 : ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES. PROJECTION DES VARIABLES ENVIRONNEMENTALES SUR L'AXE 1 ET 2 DE L'ACP QUI A PERMIS D'EXPLIQUER 95,7 % DE LA VARIANCE SPATIALE ET TEMPORELLE.	29
FIGURE 7 : REPARTITION DES PRINCIPALES CLASSES D'ACIDES GRAS AU SEIN DES 3 SITES D'ÉCHANTILLONNAGE.....	30
FIGURE 8 : FORMES NORMALE (GAUCHE) ET TERATOLOGIQUES (DROITE) <i>D'ACHNANTHIDIUM MINUTISSIMUM</i> (A), FORME NORMALE DE <i>FRAGILARIA CAPUCINA</i> VAR. <i>GRACILIS</i> (B), FORMES TERATOLOGIQUES DE <i>F. CAPUCINA</i> VAR. <i>GRACILIS</i> (C)	32
FIGURE 9 : REPARTITION DES DIATOMÉES ENTRE LES TROIS SITES D'ÉCHANTILLONNAGE	33
FIGURE 10 : RICHESSE SPECIFIQUE DES COMMUNAUTES EUCARYOTES (CHAO1) (A) NMDS DES COMMUNAUTES EUCARYOTES EN FONCTION DES STATIONS, BASEE SUR UNE DISTANCE DE BRAY-CURTIS. LES DISTANCES ENTRE LES POINTS ILLUSTRONT LA SIMILARITE DES COMMUNAUTES ENTRE LES CONDITIONS. (B) PROFILS TAXONOMIQUE DES COMMUNAUTES EUCARYOTES EUCARYOTES A L'ECHELLE DU GENRE. SEULS LES GENRES LES PLUS ABONDANTS SONT REPRESENTES. (C).....	35
FIGURE 11 : RICHESSE SPECIFIQUE DES COMMUNAUTES PROCARYOTES (CHAO1) (A) NMDS DES COMMUNAUTES PROCARYOTES EN FONCTION DES STATIONS, BASEE SUR UNE DISTANCE DE BRAY-CURTIS. LES DISTANCES ENTRE LES POINTS ILLUSTRONT LA SIMILARITE DES COMMUNAUTES PROCARYOTES ENTRE LES CONDITIONS. (B) PROFILS TAXONOMIQUES DES COMMUNAUTES PROCARYOTES A L'ECHELLE DU GENRE. SEULS LES GENRES LES PLUS ABONDANTS SONT REPRESENTES. (C).....	38
FIGURE 12 : PHOTOGRAPHIE DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL MIS EN PLACE	51
FIGURE 13 : NMDS DES COMMUNAUTES PROCARYOTES EN FONCTION DES DEUX GRADIENTS, BASEE SUR UNE DISTANCE DE BRAY-CURTIS. LES DISTANCES ENTRE LES POINTS ILLUSTRONT LA	

SIMILARITE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES ENTRE LES CONDITIONS. (A) RICHESSE SPECIFIQUE DES COMMUNAUTES PROCARYOTES LE LONG DES DEUX GRADIENTS (CHAO1) (B) PROFILS TAXONOMIQUES DES COMMUNAUTES PROCARYOTES A L'ECHELLE DU GENRE. SEULS LES GENRES LES PLUS ABONDANTS SONT REPRESENTES. (C)	55
FIGURE 14 : NMDS DES COMMUNAUTES EUCARYOTES EN FONCTION DES DEUX GRADIENTS, BASEE SUR UNE DISTANCE DE BRAY-CURTIS. LES DISTANCES ENTRE LES POINTS ILLUSTRONT LA SIMILARITE DES COMMUNAUTES EUCARYOTES ENTRE LES CONDITIONS (A) RICHESSE SPECIFIQUE DES COMMUNAUTES EUCARYOTES LE LONG DES DEUX GRADIENTS (CHAO1) (B) PROFILS TAXONOMIQUES DES COMMUNAUTES EUCARYOTES A L'ECHELLE DU GENRE. SEULS LES GENRES LES PLUS ABONDANTS SONT REPRESENTES. (C).....	59
FIGURE 15 : NMDS DES COMMUNAUTES FONGIQUES EN FONCTION DES DEUX GRADIENTS, BASEE SUR UNE DISTANCE DE BRAY-CURTIS. LES DISTANCES ENTRE LES POINTS ILLUSTRONT LA SIMILARITE DES COMMUNAUTES FONGIQUES ENTRE LES CONDITIONS (A) RICHESSE SPECIFIQUE DES COMMUNAUTES FONGIQUES LE LONG DES DEUX GRADIENTS (CHAO1) (B) PROFILS TAXONOMIQUES DES COMMUNAUTES FONGIQUES A L'ECHELLE DU GENRE. SEULS LES GENRES LES PLUS ABONDANTS SONT REPRESENTES (C).....	62
FIGURE 16 : ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES REALISEES SUR LES DONNEES D'ACIDES GRAS DES BIOFILMS EXPOSES AU GRADIENT MINIER QUI A PERMIS D'EXPLIQUER 69 % DE LA VARIANCE DE LA COMPOSITION DES ASSEMBLAGES DE BIOFILM. PROJECTION DES OBSERVATIONS PAR CONDITION D'EXPOSITION (A) PROJECTION DES VARIABLES SUR L'AXE 1 ET 2 DE L'ACP	64
FIGURE 17 : REPARTITION DES PRINCIPAUX GROUPES D'ACIDES GRAS LE LONG DU GRADIENT MINIER (EN %)	65
FIGURE 18 : ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES REALISEES SUR LES DONNEES D'ACIDES GRAS DES BIOFILMS EXPOSES AU GRADIENT DE NITRATE QUI A PERMIS D'EXPLIQUER 72,2 % DE LA VARIANCE DE LA COMPOSITION DES ASSEMBLAGES DE BIOFILM. PROJECTION DES OBSERVATIONS PAR CONDITION D'EXPOSITION (A) PROJECTION DES VARIABLES SUR L'AXE 1 ET 2 DE L'ACP (B)	66
FIGURE 19 : REPARTITION DES PRINCIPAUX GROUPES D'ACIDES GRAS LE LONG DU GRADIENT DE NITRATE (EN %).....	67

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ALA	Acide alpha-linolénique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
COREM	Consortium de recherche appliquée en traitement et transformation des substances minérales
DHA	Acide docosahexaénoïque
EPA	Acide eicosapentanoïque
IBD	Indice Biologique Diatomées
IBI	Indice Intégrité Biologique
IDEC	Indice Diatomées de l'Est du Canada
ITS	espaceur interne transcrit
LIN	Acide linoléique
MUFA	Mono – Unsaturated Fatty Acid (Acide gras mono-insaturé)
PERMANOVA	Permutational Multivariate Analysis of Variance
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acid (Acide gras poly-insaturé)
RDA	Redundancy Analysis
Rpm	Revolutions per minutes (Tours par minute)
SFA	Saturated Fatty Acid (Acide gras saturé)
SIMPER	Similarity Percentages

1. INTRODUCTION

1.1 Le secteur minier au Québec

Au Canada, et plus précisément au Québec, le secteur minier représente un secteur d'activité en pleine expansion (Ressources naturelles Canada, 2025). Le développement des nouvelles technologies est responsable d'une hausse des demandes en minéraux critiques et stratégiques. Le Québec représente un atout pour le Canada en raison de son potentiel minéral ; cette province offre une exploitation de ressources les plus diversifiées du Canada. De ce fait, le Québec représente un cinquième de la production minière du Canada en termes de quantité de minerai produit. Avec une superficie de 1,7 million de kilomètres carrés, le Québec recensait 21 mines en activité en 2023, majoritairement réparties entre les régions de l'Abitibi- Témiscamingue, du Nord-du-Québec et de la Côte-Nord (figure 1). Ces mines exploitent des ressources diverses, représentant 17 métaux et 12 substances non métalliques, le fer et l'or étant toutefois les principales substances exploitées (Gouvernement du Canada, 2022). L'exploitation de ces ressources permet au Québec de se classer à la première position face aux autres provinces du Canada concernant le fer, le niobium et le graphite en valeur de livraisons, ainsi qu'à la deuxième place pour l'or, le nickel, le zinc et les éléments du groupe du platine. Les ressources en cobalt et en cuivre positionnent le Québec à la troisième place canadienne (Gouvernement du Québec, 2023).

Mines actives et en maintenance

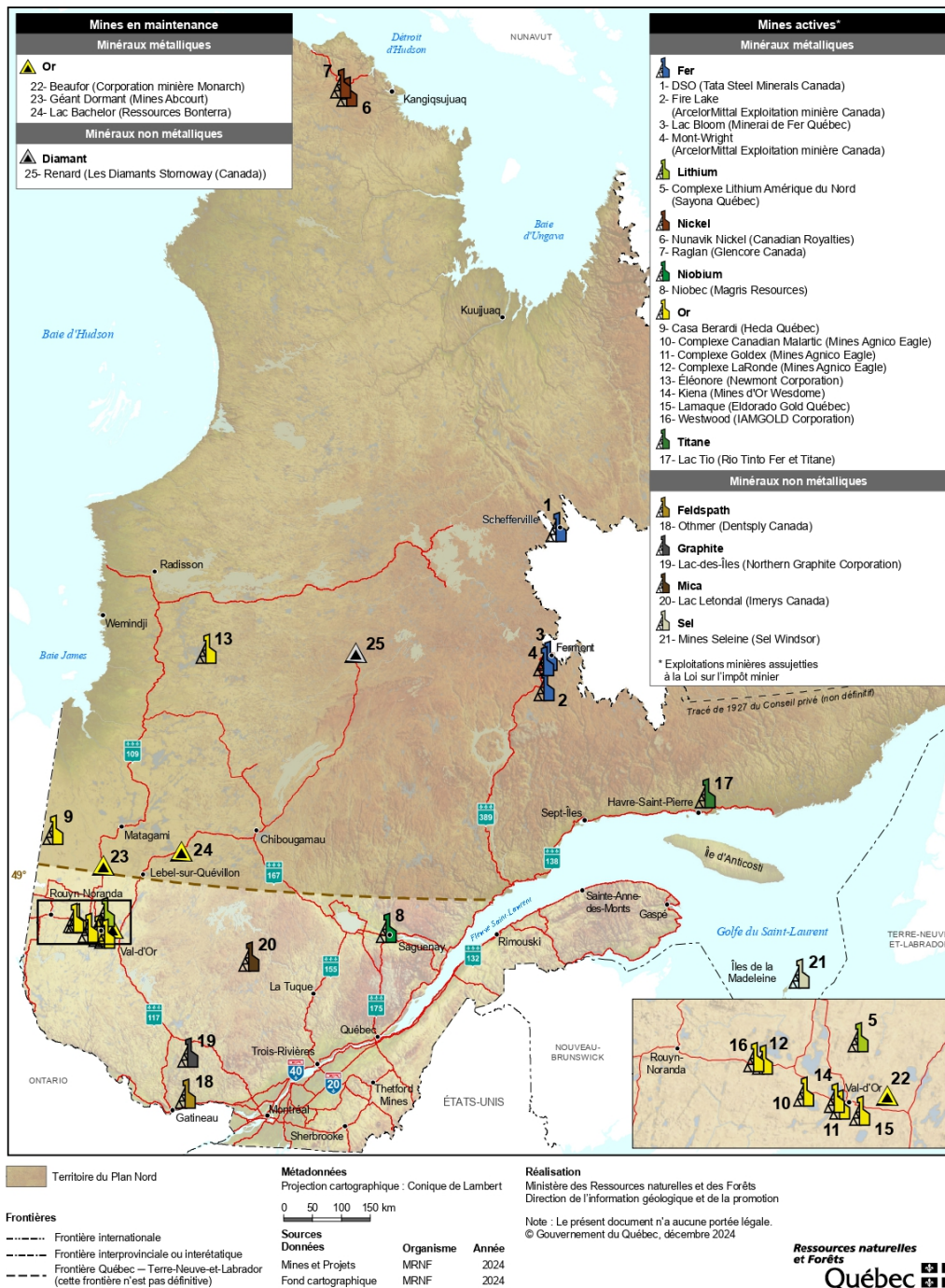


Figure 1 : Mines actives et en maintenance au Québec en 2024 (Ministère de l'Énergie et des Ressources naturelles)

1.2 Répercussions sur les milieux récepteurs

Compte tenu de l'importance de l'industrie minière au Québec, de nombreuses études ont évalué l'impact de ces dernières sur l'environnement. L'une des problématiques vise le rejet des effluents miniers dans les écosystèmes aquatiques naturels, or ces derniers sont constitués d'eaux enrichies en différents composés propres au type d'exploitation comme des métaux, du sulfate et du nitrate. Les effluents sont composés d'eau utilisée pour le traitement du minerai et d'eau d'exhaure provenant des eaux d'infiltration se concentrant dans les chantiers souterrains et les aires d'accumulation des résidus miniers. Les eaux d'exhaure sont enrichies par les processus physico-chimiques et biologiques engendrés par le contact de l'eau et de la roche, mais également par l'utilisation d'explosifs. Les apports liés aux effluents dans les milieux récepteurs ont été étudiés à de multiples reprises permettant de mettre en évidence le transfert de métaux dans les sédiments des cours d'eau (Gray et Eppinger 2012, Cheney et al. 2024). Le terme de "métaux lourds" basé sur la densité, le poids atomique ou le nombre atomique des métaux, est utilisé pour désigner les métaux et metalloïdes présentant des propriétés toxiques et écotoxiques (Duffus 2002).

Afin de déterminer les enjeux liés à la présence de métaux tels que le cadmium, le zinc, l'arsenic, le mercure et le plomb, dans les écosystèmes aquatiques, des études ont été menées sur des sites perturbés par les activités minières ainsi qu'en laboratoire sur divers organismes modèles (Fadhlaoui et al. 2020, Doose et al. 2021, Chan et al. 2021, Laderriere et al. 2021). La présence de tels composés dans les sédiments et dans les eaux de surface peut affecter la composante biologique des cours d'eau. Par exemple, des composés tels que le cuivre sont absorbés par les micro-organismes à la base de la chaîne alimentaire (Kurniawan et al. 2022). Cette absorption d'éléments métalliques, dont certains sont essentiels à la vie mais potentiellement toxiques à des concentrations élevées, peut affecter les communautés microbiennes. En réponse à ce stress, certaines espèces développent des stratégies d'adaptation, notamment une réduction de leur taille cellulaire. Cette diminution du volume cellulaire optimise le rapport surface/volume, ce qui facilite l'absorption des nutriments essentiels tout en limitant l'accumulation de métaux toxiques (Echeveste et al. 2012, Machado et Soares 2014). Par ailleurs, ces conditions environnementales sélectives favorisent la prédominance d'espèces tolérantes, comme observé chez les diatomées exposées à des contaminants métalliques (Morin et al. 2008, Leguay et al. 2016, Olenici et al. 2017). D'autre part, de nombreuses microalgues présentent des capacités de biosorption et de bioaccumulation intracellulaire des métaux lourds présents dans leur environnement. Des études

ont été menées sur les répercussions de la contamination métallique sur la chaîne alimentaire (Landers et al. 2019), notamment sur les consommateurs primaires comme les cladocères et chironomides, ainsi que sur les consommateurs supérieurs (Little et al. 2020, Persaud et al. 2021, Thienpont et al. 2016, Fadhlaoui et al. 2024). Les organismes supérieurs tels que les poissons ont montré des concentrations en éléments métalliques toxiques importantes dans leurs tissus, résultant de leur alimentation et par absorption directe de l'eau contaminée (Farag et al. 2007, Yang et al. 2023).

Toutes ces études mettant en évidence les effets délétères des métaux sur les organismes aquatiques ont abouti à la mise en place de normes environnementales concernant les rejets miniers. L'industrie minière doit répondre à des exigences recensées au sein de la directive 019 (https://www.environnement.gouv.qc.ca/milieu_ind/directive019/) du ministère de l'Environnement, de la Lutte contre les changements climatiques, de la Faune et des Parcs (MELCCFP) dont une mise à jour a été réalisée en 2025. L'effluent final doit présenter un pH compris entre 6 et 9,5 afin d'être rejeté dans les écosystèmes, sa composition doit également être contrôlée avec des concentrations en divers éléments ne devant pas dépasser les normes présentées dans le tableau 1. Un suivi régulier des paramètres de l'effluent doit donc être effectué durant toute la période d'activité des mines, dont des mesures de débit (m^3/j) et de pH en continu. Les minerais exploités contiennent des sulfures, or ces derniers réagissent avec l'oxygène pour former de l'acide sulfurique, acidifiant ainsi l'effluent. Une acidification du milieu peut entraîner la solubilisation des métaux lourds, augmentant leur biodisponibilité et leur toxicité pour les organismes aquatiques (Gray 1997, Nordstrom 2011). Le pH est donc une variable importante à surveiller régulièrement pour protéger les cours d'eau. De plus, le suivi de débit et de pH permet de rendre compte de fuites ou de défaillance des systèmes de traitement du minerai, permettant ainsi de mettre en place des mesures préventives ou correctives visant à réduire les effets des effluents sur les écosystèmes. L'analyse des matières en suspension dans l'effluent doit être effectuée trois fois par semaine, tandis que les éléments métalliques toxiques doivent être contrôlés une fois par semaine, ainsi que les cyanates, cyanures totaux et thiocyanates dont l'analyse n'est requise que pour les effluents provenant d'exploitation de traitement du minerai de métaux précieux ou employant des cyanures dans leur procédé. D'autres éléments constitutifs de l'effluent ne nécessitent un contrôle qu'une fois par année au cours des mois de juillet ou d'août, tels que le nitrite et le nitrate. Toutefois le nitrate joue un rôle essentiel dans les écosystèmes aquatiques (nutriment) et un apport azoté dans ces milieux est susceptible d'avoir des conséquences notables sur le biote.

Tableau 1 : Exigences de rejet de l'effluent final (Directive 019 sur l'industrie minières, MELCCFP, 2025)

Paramètre	Colonne I Concentration moyenne mensuelle maximale	Colonne II Concentration quotidienne maximale
Arsenic extractible	0,1 mg/l	0,2 mg/l
Cuivre extractible	0,1 mg/l	0,2 mg/l
Fer extractible	3 mg/l	6 mg/l
Nickel extractible	0,25 mg/l	0,5 mg/l
Plomb extractible	0,08 mg/l	0,16 mg/l
Zinc extractible	0,4 mg/l	0,8 mg/l
Cyanures totaux	0,5 mg/l	1 mg/l
Hydrocarbures pétroliers (C ₁₀ -C ₅₀)	-----	2 mg/l
Matières en suspension	15 mg/l	30 mg/l
Radium 226	0,37 Bq/l	1,11 Bq/l

1.3 Problématique du nitrate

Dans le sous-secteur des métaux précieux regroupant l'or et l'argent, le traitement du minerai composé de roches porphyriques et de sulfures nécessite le traitement par cyanuration. Ce procédé consiste en une mise en solution de minerai avec des cyanures alcalins en présence d'oxygène, aboutissant à la formation de cyanure qui réagit avec des métaux pour former différents complexes (Johnson 2015, Mekuto et al. 2016). Outre des métaux, les effluents miniers contiennent des concentrations importantes de nitrate dues (i) à la dégradation des thiocyanates, sous-produits réactionnels entre les sulfures et le cyanure dans les circuits de cyanuration, et (ii) à l'emploi d'explosifs à base de nitrate d'ammonium lors des opérations minières. Le cyanure et les thiocyanates sont dégradés dans un premier temps par des micro-organismes en produits tels que le bicarbonate, l'ammoniac et le sulfure (Mekuto et al. 2016). Ces derniers sont ensuite soumis à un procédé couplé de nitrification aérobie et de dénitrification anaérobie permettant l'oxydation du nitrate en azote gazeux ou en oxyde d'azote volatil. Toutefois, puisqu'ils impliquent des micro-organismes, la nitrification et la dénitrification sont des processus lents et sensibles aux changements environnementaux, notamment à la concentration en cyanure dans le milieu (Van zyl et al. 2011). Des températures faibles peuvent également abaisser les capacités de dégradation des composés cyanurés (van Zyl et al. 2011), entraînant des teneurs élevées en nitrate dans les effluents.

Le nitrate joue un rôle important dans les écosystèmes aquatiques puisqu'il est essentiel à la croissance des organismes autotrophes. En effet, l'azote étant l'un des composants essentiels

des molécules impliquées dans les cycles biologiques des organismes vivants, il conditionne la croissance et la productivité de ces derniers (Elser et al. 2007). Notamment les organismes eucaryotes photosynthétiques assimilent préférentiellement le nitrate indispensable au fonctionnement des voies métaboliques (Chen et al. 2011). Des excès de nitrate peuvent donc entraîner des modifications importantes à la base de la chaîne alimentaire. Dans les écosystèmes aquatiques une augmentation des concentrations en nitrate, associée à des apports en phosphate, peut engendrer un phénomène d'eutrophisation (figure 2) (Smith 2003). Les organismes présentent des stratégies de développement dépendantes de l'affinité et de la vitesse d'assimilation des nutriments, adaptant leur morphologie, l'absorption étant influencée par le rapport entre la surface et le volume des organismes. En effet, les organismes aquatiques, notamment les microalgues, nécessitent des apports en carbone, azote et phosphore pour proliférer et se développer. Les besoins en ces éléments sont basés sur le ratio de Redfield ($C : N : P = 106 : 16 : 1$) (Redfield 1958). Leur croissance et la structure des communautés peuvent donc être affectées par une modification de l'abondance relative de ces éléments. Ainsi un excès de l'un des composés peut favoriser le développement de certaines espèces. Le nitrate stimule la photosynthèse des organismes et leur production de biomasse (Harpole et al. 2011). Toutefois, si l'apport en nitrate dans le cours d'eau n'est pas accompagné d'un apport proportionnel en phosphore, le développement des microalgues peut être limité par la disponibilité en phosphore. La présence de nitrate en excès fait en sorte que la disponibilité relative du carbone, de l'azote et du phosphore est altérée et la dynamique de l'écosystème peut alors être perturbée. Dans le milieu naturel, le nitrate peut également interagir avec d'autres perturbations et affecter le niveau d'activité des organismes ainsi que leur survie (Gomez Isaza et al. 2020). Une réorganisation des groupes fonctionnels de producteurs primaires peut s'observer successivement le long d'un gradient en nutriments. Des modifications dans la structure des communautés peut également induire des changements de biodiversité au sein des écosystèmes (Hooper et al. 2005).

Face aux préoccupations environnementales causées par la présence de nitrate en excès dans les écosystèmes aquatiques, il est essentiel de trouver des solutions afin de contrôler et de réduire les rejets de nitrate dans les effluents miniers. En effet, l'intensification des activités minières entraîne une hausse des rejets, parfois riches en nitrate. Or le nitrate peut contribuer à l'eutrophisation, ce qui peut mener à une modification de la dynamique des écosystèmes et à une baisse de la biodiversité.

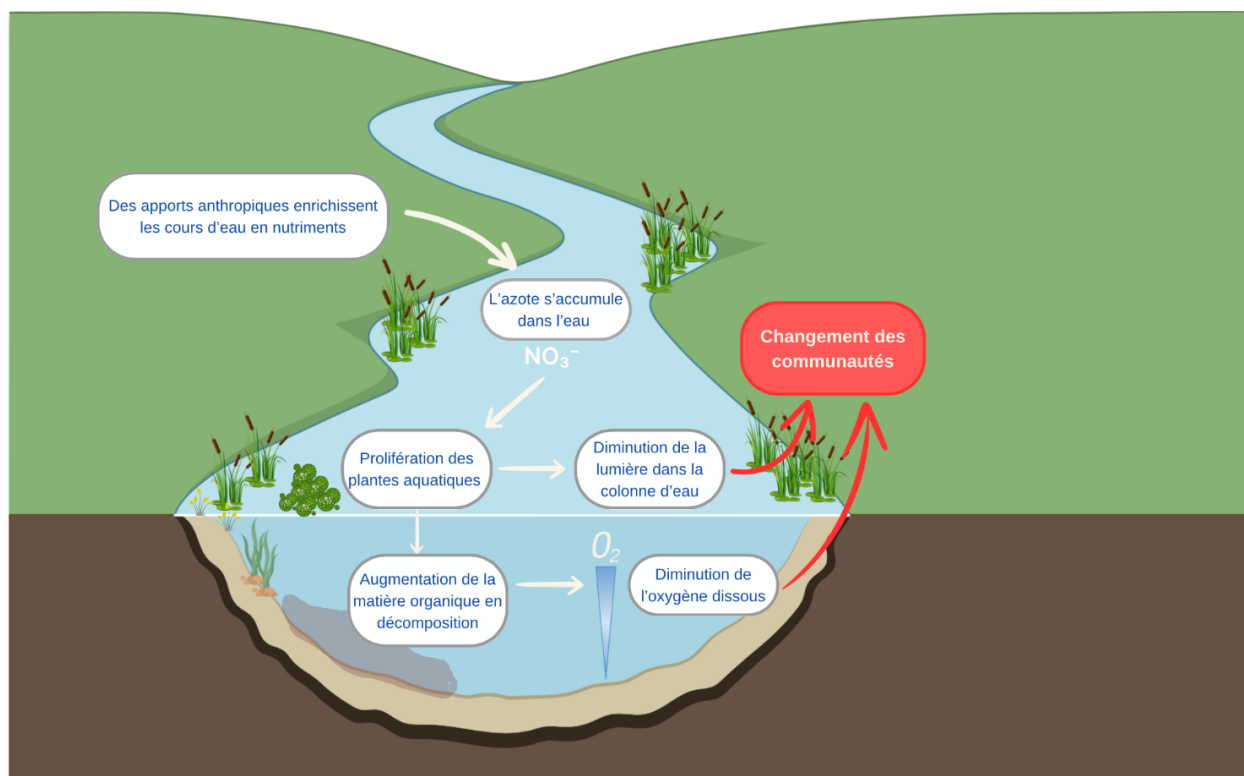


Figure 2 : Schéma représentant les impacts du processus d'eutrophisation des cours d'eau

1.4 Contexte de l'étude

Un projet pilote a été développé par le COREM, un consortium de recherche appliquée en traitement et transformation des substances minérales, afin de développer et d'optimiser des technologies innovantes permettant de réduire les concentrations de nitrate dans les effluents. Par exemple, afin de limiter la toxicité des effluents miniers, un nouveau procédé consiste en la régénération du cyanure par le recyclage et la transformation de l'azote. Ce procédé vise à récupérer entre 80 et 95 % des sous-produits réactionnels sulfures-cyanures. Ces sous-produits réactionnels sont régénérés en cyanure tandis que les métaux de base sont récupérés. Ce nouveau procédé de traitement des eaux tend à améliorer les effluents miniers en termes de substances rejetées telles que le cuivre, le nickel, le zinc mais tout particulièrement le nitrate. La mise en place d'un tel procédé au sein des mines leur permet de se conformer aux normes actuelles, mais également d'anticiper d'éventuelles régulations prochaines en demeurant compétitives dans le secteur. La gestion des effluents miniers est également l'une des clefs pour protéger les ressources en eau et préserver les écosystèmes tout en favorisant une meilleure acceptabilité sociale de ce type d'industrie.

En collaboration avec le COREM et le MELCCFP, ce projet vise à minimiser les risques environnementaux associés aux rejets dans les écosystèmes aquatiques. Ce projet présente de multiples facettes visant à répondre aux exigences réglementaires, à limiter les atteintes aux écosystèmes, mais également à soutenir les exploitations minières dans leur transition vers des pratiques durables. Toutefois, un tel procédé nécessite la mise en place d'études afin d'affirmer les bénéfices attendus sur les écosystèmes aquatiques. Des études sur du matériel biologique tel que le biofilm (périphyton), intégrant des perturbations environnementales sur de courtes périodes, sont donc importantes pour déterminer l'efficacité d'un tel procédé.

1.5 Le biofilm comme bioindicateur

1.5.1 Définition

Le biofilm est un assemblage complexe de micro-organismes. Il peut également être désigné sous les termes de périphyton ou d'épilithon si son substrat d'attache est rocheux (Battin et al. 2007). Le biofilm se compose d'organismes autotrophes tels que des algues et des cyanobactéries et d'organismes hétérotrophes tels que des bactéries, des archées, des champignons, et de la méiofaune (Battin et al. 2016). Le biofilm représente un micro-habitat retrouvé à l'interface liquide-solide sur un substrat immergé (Figure 3). Il offre des conditions environnementales particulières qui peuvent différer de celui de la colonne d'eau le submergeant. Les micro-organismes qui le composent sont isolés de la colonne d'eau par la formation d'une structure tridimensionnelle, les algues et les bactéries présentes étant notamment responsables de la production d'une matrice de glycocalyx hydraté et de matériaux mucopolysaccharides (Burkholder 1996). Ces biopolymères produits par les micro-organismes forment la matrice d'exopolysaccharides (EPS ; substances polymériques extracellulaires). Cette dernière peut parfois représenter la composante majoritaire du biofilm à hauteur d'environ 90 %, tandis que les micro-organismes représentent parfois moins de 10 % de la masse sèche du biofilm (Pinto et al. 2021). La matrice diffère dans sa composition entre les différents biofilms et en fonction des conditions physique, chimique et biologique du milieu. Elle est importante pour la survie du biofilm et joue un rôle de protection contre diverses agressions telles que le risque de dessiccation en maintenant des conditions d'hydratation élevées dans le micro-habitat, mais également de potentielles attaques par des biocides, des radiations ultraviolettes et des brouteurs. (Flemming et Wingender 2010).

La principale source de nutriments au sein du biofilm est fournie par les organismes eux-mêmes. Certains composés organiques nécessaires au métabolisme des micro-organismes du biofilm sont sécrétés et excrétés par les bactéries ou la méiofaune, ou proviennent de la décomposition des plantes et des animaux (Burkholder 1996). Ainsi, la matrice contribue également à l'enrichissement du milieu en nutriments en absorbant le phosphore, l'ammonium et des composés organiques (Flemming et al. 2007). Une partie du nitrate assimilé et stocké par le biote sous forme organique est utilisée par le métabolisme hétérotrophe stimulant la dénitrification (Mulholland et al. 2008). Les organismes phototrophes sont également une source de carbone pour certains organismes hétérotrophes bactériens (Haack et McFeters 1982).

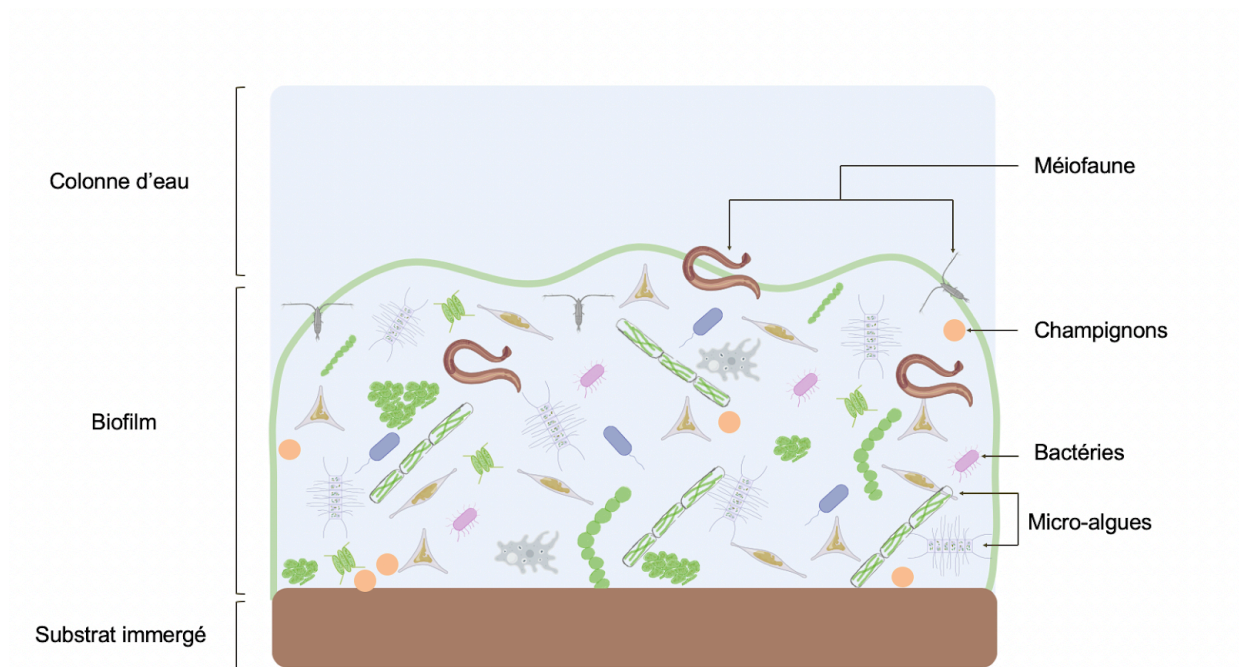


Figure 3 : Représentation schématique de la composition d'un biofilm benthique

La composition du biofilm est dépendante de nombreux facteurs abiotiques et biotiques. En effet, les nutriments jouent un rôle sur la composition, favorisant des métabolismes différents chez les organismes en fonction de la disponibilité de ces derniers (Larned 2010). La lumière est également un paramètre important : au sein des biofilms de nombreux organismes sont photoautotrophes et utilisent l'énergie lumineuse comme source d'énergie via la photosynthèse (Schnurr et al. 2016). La disponibilité de la lumière conditionne donc le développement des algues et des cyanobactéries qui composent les biofilms benthiques suffisamment exposés aux rayons

lumineux. Les bactéries et les archées sont majoritaires sous les épaisses couches de biofilm où la pénétration lumineuse est restreinte (Flemming et al. 2016). Un stress thermique peut également affecter la composition des micro-organismes du biofilm. Une exposition à de fortes températures peut engendrer une dénaturation des protéines et des acides nucléiques ainsi qu'une altération de la photosynthèse. Cependant, certains taxons sont adaptés à des températures élevées, tels que les cyanobactéries qui tolèrent des températures supérieures à 30°C (Thomas et Litchman 2016). La présence d'organismes de la méiofaune tels que les ciliés, les nématodes et les flagellés affectent la structure et la composition du biofilm par leur action de broutage (Battin et al. 2016).

Le biofilm représente un réseau riche en interactions au sein des communautés, diffusant des molécules de signalisation et métabolites au sein de la matrice et permettant l'expression de gènes qui bénéficient à l'ensemble de la communauté (Wintermute et Silver 2012). Toutefois, le biofilm est également un lieu de compétition entre microorganismes, en termes d'accès aux nutriments, à la lumière et à l'espace (Hibbing et al. 2010, Foster et Bell 2012, Rendueles et Ghigo 2015). Cette compétition peut se traduire par la production de toxines dans la matrice inhibant la croissance ou entraînant la mort des organismes adjacents (Hayes et al. 2010, Russel et al. 2014). Le biofilm est également un lieu de prédation. Certains organismes de la méiofaune broutent la matrice de biofilm, parfois de manière sélective (Dopheide et al. 2011).

Le biofilm représente un maillon important de la chaîne alimentaire. En effet, il constitue une source de nourriture pour les consommateurs primaires (Früh et al. 2011). Le biofilm occupe donc une position de « pivot » entre les producteurs primaires et les consommateurs. Les algues et les bactéries représentent notamment une ressource clé pour les protozoaires et la méiofaune. Par exemple, les copépodes consomment les bactéries, les nématodes se nourrissent d'algues et de bactéries, tandis que les oligochètes consomment principalement les diatomées (Bott 1996). Toutefois, cette consommation par la méiofaune présente un effet favorable sur le biofilm puisque la consommation d'algues, de bactéries et de protozoaires favorise la boucle microbienne au sein du biofilm en fournissant des nutriments (Arndt 1993).

1.5.2 Le biofilm : un outil de bio-suivi des milieux aquatiques

Le suivi de la qualité des cours d'eau est un enjeu majeur pour les gestionnaires de l'environnement. Toutefois les variables les plus couramment utilisés pour suivre leur état sont

des paramètres physico-chimiques. Au Québec, le suivi de la qualité de l'eau des rivières est effectué au sein du Réseau-rivières (MELCCFP, 2013) en mesurant notamment des paramètres physiques tels que la conductivité, les matières en suspension, la température et la turbidité, ainsi que des paramètres chimiques tels que le pH, les concentrations en azote ammoniacal, en azote total, en carbone organique dissous, en nitrate et nitrite et en phosphore total et dissous. Cependant, ces paramètres ne donnent un aperçu des conditions du milieu qu'à un instant précis alors que des fluctuations importantes peuvent survenir dans le temps. De plus, les variables physico-chimiques ne donnent pas d'information sur la réponse du biote face à des changements de l'environnement. Il est donc nécessaire d'avoir des outils permettant d'établir un portrait plus complet de l'état de santé des cours d'eau. Dans ce but, de nombreux outils biologiques ont été développés afin de tenir compte des conditions réelles du milieu et de leurs changements. Le biofilm présente l'avantage de pouvoir être utilisé lors d'études sur le terrain, mais également en laboratoire : il présente des temps de génération courts permettant une réponse rapide des communautés aux changements environnementaux qu'ils soient physico-chimiques ou biologiques (Tien et al. 2009, Morin 2015). La sédentarité des communautés du biofilm leur permet d'absorber les contaminants métalliques et organiques sur la durée de leur immersion (Bonnineau et al. 2020, Tien et al. 2009). D'autre part, les organismes du biofilm, du fait de leur croissance rapide, permettent de rendre compte de processus pouvant se dérouler à des niveaux supérieurs à des échelles de temps plus élevées (Tien et al. 2009). Les communautés de biofilms benthiques intégrant les changements environnementaux, il est possible de caractériser les changements au sein des écosystèmes aquatiques face à un perturbateur (Santillan et al. 2019). Le biofilm, plus précisément les diatomées benthiques qui y sont généralement très abondantes, est actuellement utilisé comme bioindicateur dans la surveillance de la qualité des cours d'eau dans de nombreux pays, notamment en France et au Canada avec l'Indice Biologique Diatomées (IBD) (Coste et al. 2009) et l'Indice Diatomées de l'Est du Canada (IDEC) (Lavoie 2006, 2014). De plus, les diatomées peuvent être utilisés comme sentinelles en examinant les changements dans la composition des communautés (Saros et al. 2023). Outre leur diversité taxonomique, l'observation de formes tératologiques, impliquant des anomalies morphologiques et de leurs frustules, constitue un outil complémentaire dans l'évaluation des effets environnementaux. Ces déformations étant souvent associées à une exposition à des contaminants (Morin et al. 2012). Ceci permet ainsi d'établir des suivis environnementaux de sites présentant une source de contamination (usine, mine, agriculture, etc.) ainsi que de repenser la réhabilitation de sites pollués.

Afin de rendre compte de la dégradation de l'habitat et des modifications du débit, d'autres outils de biosuivi sont également utilisés tels que les poissons (Karl 1981) et les macroinvertébrés benthiques (Armon et Hänninen 2015). Ces organismes intègrent la variabilité temporelle sur des périodes plus longues et la variabilité spatiale à plus grande échelle en comparaison aux diatomées ou au biofilm en général.

1.6 La place de la génomique dans l'étude des biofilms

La matrice de biofilm peut être facilement observée dans le milieu naturel, mais les organismes qui la composent nécessitent l'utilisation de matériel spécifique pour être identifiés. Les algues, certaines cyanobactéries et les organismes de la méiofaune peuvent être observés et identifiés au microscope. Toutefois il est difficile d'observer, et donc d'identifier, les bactéries et les champignons présents dans les biofilms (Stewart 2012, Dewi Puspita et al. 2012). Aussi, la microméiofaune, bien qu'elle puisse être observée en microscopie, nécessite des observations sur des organismes vivants, ce qui représente un problème logistique dans certains cas. En outre, les analyses microscopiques présentent certaines limites, telle la nécessité d'une expertise taxonomique, restreignant la capacité à identifier de façon adéquate les organismes observés. Ces analyses sont souvent longues et coûteuses, nécessitant des équipements spécialisés et des compétences spécifiques. De plus, une variabilité due aux laboratoires et aux analystes doit être pris en compte, limitant la comparabilité des études (Walch et al. 2018). D'autres techniques sont ainsi nécessaires afin de compléter les observations microscopiques (Groendhal et al. 2017) et d'identifier la structure des communautés benthiques dans son ensemble (Slapeta et al. 2005). Depuis les dernières années, les techniques de séquençage du génome se sont développées et représentent un outil privilégié dans la compréhension de l'écologie et des interactions des organismes dans des milieux complexes. En effet, les techniques de séquençage permettent de s'affranchir d'une limite rencontrée en laboratoire dans l'étude des bactéries, toutes les bactéries ne pouvant être cultivées en conditions contrôlées (Torsvik et al. 1998, Tyson et Banfield 2005).

Afin d'obtenir un aperçu de la structure complexe du réseau au sein du biofilm, le séquençage de l'ADN à haut débit est une approche pertinente (Stewart et Franklin 2008). Dans le cadre du biofilm regroupant des bactéries, des algues, des champignons ainsi que de la méiofaune, plusieurs marqueurs sont indispensables si l'étude vise l'entière des organismes de la matrice. En effet, le séquençage ciblé permet de sélectionner un gène marqueur phylogénétique en raison de sa conservation au cours de l'évolution, mais présentant de légères variations entre les

espèces afin de les différencier (Sogin et al. 1972, Woese et al. 1975). Les gènes marqueurs diffèrent ainsi parmi les organismes. Dans ce mémoire, le séquençage ciblé a été utilisé pour étudier la structure des communautés présentes au sein des biofilms à l'aide du marqueur du gène de l'ARNr 16S pour les procaryotes (Woese et al. 1985), du gène de l'ARNr 18S pour les eucaryotes (Bik et al. 2012) et de l'espaceur interne transcrit (ITS) pour les champignons (Schoch et al. 2012).

1.7 Rôle des acides gras

Le biofilm est composé d'un assemblage d'organismes vivants dont le métabolisme requiert des composés énergétiques pour fonctionner. Les principaux sont les glucides, les protéines et les lipides. Les lipides sont des éléments essentiels du vivant qui se composent d'acides gras (Gladyshev et al. 2011). Ces acides gras sont subdivisés en trois groupes en fonction du nombre d'insaturations (i.e., doubles liaisons) et de la longueur de la chaîne carbonée : les acides saturés (SFA, *saturated fatty acids*), les acides gras monoinsaturés (MUFA, *monounsaturated fatty acids*) et les acides gras polyinsaturés (PUFA, *polyunsaturated fatty acids*). Les acronymes anglais vont être utilisés dans le cadre de ce mémoire. À chaque catégorie d'acides gras correspond des fonctions différentes chez les organismes ; les SFA sont notamment utilisés dans le stockage d'énergie, tandis que les PUFA sont impliqués dans les processus de signalisation et de régulation de la fluidité membranaire (Guo et al. 2016, Gonçalves et al. 2017).

Certains acides gras spécifiques ont été identifiés comme jouant un rôle essentiel dans la chaîne trophique. En effet, les PUFA incluent des acides gras dits essentiels tels que l'acide linoléique (LIN : 18 :2 ω 6) et l'acide α -linoléique (ALA : 18 :3 ω 3). De nombreux consommateurs primaires ne possèdent pas les enzymes désaturase permettant de les synthétiser *de novo*. Un apport en quantité suffisante via l'alimentation leur est donc indispensable afin d'accomplir leurs processus physiologiques (Guo et al. 2016, Huggins et al. 2004). Des acides gras à plus longue chaîne sont également importants pour les organismes supérieurs ; les acides eicosapentaénoïque (EPA : 20 :5 ω 3) et docosahexaénoïque (DHA : 22 :6 ω 3) sont synthétisés par les microalgues et bioaccumulés par les animaux (Gonçalves et al. 2017). L'EPA et le DHA jouent un rôle physiologique primordial, en particulier sur la croissance, le développement, la reproduction et la régulation hormonale des invertébrés aquatiques (Huggins et al. 2004, Guschina et Harwood 2009, Guo et al. 2016). La présence en grande quantité de ces acides gras essentiels au sein des biofilms définit la qualité nutritionnelle de ces derniers. Or, les différents groupes de producteurs

primaires possèdent des concentrations différentes en acides gras essentiels (Adarme-Vega et al. 2012). Ainsi les diatomées présentent des concentrations élevées en EPA (Steinrücken et al. 2018), tandis que certaines microalgues notamment les dinoflagellés contiennent du DHA (Tsirigoti et al. 2020), faisant d'elles une source alimentaire de bonne qualité pour les consommateurs primaires. *A contrario*, ces PUFA ne sont pas présents chez les cyanobactéries qui représentent donc une alimentation de moindre qualité en termes de ces acides gras essentiels. Au sein de la chaîne trophique, les PUFA sont conservés. Or, ces derniers sont sensibles aux changements environnementaux. Ils représentent donc un outil de suivi des effets de perturbations sur le biote et des bioindicateurs de la santé des écosystèmes (Gonçalves et al. 2017). La composition en acides gras est dépendante de facteurs abiotiques tels que la lumière, la température, le pH, les nutriments ou encore les polluants (Guo et al. 2016, Guschina et Harwood 2006b, Filimonova et al. 2016).

1.7.1 Identification de biomarqueurs lipidiques

La notion de biomarqueur biologique utilisée dans le cadre de mes travaux de recherche est celle définie par McCarthy et Shugart (1990) et fait référence à des mesures effectuées au niveau moléculaire, biochimique ou cellulaire. Ces mesures réalisées sur des populations sauvages issues d'habitats contaminés ou sur des organismes exposés expérimentalement à des polluants, renseignent non seulement sur l'exposition de l'organisme à des produits chimiques toxiques, mais aussi sur l'ampleur de la réponse de l'organismes aux contaminants. Tout comme les bioindicateurs, les biomarqueurs présentent l'avantage de tenir compte des différentes voies d'exposition à travers le temps. Ils présentent généralement une réponse rapide à la suite d'une contamination, notamment aux niveaux moléculaire et biochimique. Ainsi des indicateurs à court terme peuvent renseigner sur les effets écologiques à long terme et permettre un suivi environnemental, prévenir la détérioration des habitats et renseigner sur la remédiation lors d'arrêt des sources de pollution (Shugart et al. 1992, McCarthy et Shugart 1990).

Plusieurs études ont pu mettre en avant certains acides gras comme indicateurs de classes phylogénétiques (Tableau 2). Ainsi, les diatomées sont marquées par un taux élevé d'EPA, d'acide palmitoléique (16:1 ω 7) et de PUFA à 16 carbones. Les algues vertes sont indiquées par les acides gras ALA et LIN. Les acides gras C15:0 et C17:0 ainsi que l'acide vaccénique (18:1 ω 7) sont considérés comme biomarqueurs des bactéries. Les champignons sont marqués par les acides gras C16:0, C18:0 et l'acide oléique (18:1 ω 9) (Gonçalves et al. 2017, Torres-Ruiz et al.

2007, Guo et al. 2016). Le transfert de ces molécules au sein de la chaîne trophique permet d'identifier les interactions trophiques et les relations entre les organismes. Des modifications dans les acides gras peuvent aussi être biomarqueur d'effet, reflétant des altérations physiologiques ou structurelles au sein des communautés exposées à des changements environnementaux (Shugart et al. 1992).

Tableau 2. Les acides gras, indicateurs de classes phylogénétiques

Classe phylogénétique	Biomarqueurs	Références
Diatomées	20:5 ω 3 (EPA) 16:1 ω 7 16: ω 4s	Guo et al. 2016 Gonçalves 2017 Torres-Ruiz et al. 2007
Algues vertes	18:2 ω 6 (LIN) 18:3 ω 3 (ALA)	Guo et al. 2016 Torres-Ruiz et al. 2007 Taipale et al. 2013
Bactéries	15:0 17:0 18:1 ω 7	Guo et al. 2016 Gonçalves 2017 Torres-Ruiz et al. 2007
Champignons	16:0 18:0 18:1 ω 9 18:2 ω 6 (LIN)	Guo et al. 2016 Torres-Ruiz et al. 2007

1.8 Projet de recherche

Dans le cadre de ce projet de recherche, les effluents miniers d'intérêt sont responsables d'une contamination en métaux des milieux récepteurs, mais également en produits azotés. L'industrie minière requiert donc un outil permettant de quantifier les effets positifs d'une diminution des

apports en nitrate. Les biofilms étant présents dans tous les milieux, leur suivi offre une approche complémentaire aux tests normés. Le nitrate représente l'un des éléments nutritifs principaux stimulant la productivité primaire, or les biofilms présentent une composante algale dominante sensible à ces composés.

Dans ce projet, la mobilisation de plusieurs descripteurs permettra d'appréhender les effets du nitrate sur un système complexe et d'extrapoler à la santé du cours d'eau au travers du réseau trophique. Des apports élevés de nitrate dans les cours d'eau peuvent favoriser un développement plus important de certains organismes modifiant ainsi la composition taxonomique du biofilm. Le cycle des nutriments, et notamment celui de l'azote, peut en être affecté, se répercutant sur le métabolisme microbien. L'approche complémentaire visant à suivre les lipides dans les biofilms permettra de mettre en évidence de potentielles atteintes de la qualité nutritive du biofilm créant ainsi un déficit en acides gras essentiels au sein du réseau trophique.

1.9 Objectifs et hypothèses de recherche

Ce projet de maîtrise vise à évaluer dans quelle mesure le nitrate issu de l'industrie minière affectent les biofilms, basé sur une approche de biosuivi "multi-descripteurs" intégrant des perturbations à plusieurs niveaux d'organisation biologique. L'objectif général consiste à caractériser la réponse des assemblages de biofilm à différents niveaux organisationnel et fonctionnel dans les milieux récepteurs des effluents miniers. Cet objectif général est composé de deux sous-objectifs qui correspondent aux chapitres du mémoire.

Les objectifs du chapitre 1 de ce mémoire visent à évaluer l'effet d'un effluent minier avant la mise en place du procédé développé par le COREM sur les variables biologiques et chimiques d'un cours d'eau récepteur, à déterminer la qualité nutritionnelle du biofilm tout en déterminant les organismes qui le composent, ainsi que de déterminer ceux qui sont indicateurs de la qualité du milieu. Afin de répondre aux objectifs de ce chapitre, les hypothèses suivantes ont été émises :

- Les processus miniers affectent la chimie de l'eau du cours d'eau en introduisant dans le milieu aquatique un excès de composés sulfures–cyanures et de métaux.
- Ces changements dans la chimie de l'eau affectent la qualité nutritionnelle du biofilm.

- Les profils en acides gras sont influencés par une restructuration des communautés en aval par rapport à l'amont de l'exutoire.
- Des espèces résistantes à la contamination sont retrouvées dans l'effluent et à l'aval.

Les données physico-chimiques récoltées aux différents sites de prélèvements ont pour objectif d'établir différentes conditions d'exposition afin de mener des expériences en mésocosmes mimant les milieux naturels échantillonnés. Les données physico-chimiques obtenues à partir des campagnes d'échantillonnage ont servi à la réalisation d'expériences permettant une approche multi-descripteurs en conditions contrôlées.

Le chapitre 2 de ce mémoire vise donc à étudier la réponse d'un même inoculum de biofilm soumis à deux gradients environnementaux distincts : un gradient complexe de nutriments, incluant des variations de plusieurs éléments tels que le calcium, le sodium, le sulfate et à un gradient spécifique de nitrate. Cette expérience vise à simuler l'effet potentiel de la mise en place du procédé de traitement permettant la réduction des sous-produits réactionnels issus des composés sulfures-cyanures, en isolant l'effet du nitrate en conditions contrôlées. Afin de répondre à cet objectif principal, plusieurs hypothèses ont été émises :

- Les variations dans la chimie de l'eau suivant un gradient de nutriments (minier) affectent la structure des communautés benthiques.
- La réponse des communautés de biofilm soumis à un gradient de nutriments est essentiellement dirigée par la concentration en nitrate dans le milieu.
- En condition de stress chimique, la restructuration des communautés entraîne une modification de la composition en acides gras au sein des biofilms, affectant ainsi la qualité nutritionnelle de ces derniers.

2. CHAPITRE 1 : L'INDUSTRIE MINIÈRE AURIFÈRE : UNE SOURCE DE STRESS ENVIRONNEMENTAL POUR LES MILIEUX RÉCEPTEURS

L'industrie minière, bien qu'assujettie à des normes environnementales, a nécessairement un effet sur les écosystèmes. Des changements dans la composition chimique des milieux récepteurs, tels que la présence de métaux, peuvent entraîner des répercussions sur le biote (Lavoie et al. 2018). La quantification et la prédiction de ces effets afin d'assurer une gestion adéquate des milieux touchés est donc fondamentale. Afin de limiter la toxicité des effluents miniers, le COREM (Consortium de recherche appliquée en traitement et transformation des substances minérales) a développé un procédé de régénération du cyanure par recyclage et transformation des sources d'azote. Ce procédé vise à récupérer entre 80 et 95 % des sous-produits réactionnels sulfures-cyanures. Ces sous-produits réactionnels sont régénérés en cyanure tandis que les métaux de base sont récupérés. Ce nouveau procédé de traitement des eaux tend à améliorer les effluents miniers en termes de substances rejetées telles que le cuivre, le nickel, le zinc, mais tout particulièrement le nitrate.

La mine LaRonde (Agnico Eagle Mines Ltd) en Abitibi - Témiscamingue testera ce nouveau système sur les eaux de procédé. Puisque la mine LaRonde respecte déjà les réglementations environnementales provinciales et fédérales, il devient difficile avec les outils actuels de démontrer l'amélioration de la qualité de son effluent grâce à ce nouveau procédé et de potentiels effets positifs sur les écosystèmes. La mesure des effets et de l'amélioration des procédés de traitement sur la qualité de l'effluent est souvent effectuée selon des paramètres physico-chimiques, donnant un aperçu de la situation à un instant précis. Or, les organismes aquatiques étant en constantes interactions physique, chimique et biologique avec leur écosystème, ils intègrent les fluctuations environnementales. Les biofilms de rivières (consortium d'algues, de procaryotes, de champignons et de microméiofaune) offrent l'avantage d'être plus faciles à prélever et répondent plus rapidement aux fluctuations dans la composition chimique de leurs milieux que les organismes supérieurs. Des études ont démontré que les biofilms représentent des indicateurs de contamination métallique robustes qui reflètent la biodisponibilité des métaux (Lavoie et al. 2012, Leguay et al. 2016, Laderrière et al. 2020). Outre les métaux, les effluents miniers peuvent parfois contenir des concentrations importantes de nitrate issus des circuits de cyanuration et de l'utilisation d'explosifs. Le nitrate étant l'un des principaux éléments nutritifs pouvant stimuler la productivité primaire, les biofilms réagissent rapidement à leur présence dans le milieu (ex. : modification de la composition taxonomique de communautés). L'industrie minière a donc besoin,

comme pour les métaux, d'un outil permettant de quantifier les effets d'une diminution des apports en nitrate dans le milieu récepteur.

L'évaluation des biofilms comme bioindicateurs repose essentiellement sur des analyses microscopiques, ainsi que des pigments photosynthétiques permettant de caractériser leur composition taxonomique et leur biomasse. Néanmoins, ces méthodes pertinentes demeurent limitées en termes de résolution et de représentativité des communautés microbiennes complexes. Le développement du metabarcoding permet une approche complémentaire avec une identification plus fine des communautés constituant les biofilms, en prenant en considération les organismes plus rares ou difficilement identifiables en microscopie. Cette méthode contribue à une vision plus détaillée de la diversité et des restructurations des communautés face aux perturbations minières. Outre l'aspect taxonomique, les biofilms présentent également un intérêt résidant dans leurs traits fonctionnels. Ces derniers mettant en évidence leur état physiologique et écologique au sein des écosystèmes. Les profils en acides gras représentent l'un de ces traits en constituant un indicateur de la qualité nutritionnelle du biofilm pour les consommateurs primaires et de l'adaptation des communautés face aux changements dans l'environnement. En effet, des variations dans la composition en acides gras d'un biofilm exposé à des effluents miniers pourraient indiquer une altération de la productivité de ce consortium de micro-organismes. Ainsi, combiner le metabarcoding et des analyses en acides gras pourraient permettre une évaluation plus approfondie et sensible des effets des effluents sur le biofilm et représenter un outil robuste dans l'évaluation de l'efficacité des procédés de traitements des eaux et de leur influence sur les milieux récepteurs.

Dans ce chapitre, la composition taxonomique de biofilms naturels récoltés sur le terrain, ainsi qu'un suivi de la qualité de l'eau basé sur l'IDEC, sont utilisés afin de renseigner sur les effets de l'effluent minier sur la structure des communautés de biofilms. Les profils en acides gras des biofilms récoltés ont également été déterminés afin de suivre les potentiels effets des effluents sur la qualité nutritionnelle de cette ressource à la base des chaînes trophiques aquatiques et terrestres.

2.1 Méthodologie

2.1.1 Échantillonnage de terrain

Au cours de l'été 2022, des campagnes d'échantillonnage ont été menées dans la région de l'Abitibi-Témiscamingue au Québec afin de procéder à des prélèvements visant à analyser les effets du nitrate provenant du complexe minier LaRonde détenu par Agnico Eagle. À cet effet, deux campagnes ont été menées les 6 et 28 juillet 2022, en veillant à éviter l'échantillonnage les jours suivant de fortes précipitations, afin de prélever des substrats représentatifs du lit mineur du cours d'eau. L'ensemble des sites a été échantillonné à chaque visite, permettant d'obtenir deux jeux de données. Dans le but d'étudier l'effet de l'effluent minier sur le cours d'eau avoisinant, trois sites d'échantillonnage ont été sélectionnés (figure 4). Des prélèvements ont été effectués sur la rivière Blake afin de définir le profil du cours d'eau avant les activités minières, ce site est répertorié ultérieurement sous la dénomination de site "Amont" (GPS : 48.230841, -78.406615). Le site amont correspond à une lisière de forêt avoisinant la route nationale 117 et l'eau de la rivière présente une couleur marron-orangée. Cette coloration peut être liée à la présence de matière organique dissoute, notamment d'origine humique. L'effluent minier a également été échantillonné afin d'étudier sa composition et les communautés adaptées à ces conditions (GPS : 48.25235, -78.43407). Ce site, situé dans une prairie ouverte, a été nommé "Effluent", l'eau s'écoule dans le ruisseau Dormenan. Des échantillons d'un troisième site en milieu forestier correspondant à la confluence entre le ruisseau Dormenan, dans lequel l'effluent est déversé, et la rivière Blake ont été récoltés afin d'observer les effets liés aux activités minières sur le cours d'eau principal. Ce site est dénommé "Aval" (GPS : 48.245223, -78.382328) et le cours d'eau présente une coloration brune. La concentration en carbone organique dissous demeure similaire entre les sites amont et aval ; la coloration de l'eau peut donc s'expliquer par une combinaison de la turbidité (particules en suspension et de la chimie de l'eau influencée par l'effluent minier) (figure 5).



★ effluent ★ aval ★ amont

Figure 4 : Localisation des sites d'échantillonnage





Figure 5 : Photographies des sites d'échantillonnage (A : Amont, B : Effluent, C : Aval)

Afin d'établir les conditions physiques et chimiques à chaque site, le pH et la conductivité ont été mesurés sur le terrain à l'aide d'un pH-mètre et d'un conductimètre, et des échantillons d'eau ont été prélevés en trois réplifications afin de procéder ultérieurement à différentes analyses au sein du laboratoire général de l'INRS. Les échantillons à destination des analyses des métaux, des anions majeurs et de l'ammonium ont été filtrés sur le terrain à l'aide de filtres de 0,22 μm et conservés dans des tubes de 15 mL et de 50 mL pour le phosphore total non filtré. Certains tubes ont préalablement été acidifiés selon le type d'analyses à effectuer. Afin de conserver les échantillons d'eau au frais, ces derniers ont été placés dans une glacière. L'analyse des anions majeurs a été faite par chromatographie ionique sur colonne en résine échangeuse d'ion, Ion PAC AS11-HC – 4 μm , à l'aide de l'appareil Thermo Integrion HPIC. L'analyse des cations majeurs a été effectuée sur échantillons acidifiés avec de l'acide nitrique (HNO_3 0,2 %) par ICP-AES Agilent 5110 Dual View selon la méthode 200.7 de l'agence américaine de protection environnementale (US EPA). Les échantillons acidifiés avec de l'acide sulfurique (H_2SO_4 0,1 %) ont permis le dosage du phosphore total par la méthode colorimétrique à l'acide ascorbique selon la méthode standard 4500-PE. L'analyse des NO_x (NO_2 et NO_3) a été réalisée par la méthode colorimétrique à la sulfanilamide pour les NO_2 et après réduction au cadmium pour les NO_3 , conformément à la méthode standard 4500- NO_3 E. L'ammonium a également été analysé. Ces analyses ont été réalisées à l'aide d'un auto-analyseur Lachat. Le carbone organique dissous a été analysé selon une méthode de combustion catalytique à haute température et détection infrarouge avec un appareil Shimadzu VCPH d'après la méthode standard 5310B.

En parallèle des échantillons d'eau, des prélèvements de biofilms ont été réalisés sur les trois sites. Le biofilm a été prélevé sur tous les sites à partir de substrats naturels. Pour les sites amont

et effluent, le type de substrat était des pierres et cailloux dont la taille ne permettait pas leur déplacement dans le cours d'eau. Le site aval se caractérisait par sa profondeur et la présence de ponceaux sans fond, c'est-à-dire dépourvus de substrat artificiel à leur base, permettant ainsi à l'eau de s'écouler directement sur le lit naturel du cours d'eau. Le biofilm a donc été prélevé sur les blocs rocheux entourant ces ponceaux. Les prélèvements ont été effectués à la même date afin d'avoir des échantillons comparables face aux facteurs écologiques. Le biofilm a été récolté à l'aide de brosses à dents et de grattoirs distincts pour chaque site afin d'éviter toute contamination croisée. Pour chaque station d'échantillonnage, trois répliques ont été réalisées. Chaque réplique consistait en un échantillon composite obtenu en combinant plusieurs prélèvements effectués sur différents substrats du site. Afin de préserver l'intégrité du biofilm et limiter les processus de dégradation, les échantillons ont été conservés dans de la glace sèche jusqu'à ce qu'ils soient placés à -80°C au laboratoire en prévision des analyses de communautés par séquençage, des profils en acides gras, et de l'énumération (comptage et identification) des diatomées par microscopie optique.

2.1.2 Analyses sur le biofilm benthique

2.1.2.1 Identification des assemblages de diatomées et des formes tératologiques

Pour chaque échantillon de biofilm prélevé lors de la deuxième campagne d'échantillonnage, l'identification des assemblages de diatomées a été faite à partir de matériel conservé à -80°C . Une étape de digestion a été effectuée afin d'éliminer la matière organique. À cette fin, environ 5 mL de biofilm ont été transférés dans un tube de 50 mL où ont été ajoutés 5 mL d'acide nitrique (HNO_3) de grade ACS. Les tubes acidifiés ont été conservés sous hotte chimique pendant 15 h, s'en est suivi un ajout de 1 mL de peroxyde d'hydrogène 30 % (H_2O_2) de grade ACS avant incubation des tubes à 60°C pendant 1 h. L'acide a ensuite été éliminé par rinçage. De l'eau a été ajoutée dans les tubes afin d'atteindre 50 mL puis ces derniers ont été centrifugés à 5500 rpm pendant 10 min. Le surnageant a été éliminé avec les rejets acides, l'opération a été répétée jusqu'à l'obtention d'un pH aux alentours de 6 ou plus.

Afin de procéder à l'observation microscopique, des lames permanentes ont été montées avec la solution contenant les frustules de diatomées vidées du contenu cellulaire. Les lamelles ont été associées aux lames de façon permanente avec du Naphrax comme résine de montage. L'énumération et l'identification taxonomique des diatomées ont été effectuées sous un

microscope optique à un grossissement de 1000X. Un minimum de 400 valves de diatomées a été analysées pour chaque échantillon. Les valeurs de l'IDEC ont ensuite été calculées à partir de l'assemblage de diatomées en utilisant une macro Excel pour l'IDEC version 3.0 (Lavoie et al, 2014). La présence de valves de diatomées déformées (tératologies) a également été relevée.

2.1.2.2 Caractérisation de la structure des communautés bactériennes et algales

L'extraction de l'ADN a été effectuée selon le même protocole pour tous les échantillons de terrain et d'expériences menées, et traités à l'INRS. Le kit employé pour l'extraction était le ZymoBIOMICSTM DNA/RNA Miniprep Kit. La méthode d'extraction repose sur les instructions fournies par le manufacturier, dont les étapes principales sont résumées dans les paragraphes suivants.

Les échantillons de biofilm ont été conservés à -80°C en vue des analyses, ainsi afin de procéder à l'extraction ils ont été placés à 4°C entre 10 et 12 h. Une masse de biofilm inférieure ou égale à 250 mg a été pesée et placée dans des tubes contenant une matrice permettant la lyse de l'échantillon biologique par l'action de microbilles par agitation. Un volume de 750 µL de *DNA/RNA shield*, un produit permettant de conserver les échantillons à température ambiante en préservant l'intégrité génétique (en inactivant les bactéries et champignons infectieux) a été ajouté dans les tubes avant de procéder à une homogénéisation mécanique par vortex agitateur à microbilles. Afin de récupérer l'ADN, les échantillons ont été centrifugés à 16 000 x g pendant 30 secondes. L'ADN a ainsi été transféré dans la phase supérieure des tubes, le surnageant a été prélevé dans un tube où deux volumes de tampon de lyse de l'ADN ont été ajoutés, les échantillons ont ensuite été homogénéisés.

Afin de procéder à la purification de l'ADN, les échantillons ont été placés dans une colonne Spin-AwayTM (fournie dans le kit), elle-même placée dans un tube collecteur permettant la récupération du matériel non retenu par le filtre. Suite à un ajout de 400 µL de tampon (24 mL de tampon de lavage ADN + 104 mL d'éthanol 95 %) à travers la colonne Spin-AwayTM retenant l'ADN, un lavage avec du tampon de lavage, par l'ajout de 700 µL puis 400 µL de ce tampon, puis les tubes ont ensuite été centrifugés. L'élution de l'ADN a été effectuée après addition de 100 µL d'eau ZymoBIOMICSTM exempte de Dnase, suivie d'une incubation pendant 5 min en centrifugeant. Afin de purifier l'ADN, celui-ci doit être placé dans des colonnes zymo-SpinTM III-HRC. Ces dernières nécessitent une étape de préparation avec l'ajout de 600 µL de solution de

préparation ZymoBIOMICSTM HRC dans chaque colonne, elle-même placée dans un tube collecteur qui fut ensuite centrifugé à 8 000 x g pendant 3 min. L'ADN purifié a été obtenu après transfert dans les colonnes préparées et centrifugées à 16 000 x g pendant 3 min. Les concentrations en ADN dans les différents échantillons ont été contrôlées à l'aide d'un Qubit.

Les extraits obtenus ont ensuite été envoyés pour séquençage au centre de génomique McGill (Montréal). Les bibliothèques désirées ont été obtenues selon l'approche Illumina et séquencées sur un séquenceur MiSeq. Les bactéries et les archées ont été étudiées par séquençage apparié des régions V4-V5 du gène ARNr 16S à l'aide des amorces 515FB (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') et 926R (5'-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3'). La région variable V4 de l'ARNr 18S a été utilisée pour les eucaryotes grâce aux amorces E572F (5'-CYGCGGTAATTCCAGCTC-3') et E1009R (5'-AYGGTATCTRATCRTCCTTYG-3').

2.1.2.3 Analyse des acides gras

La méthode d'analyse des acides gras totaux (AG) permet d'obtenir un profil complet des acides gras présents dans les échantillons, sans distinction entre les différents types de lipides. Cette approche repose sur la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), qui permet d'identifier et de quantifier l'ensemble des acides gras, qu'ils proviennent des membranes cellulaires ou d'autres composants biologiques. En analysant les acides gras totaux, cette méthode permet de caractériser les groupes métaboliques et phylogénétiques dans les communautés microbiennes, et d'évaluer l'impact des perturbations environnementales sur la structure de ces communautés. Les acides gras totaux ont été extraits et transformés en méthyl esters d'acides gras (FAMES) à travers une étape de dérivation préalable à la GC-MS, ce qui réduit leur polarité et facilite leur analyse.

Dans un premier temps, les tubes ont été centrifugés afin de retirer l'excès d'eau et procéder dans un second temps à la lyophilisation des échantillons. La lyophilisation a été faite avec un *FTS Systems Dura-Top* modèle BTD à partir des échantillons conservés à -80°C. Les échantillons lyophilisés sont ensuite restockés au -80°C en attendant l'extraction des acides gras. Afin de procéder aux étapes d'extraction des acides gras, le biofilm lyophilisé a été pesé et 40 mg de poids sec ont été placés dans des tubes en verre. Pour chaque tube, 20 mL d'une solution de méthylation contenant du méthanol (grade HPLC), du toluène (grade HPLC) et de l'acétyle chloride (grade HPLC) ont été ajoutés selon un rapport 4000 : 1000 : 125. 10 µL d'un standard

interne (acide tricosanoïque, 23:0) ont été ajoutés comme contrôle. Afin d'homogénéiser les échantillons et de lyser les cellules algales présentes, chaque tube a été passé pendant 2 min au sonicateur. Les échantillons ont ensuite été transvasés dans des tubes à vis en verre afin de procéder à une étape d'incubation à 90°C pendant 20 min. Les tubes ont ensuite été placés au réfrigérateur pendant 20 min à la suite desquelles l'extraction a été effectuée. À cette fin, 2 mL d'hexane (grade HPLC) et 2 mL d'eau ultra pure ont été ajoutés avant de vortexer pour homogénéiser le mélange. Les acides gras ont été déplacés dans la phase supérieure grâce à une étape de centrifugation à 4°C pendant 10 min à 3000 x g. La phase supérieure, constituée par l'hexane et les acides gras, a été prélevée (2 mL) à la pipette pasteur puis transférée dans un flacon afin d'être analysée par chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse (GC Thermo Scientific Trace 1310 couplé à un détecteur quadripolaire simple Thermo Scientific ISQ, colonne Agilent J&W DB-FastFAME (30 m de long, 0,250 mm de diamètre intérieur, 0,25 µm d'épaisseur)).

2.1.2.4 Analyses statistiques

Les données de séquençage ont été générées à l'aide de la plateforme Illumina MiSeq en mode paired-end, ciblant les régions V4-V5 du gène ARNr 16S pour les bactéries et archées (amorces 515FB et 926R) et la région V4 du gène ARNr 18S pour les eucaryotes (amorces E572F et E1009R). Le traitement bioinformatique a été effectué en utilisant le pipeline DADA2 dans R. Les séquences brutes ont d'abord été filtrées et tronquées afin d'éliminer les séquences de faible qualité. Une étape d'apprentissage des profils d'erreur a permis d'inférer des variantes de séquences exactes (ASV) sans recours au clustering traditionnel. Les lectures appariées ont ensuite été fusionnées, puis une table d'ASV a été construite. Les séquences chimériques ont été détectées et retirées à l'aide d'une méthode consensus. L'assignation taxonomique a été réalisée à l'aide de bases de données de référence spécifiques à chaque marqueur : SILVA v138.1 pour les séquences 16S et PR2 v5.0.0 pour les séquences 18S. Les données ont été intégrées dans des objets de type phyloseq pour l'exploration de la structure des communautés microbiennes.

La visualisation des données et les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide de R version 4.2.2 en utilisant les packages ggplot2 version 3.5.1 et ggpubr version 0.6.0. Les comparaisons entre les conditions (Amont, Aval et Effluent) pour l'analyse des paramètres physico-chimiques ont été testées à l'aide du test de Kruskal-Wallis et du test post – hoc de Dunn par paire avec correction de Holm – Bonferroni à l'aide du package rstatix version 0.7.2. Une analyse en composante principale a été effectuée sur les données environnementales afin de visualiser leur

l'influence sur les différents sites. Une analyse PERMANOVA a été également menée pour observer une possible différence significative entre les sites et entre les deux dates d'échantillonnage. Une RDA a été utilisée pour mettre en évidence les principales variables responsables des différences significatives. Un diagramme de Venn a été effectué sur les données de diatomées. Les données de séquençage ont été analysées sur R grâce à la diversité alpha Chao1. La distance de Bray–Curtis a été utilisée pour mener une analyse en composante principales non - métrique (NMDS) avec le package vegan, version 2.6.4. Les différences de composition des communautés ont été établies en utilisant une PERMANOVA, ainsi que la fonction adonis2 du package vegan. Les diagrammes en barres taxonomiques ont été visualisés à l'aide du package fantaxtic version 0.2.0, à partir des données transformées en abondance relative. Une analyse de similarité (SIMPER) a été effectuée sur les abondances relatives des genres retrouvés dans les différents sites à l'aide du package vegan version 2.6.4.

2.2 Résultats

2.2.1 Paramètres physico-chimiques des sites d'échantillonnage

Afin de traiter les données physico-chimiques des trois sites d'échantillonnage, les données relatives aux métaux traces (arsenic, bore, cobalt, cuivre, molybdène, plomb, sélénium et titane) ont été retirées du jeu de données puisque les concentrations étaient sous la limite de détection. Le jeu de données a également été affiné selon la colinéarité des variables environnementales permettant ainsi d'éliminer les covariances et de réduire le nombre de variables environnementales à celles présentées dans le tableau 3. Les concentrations sont exprimées comme la moyenne des concentrations \pm écart-type en mg/L, pour les deux campagnes d'échantillonnage. Une différence significative entre l'amont et l'effluent pour tous les paramètres excepté le zinc a été observé. En effet, certains éléments analysés présentent une augmentation d'un facteur 40 comme le manganèse et d'un facteur 100 tels que le sodium et le calcium. Les augmentations les plus importantes concernent le nitrate et le sulfate, des facteurs de 500 et de 1000 respectivement, et sont observées entre les concentrations relevées à l'amont et à l'effluent. Les mesures effectuées en aval ne présentent toutefois pas de différence significative avec celles de l'amont. Toutefois, ce site présente des différences significatives avec l'effluent en termes de carbone organique dissous (COD) et de pH. Des tests ont également été menés entre les stations pour chaque date (Annexe 1 : tableau 10). Des différences significatives entre les même sites (p

< 0,05) ont été relevées. Les écarts-types importants observés à la station aval montre une grande variabilité temporelle à ce site.

Tableau 3 : Variations des paramètres physico-chimiques le long du gradient d'exposition aux effluents miniers

	Amont	Aval	Effluent
NO₃ (mg/L)	0.60 ± 0.09 *** / ns	22 ± 18 ns / ns	312 ± 25 *** / ns
Al (mg/L)	0.42 ± 0.06 *** / ns	0.31 ± 0.01 ns / ns	0.06 ± 0.01 *** / ns
COD (mg/L)	24.4 ± 4.7 ** / ns	21.6 ± 3.6 ns / *	4.12 ± 0.31 ** / *
Fe (mg/L)	0.92 ± 0.09 *** / ns	0.80 ± 0.01 ns / ns	0.01 *** / ns
Si (mg/L)	3.52 ± 0.40 *** / ns	3.10 ± 0.11 ns / ns	0.19 ± 0.23 *** / ns
Zn (mg/L)	0.07 ± 0.01 ns / ns	0.06 ± 0.03 ns / ns	0.04 ± 0.03 ns/ns
SO₄ (mg/L)	2.62 ± 0.64 *** / ns	199 ± 160 ns / ns	2539 ± 30 *** / ns
Na (mg/L)	4.6 ± 1.1 *** / ns	45 ± 33 ns / ns	516 ± 42 *** / ns
Ca (mg/L)	5.50 ± 0.25 *** / ns	55 ± 37 ns / ns	641 ± 20 *** / ns
Ba (mg/L)	0.01 *** / ns	0.02 ns / ns	0.03 *** / ns
Sr (mg/L)	0.03 *** / ns	0.15 ± 0.09 ns / ns	1.49 ± 0.05 *** / ns
Mn (mg/L)	0.03 ± 0.01 *** / ns	0.06 ± 0.01 ns / ns	1.20 ± 0.14 *** / ns
pH	6.43 ± 0.21 ** / ns	6.52 ± 0.04 ns / **	7.68 ± 0.06 ** / **

Concentrations moyennes (± écart-type) des paramètres physico-chimiques mesurés aux sites d'échantillonnage (Amont, Aval et Effluent) avec les niveaux de significativité statistique (p-values) indiqués pour les comparaisons entre sites. Les niveaux de significativité sont indiqués par ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05 et ns pour non significatif. La couleur des astérisques indique les comparaisons spécifiques : rouge pour Amont vs Effluent, bleu pour Amont vs Aval et noir pour Aval vs Effluent.

Une visualisation des données de physico-chimie a été effectuée à l'aide d'une analyse en composante principale (ACP). Les deux dates d'échantillonnage ont été considérées afin d'intégrer une dimension spatiale et temporelle à l'étude. L'analyse effectuée sur les variables environnementales a révélé une différenciation entre les sites amont, aval et effluent. Un effet du facteur site est observé et expliqué à 88,6 % selon l'axe 1 (figure 6). Les trois sites d'échantillonnage se différencient ainsi selon un gradient physico-chimique, les sites amont et effluent étant les plus différenciés. Le site aval représente un intermédiaire entre l'amont et l'effluent. L'effluent est caractérisé par des métaux alcalino-terreux tels que le barium, le strontium et le calcium, ainsi que le manganèse (métal de transition) et le sodium (métal alcalin) comme le démontre les concentrations retrouvées dans le tableau 3. Les sites amont et aval sont marqués par les teneurs plus élevées en aluminium, fer, silicium, et zinc, ainsi que par la présence de carbone organique dissous en plus fortes concentrations. Une variation temporelle est également observée puisque les paramètres physico-chimiques varient entre les deux campagnes

d'échantillonnage, notamment pour le zinc et le silicium. Une PERMANOVA a permis d'établir des différences significatives entre les sites d'échantillonnage, mais également en fonction de la date de prélèvement (p -value < 0,01).

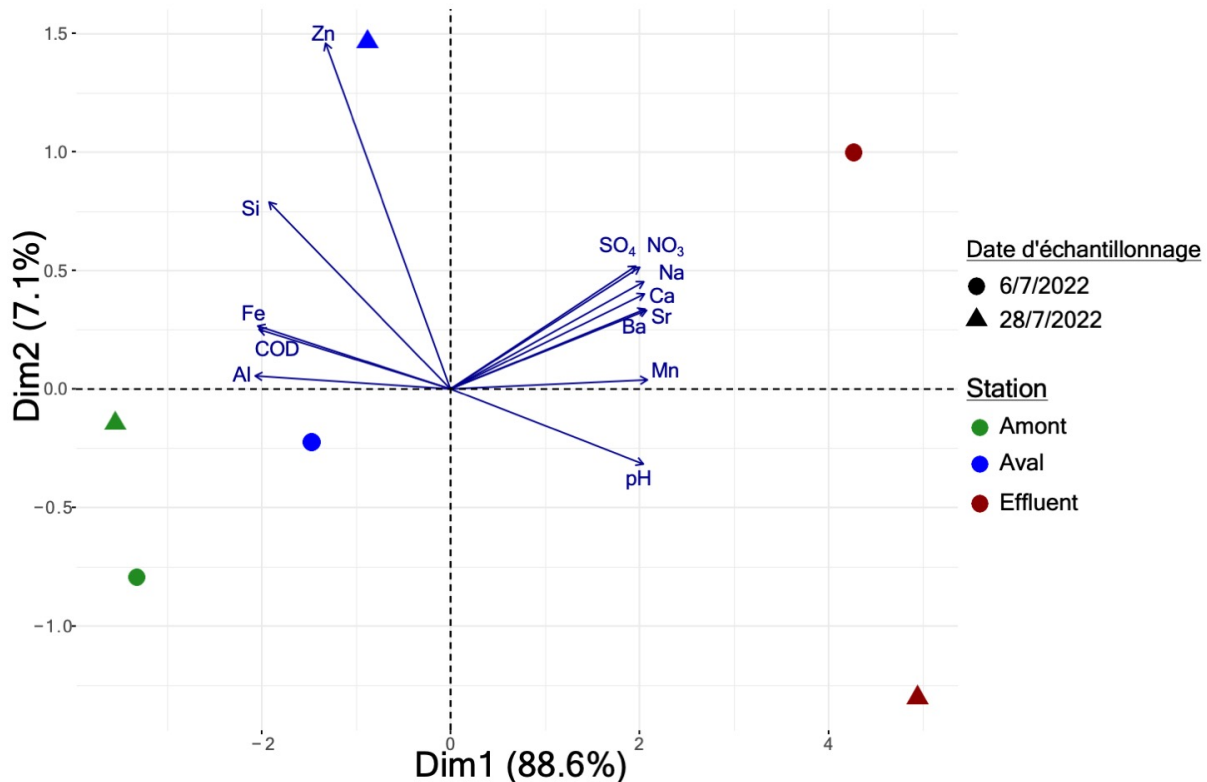


Figure 6 : Analyse en Composantes Principales. Projection des variables environnementales sur l'axe 1 et 2 de l'ACP qui a permis d'expliquer 95,7 % de la variance spatiale et temporelle.

2.2.2 Analyse de la qualité nutritionnelle du biofilm

Les trois sites d'échantillonnage présentent une répartition différente des principales classes d'acides gras PUFA, MUFA et SFA (Figure 7). L'aire de chaque rectangle observé dans la figure 7 est proportionnelle à l'abondance des différents acides gras (en %). À l'amont, les PUFA dominent avec une proportion de 61,5 %, suivis des SFA (27,9 %) et des MUFA (10,6 %). À l'effluent, les MUFA sont la classe majoritaire (58,9 %), tandis que les PUFA et les SFA représentent respectivement 17,2 % et 23,8 % de la fraction totale des acides gras. Le site aval présente un profil distinct, caractérisé par une quasi-absence de PUFA (0,4 %), alors que les SFA et les MUFA constituent respectivement 52,4 % et 47,2 % des acides gras. La très faible proportion de PUFA au site aval constitue une observation atypique au regard des études sur les

biofilms aquatiques. Cette valeur pourrait être attribuée à des conditions environnementales défavorables aux producteurs primaires synthétisant ces acides gras. Toutefois, un artefact méthodologique, lié à des pertes au cours de l'extraction ou de l'analyse chromatographique, ne peut être exclu.

L'analyse statistique révèle des différences significatives entre les stations amont et aval pour les PUFA ($p < 0,001$), traduisant une modification marquée du profil lipidique entre ces sites. En revanche, aucune différence significative n'a été relevée entre l'amont et l'effluent ni entre l'effluent et l'aval pour cette classe d'acides gras. Concernant les MUFA, des différences significatives sont observées entre l'amont et l'aval ($p = 0,016$) ainsi qu'entre l'amont et l'effluent ($p = 0,001$), tandis qu'aucune différence n'est relevée entre l'effluent et l'aval. Pour les SFA, une différence significative a été identifiée entre l'effluent et l'aval ($p < 0,001$), alors qu'aucune différence n'a été relevée entre l'amont et l'aval, ni entre l'amont et l'effluent.

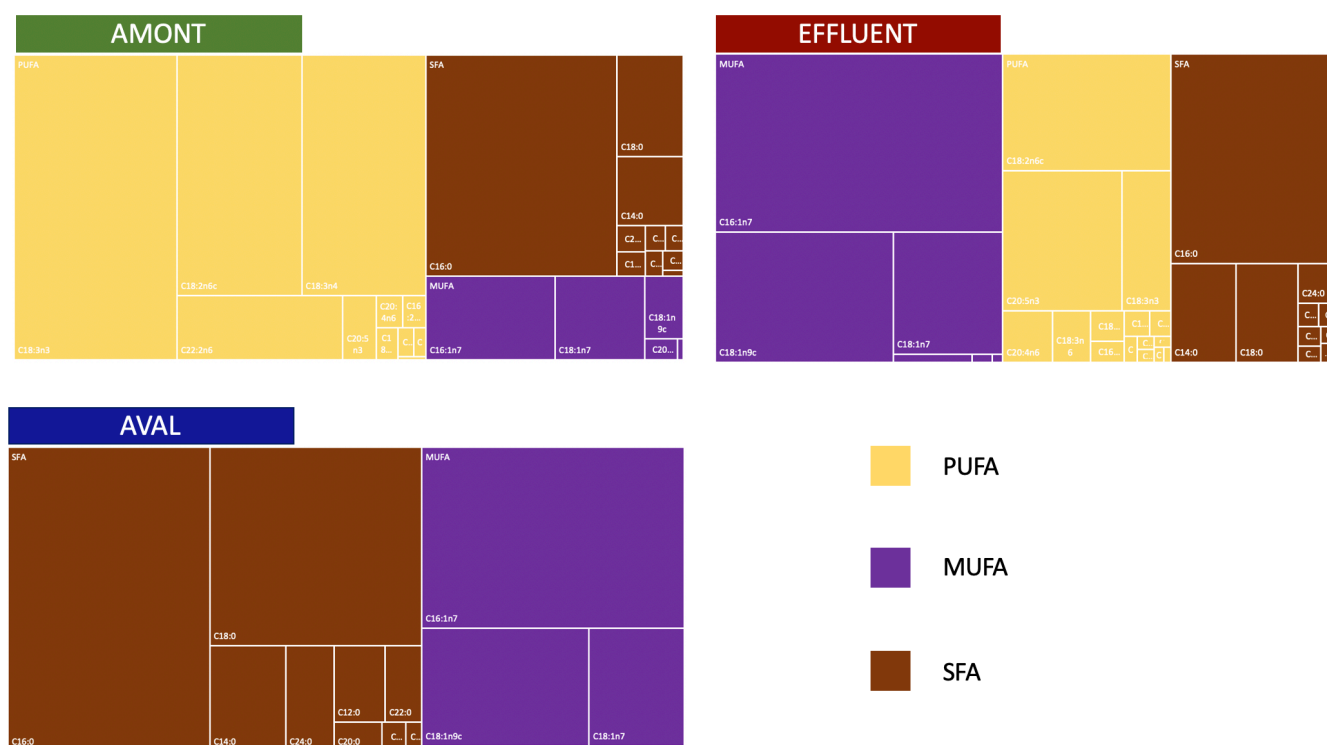


Figure 7 : Répartition des principales classes d'acides gras au sein des 3 sites d'échantillonnage

2.2.3 Analyse de la composante eucaryote du biofilm

2.2.3.1 Observations au microscope des diatomées

Lors de la deuxième campagne d'échantillonnage, le 28 juillet 2022, un total de 16 espèces de diatomées a été observé dans l'échantillon de biofilm récolté à la station située en amont de la mine. Toutefois, l'assemblage était dominé à 75 % par *Fragilaria capucina* var. *gracilis* (FCAPF5 dans l'IDEC). La valeur de l'IDEC à cette station était de 77 (classe A) indiquant une excellente qualité de l'eau. L'échantillon récolté en aval présentait un assemblage de diatomées plus diversifié avec 40 espèces, certaines typiques de milieux pollués et d'autres indicatrices de milieux modérément altérés. L'espèce la plus abondante, *Diatoma tenuis*, composait 15 % de l'assemblage. D'autres espèces comme *Navicula veneta*, *Achnanthyidium minutissimum sensu lato* et *Nitzschia palea* var. *debilis* étaient également abondantes, mais représentaient chacune moins de 15 % de l'assemblage. La valeur de l'IDEC à cette station était de 41 (classe C), suggérant un environnement perturbé. Il est aussi intéressant de mentionner que 2 % des valves de diatomées observées à cette station présentaient des anomalies au niveau de la forme (tératologies). Finalement, le biofilm récolté dans l'effluent était dominé à 97 % par *Achnanthyidium minutissimum sensu lato*, bien qu'au total cinq espèces aient pu être observées. Une valeur d'IDEC de 70 a été obtenue pour l'effluent (classe B). À cette station les formes tératologiques ne dépassaient pas les 1 % (figure 8A). Une analyse plus détaillée des déformations dans l'effluent a révélé que la grande majorité des aberrations étaient observées sur les individus de *Fragilaria capucina* var. *gracilis* (Figures 8B, 8C). En effet, en considérant uniquement cette espèce, 57 valves étaient normales, 22 présentaient une déformation légère de la forme et 22 étaient sévèrement déformées. Le pourcentage de tératologies sur cette espèce est donc autour de 44 % dans l'effluent.



Figure 8 : Formes normale (gauche) et tératologiques (droite) d'*Achnantheidium minutissimum* (A), forme normale de *Fragilaria capucina* var. *gracilis* (B), formes tératologiques de *F. capucina* var. *gracilis* (C)

L'analyse des communautés de diatomées révèle des espèces spécifiques aux sites amont et aval (figure 9). Le site amont abrite quatre espèces associées uniquement à ce site : *Fragilaria capucina* forme 7 (FCAPF7), *Eolimna* spp. (EOLI), *Ulnaria ulna* (UULN) et *Diatoma vulgare* (DVUL). *A contrario*, le site aval présente une plus grande diversité, avec 27 espèces exclusives à cet écosystème. Les sites amont et aval partagent également neuf espèces. Le site effluent, quant à lui, montre la plus faible diversité. Aucune espèce n'est spécifique à cet écosystème, qui partage uniquement deux espèces avec le site aval : *Surirella brebissonii* (SBRE) et *Navicula veneta* (NVEN). Enfin, trois espèces sont présentes aux trois sites étudiés : *Fragilaria capucina* var. *gracilis* (FCAPF5), *Achnantheidium minutissimum* (ADMI) et *Gomphonema parvulum* (GPAR). Aucune espèce n'est partagée uniquement entre les sites amont et effluent.

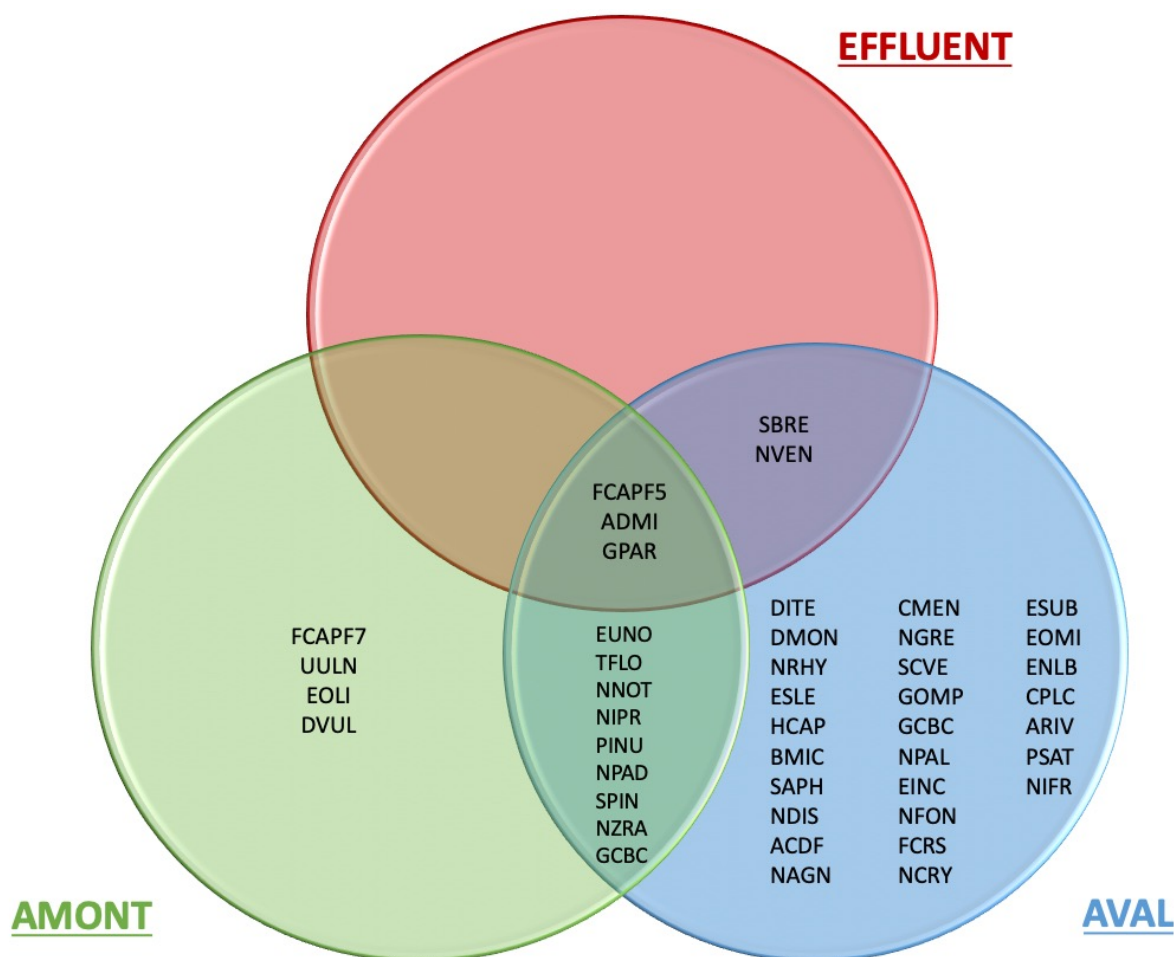


Figure 9 : Répartition des diatomées entre les trois sites d'échantillonnage. Diagramme de Venn illustrant la distribution des diatomées identifiées aux trois sites d'échantillonnage. Chaque code représente une espèce de diatomée, dont le nom complet est disponible en Annexe 1-tableau 11. Les zones de chevauchement indiquent les espèces partagées entre les sites, tandis que les sections distinctes montrent les espèces exclusives à un site donné.

2.2.3.2 Analyses taxonomiques des communautés eucaryotes par metabarcoding

La mesure de la diversité alpha avec l'indice Chao1 a révélé une richesse spécifique significativement plus élevée à la station aval par rapport aux deux autres stations (Kruskal-Wallis, $p < 0,01$) (figure 10A). Un gradient de différenciation des communautés eucaryotes est observé selon un gradient amont–effluent de la mine (figure 10B). Le site a été identifié comme un facteur affectant significativement les communautés eucaryotes benthiques ($p = 0,01$) en expliquant 50 % de la variance de la communauté. La date d'échantillonnage contribue plus faiblement mais significativement ($p = 0,014$) à la variation observée (7,0 %). L'interaction date–station est significative ($R^2 = 0,15$, $p = 0,005$) suggérant ainsi que l'effet du temps est dépendant du site.

Le phylum archaeplastida domine la communauté eucaryote au site amont lors de la première campagne d'échantillonnage (6 juillet 2022), avec une abondance relative élevée du genre *Microspora* (algue verte). Les phyla des alveolata incluant des ciliés et dinoflagellés, des stramenopiles comprenant des diatomées et oomycètes, et des opisthokonta qui englobe des champignons et métazoaires étaient également présents dans la communauté. Lors de la seconde campagne (28 juillet 2022), un profil similaire a été observé, bien que les abondances relatives variaient : les stramenopiles et opisthokonta ont montré un développement accru et *Microspora* est demeuré le genre dominant (Figure 10C).

Au site aval, la communauté du 6 juillet 2022 était dominée par les phyla opisthokonta, stramenopiles et alveolata. Les genres *Chaetonotida* et *Haplotaxida* correspondant respectivement à des gastrotriches et à un ordre d'annélides oligochètes représentaient les opisthokonta les plus abondants à cette station. Le 28 juillet 2022, les mêmes phyla sont restés prédominants. Cependant, une augmentation des alveolata, notamment le genre *Hymenostomatia*, s'est fait au détriment des opisthokonta. Le site aval se distingue des autres stations par la présence des genres *Chaetonotida* et *Haplotaxida* présent uniquement dans cet écosystème.

La communauté associée à l'effluent était dominée par les phyla archaeplastida, les opisthokonta et les rhizaria lors des deux campagnes d'échantillonnage. Ce site se différencie de l'amont et de l'aval par une abondance relative plus élevée des genres *Chlamydomonas* (archaeplastida), et *Rhizaspidiidae* (rhizaria), ainsi que par une forte représentation des *Trebouxiophyceae*, absent ou peu abondant aux autres stations.

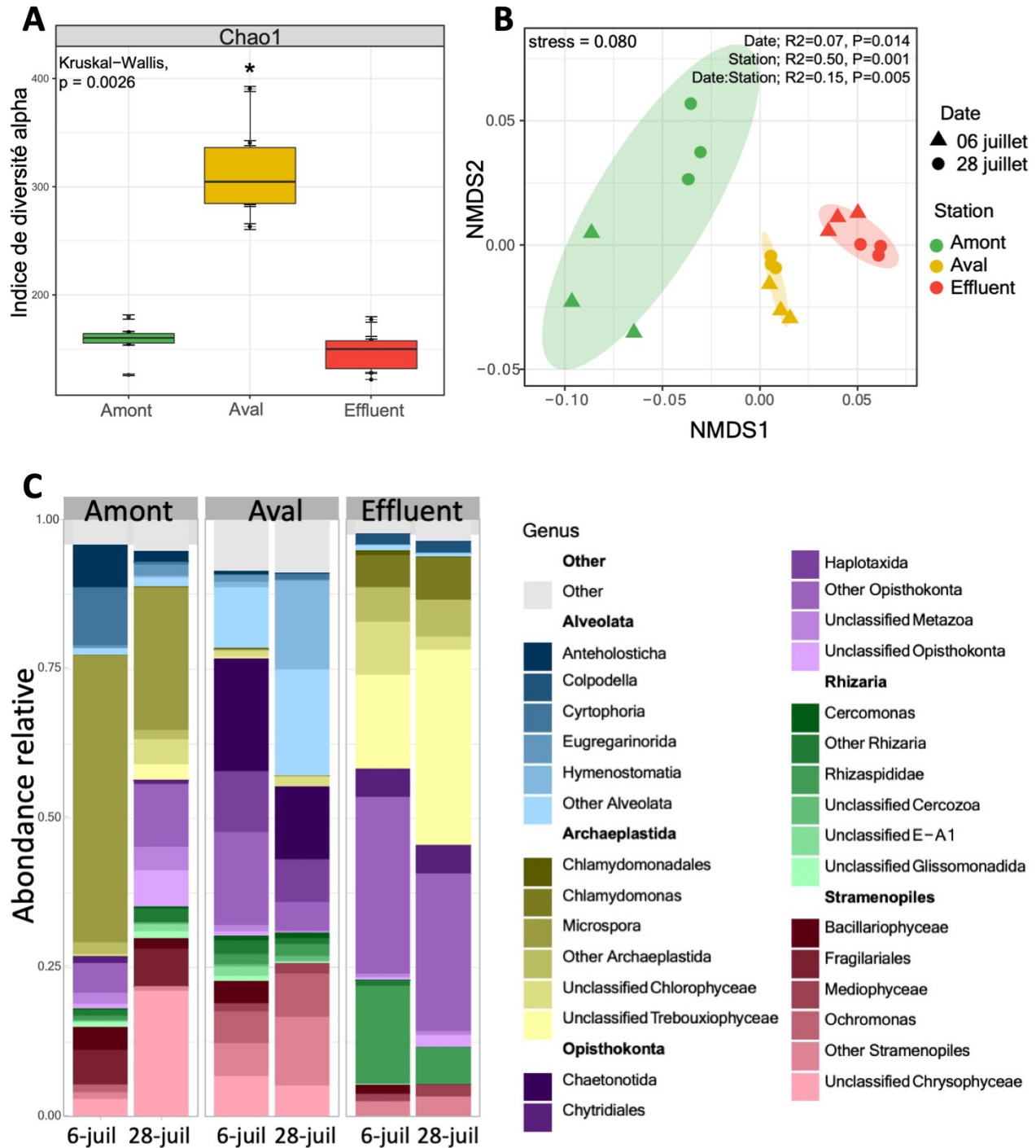


Figure 10 : Richesse spécifique des communautés eucaryotes (Chao1) (A) NMDS des communautés eucaryotes en fonction des stations, basée sur une distance de Bray-Curtis. Les distances entre les points illustrent la similarité des communautés entre les conditions. (B) Profils taxonomique des communautés eucaryotes eucaryotes à l'échelle du genre. Seuls les genres les plus abondants sont représentés. (C)

L'analyse SIMPER réalisée sur les données de composition des communautés eucaryotes a révélé des dissimilarités entre les stations échantillonnées (Tableau 4). Entre les sites amont et effluent, la dissimilarité est majoritairement expliquée par la présence exclusive du genre *Microspora* (42,7 %) et des *Fragilariales* (8,4 %) à l'amont, tandis que les genres *Rhizaspididae* (13,7 %) et *Diplogasterida* (7,2 %) sont propres à l'effluent. Les différences entre les stations amont et aval sont principalement dues à la dominance du genre *Microspora* à l'amont (35,7 % de contribution) et à la présence des ordres *Chaetonotida* (25,4 %) et *Haplotaxida* (12,4 %) uniquement à l'aval. Enfin, la comparaison entre les sites aval et effluent révèle que plusieurs espèces spécifiques expliquent les dissimilarités observées. Les ordres *Chaetonotida* (29,0 %) et *Haplotaxida* (14,1 %), ainsi que le genre *Ochromonas* (6,6 %), sont caractéristiques du site aval, tandis que les *Rhizaspididae* (13,0 %), *Diplogasterida* (6,8 %) et *Chlamydomonas* (6,3 %) sont spécifiques de l'effluent.

Tableau 4 : Contributions des principales espèces eucaryotes aux dissimilarités entre les sites (SIMPER).

	Abondance (%)		Contribution (%)	Cumulative (%)
Sites d'échantillonnage	Amont	Effluent		
<i>Microspora</i>	57,22	0	42,7	42,6
<i>Rhizaspididae</i>	0	18,49	13,7	56,3
<i>Fragilariales</i>	10,84	0	8,4	64,7
<i>Diplogasterida</i>	0	9,59	7,2	71,9
	Amont	Aval		
<i>Microspora</i>	57,22	0	35,7	36,3
<i>Chaetonotida</i>	0	39,86	25,4	62,1
<i>Haplotaxida</i>	0,03	19,66	12,4	74,7
	Aval	Effluent		
<i>Chaetonotida</i>	39,86	0	29,0	29,0
<i>Haplotaxida</i>	19,66	0	14,1	43,1
<i>Rhizaspididae</i>	0	18,49	13,0	56,2
<i>Diplogasterida</i>	0	9,59	6,8	63,0
<i>Ochromonas</i>	9,09	0	6,6	69,6
<i>Chlamydomonas</i>	0	8,71	6,3	75,8

2.2.4 Analyses de la composante bactérienne du biofilm

La mesure de la diversité alpha avec l'indice Chao1 a révélé une richesse spécifique significativement plus élevée à la station effluent par rapport aux deux autres stations (Kruskal–Wallis, $p < 0,01$) (figure 11A). Des communautés bactériennes très différenciées entre les sites ont été observées (figure 11B). Le site a été identifié comme un facteur affectant significativement les communautés microbiennes benthiques ($p = 0,001$) en expliquant 39 % de la variance entre les communautés. La date d'échantillonnage présente une contribution significative ($p = 0,002$) avec 10 % de la variation observée expliquée par ce facteur. L'interaction date–station étaient aussi significative ($R^2 = 0,20$, $p = 0,001$), suggérant ainsi une dépendance entre les facteurs date et site d'échantillonnage.

La communauté bactérienne du site amont au 6 juillet 2022 était principalement dominée par les protéobactéries, suivie par les phyla bactéroidotes et cyanobactéries (figure 11C). Parmi les bactéroidotes, le genre *Ferruginibacter* était bien représenté avec les genres *Tychonema* CCAP 1459-11B et *Wilmottia* Ant-Ph58. La campagne d'échantillonnage du 28 juillet 2022 a révélé des groupes principaux similaires. Toutefois, une augmentation importante de l'abondance relative des cyanobactéries était notable. Ces dernières représentaient à cette date plus de 50 % de la communauté, avec une prédominance marquée du genre *Wilmottia* Ant-Ph58.

Le site aval était dominé par les protéobactéries le 6 juillet 2022, mais également par des bactéroidotes, avec une contribution importante des genre *Flectobacillus* et *Ferruginibacter*. Des acidobactéries étaient également présentes notamment les *Vicinamibacterales* et le genre *Bryobacter*. Le 28 juillet 2022, les protéobactéries et les bactéroidotes sont demeurées les groupes dominants. Une augmentation notable de l'abondance relative du genre *Flectobacillus* a été observée entre les deux échantillonnages. Les cyanobactéries et les planctomycètes, qui étaient peu abondants lors de l'échantillonnage du 6 juillet 2022, ont vu leur abondance relative diminuer davantage le 28 juillet 2022. De même, une baisse de l'abondance des acidobactéries a été observée à cette date.

Les communautés microbiennes du biofilm récoltées à la station effluent présentaient une composition similaire entre les deux dates d'échantillonnage, avec quelques variations dans les abondances relatives. Les communautés étaient dominées par des protéobactéries, tel que le genre *Tabrizicola*, absent des stations amont et aval. Des bactéroidotes et des cyanobactéries

composaient également la communauté, avec une forte représentation du genre *Tychonema* CCAP 1459-11B.

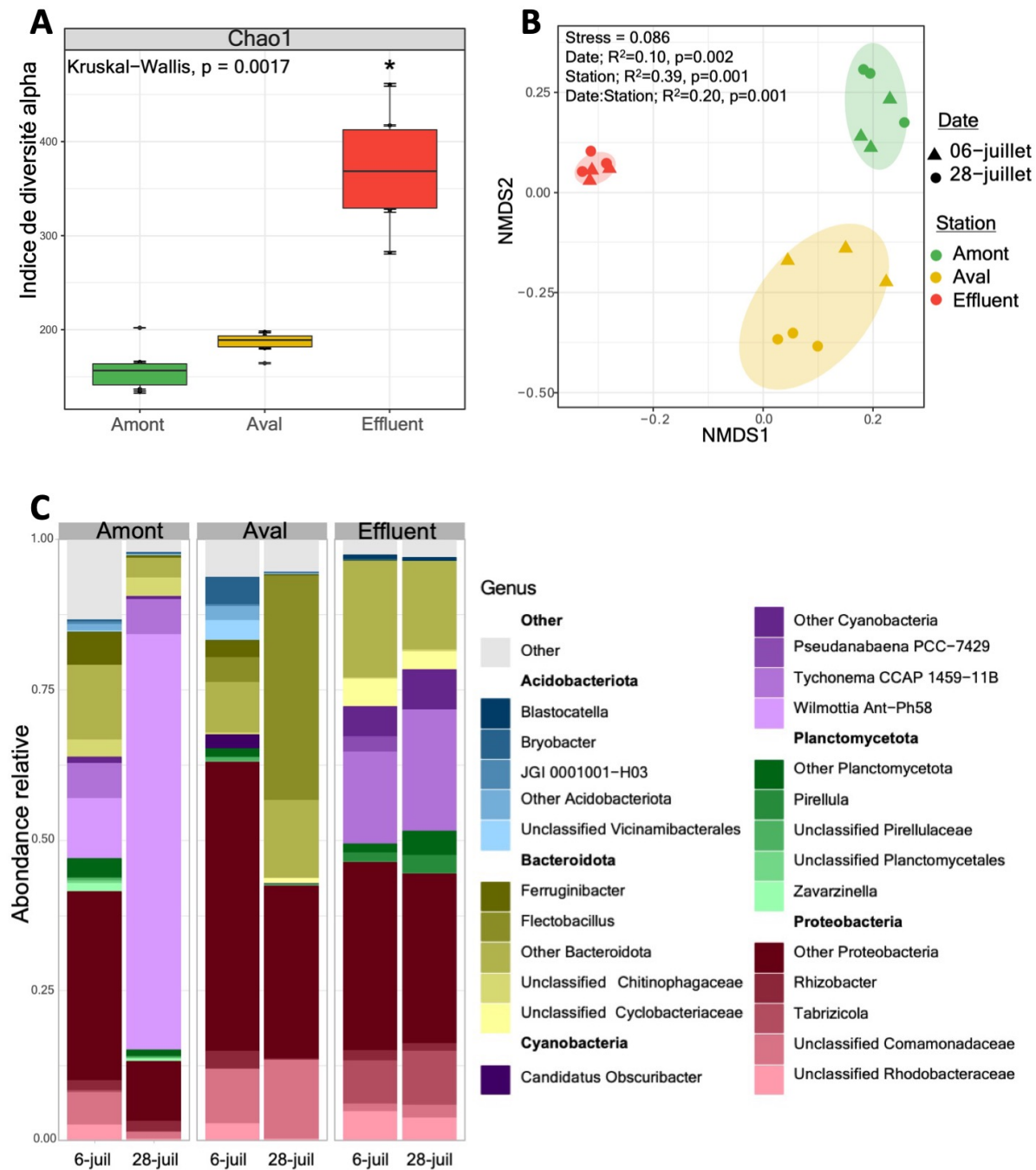


Figure 11 : Richesse spécifique des communautés procaryotes (Chao1) (A) NMDS des communautés procaryotes en fonction des stations, basée sur une distance de Bray-Curtis. Les distances entre les points illustrent la similarité des communautés procaryotes entre les conditions. (B) Profils taxonomiques des communautés procaryotes à l'échelle du genre. Seuls les genres les plus abondants sont représentés. (C)

Tableau 5 : Contributions des principales espèces bactériennes aux dissimilarités entre les sites (SIMPER).

	Abondance (%)		Contribution (%)	Cumulative (%)
Sites d'échantillonnage	Amont	Effluent		
<i>Wilmottia Ant-Ph58</i>	57,55	0	32,31	42,6
<i>Tychonema CCAP 1459-11B</i>	20,20	36,55	12,72	59,3
<i>Tabrizicola</i>	0	16,90	9,87	72,3
	Amont	Aval		
<i>Wilmottia Ant-Ph58</i>	57,55	0	34,42	36,7
<i>Flectobacillus</i>	0	43,69	26,52	65,0
<i>Tychonema CCAP 1459-11B</i>	20,20	0	13,28	79,1
	Aval	Effluent		
<i>Flectobacillus</i>	43,69	0	27,59	28,2
<i>Tychonema CCAP 1459-11B</i>	0	36,55	23,65	52,4
<i>Tabrizicola</i>	0	16,90	10,98	63,7
<i>Sphaerotilus</i>	13,21	0	8,18	72,1

2.3 Discussion

2.3.1 Implication des activités minières dans la chimie du cours d'eau

Les résultats obtenus dans cette étude s'inscrivent dans le cadre des travaux antérieurs sur les effluents miniers, en appuyant et précisant plusieurs observations issues de la littérature scientifique. Notamment, l'analyse des données physico-chimiques a révélé des gradients marqués entre les sites d'échantillonnage, particulièrement entre l'amont et l'effluent, avec des augmentations significatives des concentrations en nitrate, sulfate et métaux alcalino-terreux. Ces résultats concordent avec les travaux antérieurs ayant identifié l'utilisation d'explosifs à base de nitrate d'ammonium et la dégradation des thiocyanates issus du procédé de cyanuration comme principales sources de contamination en nitrate et sulfate dans les effluents miniers (Brochu 2010). L'effluent s'est notamment distingué par une augmentation considérable de certains éléments, comme le manganèse et le calcium, confirmant ainsi le rôle des processus de cyanuration dans la libération de ces composés dans le milieu aquatique (MDDELCC 2016 ; Johnson 2015). Les réactions chimiques complexes entre les cyanures, le soufre et les métaux influencent donc la composition chimique des effluents (Mekuto et al. 2016). De plus, la taille plus

restreinte du ruisseau dans lequel se déversent les effluents peut contribuer à l'observation de concentrations plus élevées à ce site en limitant la dilution des composés chimiques. La morphologie du réseau hydrique peut ainsi accentuer les contrastes observés sur le plan physico-chimique.

La variation temporelle relevée pour certains paramètres met en évidence une dynamique saisonnière et opérationnelle des activités minières. En effet, la dégradation des composés sulfures-cyanures est assurée par des processus biologiques. Ainsi, le traitement des cyanures qui implique des étapes de nitrification et de dénitrification est affecté par des facteurs environnementaux tels que la température et la disponibilité en oxygène (van Zyl et al. 2011). La dégradation des cyanures et thiocyanates représente une étape cruciale pour réduire la toxicité des effluents (Mudder et Botz 2001). Cependant, nos observations suggèrent que les mécanismes biologiques actuels mis en place dans les installations minières présentent des limites. Ces limites peuvent compromettre l'efficacité du traitement, menant potentiellement à des rejets plus chargés en contaminants dans le milieu récepteur. Par ailleurs, bien que les différences temporelles soient particulièrement marquées aux sites aval et effluent, des variations ont également été relevées au site amont, suggérant l'influence possible de facteurs naturels comme la dynamique hydrologique ou les conditions climatiques. Il convient également de noter que les moyennes présentées dans le tableau principal (tableau 3) peuvent masquer ces variations temporelles ; les données brutes des deux campagnes ont donc été reportées en annexe 1 (tableau 10) afin de permettre une meilleure lecture des fluctuations.

2.3.2 Influence des conditions environnementales sur les communautés microbiennes (procaryotes et eucaryotes)

Les résultats démontrent une structuration des communautés bactériennes influencée par un gradient spatial et temporel. Cette structuration peut être attribuée à des variations environnementales telles que les concentrations en contaminants et nutriments, ainsi que la présence de matière organique. Ainsi, la station amont présente une communauté dominée par la cyanobactérie *Wilmottia Ant-Ph58*, indicatrice de bonnes conditions environnementales et de faibles niveaux de contamination (Cardinale 2011). Ce genre est typiquement associé à des environnements oligotrophes, ainsi sa sensibilité aux perturbations anthropiques explique son absence dans les stations aval et effluent (Cashman et al. 2013). De ce fait, ce genre peut donc être considéré comme un indicateur de bonne qualité de l'eau et d'écosystèmes peu perturbés. A

contrario, l'enrichissement en nutriments observé à la station effluent semble favoriser une diversité microbienne plus importante, en accord avec les études montrant que des apports élevés en nutriments, notamment liés aux activités anthropiques, augmentent la richesse spécifique des communautés microbiennes (Cardinale 2011). Ce phénomène peut être expliqué par la disponibilité accrue de ressources dans cet environnement, favorisant l'installation de taxons capables d'exploiter ces apports, tels que les protéobactéries et les cyanobactéries identifiées à cette station (Gaysina et al. 2019). La station effluent est dominée par des cyanobactéries comme *Tychonema* CCAP 1459-11B, connues pour leur tolérance aux conditions extrêmes, notamment des concentrations élevées de métaux et de nutriments. Ces caractéristiques font de *Tychonema* CCAP 1459-11B une espèce compétitive dans des environnements enrichis. Sa présence exclusive dans l'effluent souligne également son rôle potentiel dans les processus biogéochimiques, comme la fixation de l'azote ou la tolérance à des conditions stressantes (Filimonova et al. 2016). En aval, l'effluent minier affecte la composition chimique du site. Les apports associés à la présence de matière organique révèlent la présence d'espèces bioindicatrices caractéristiques de cette station telles que *Sphaerotilus* et *Flectobacillus* (Pipes et Jones 1963, Seder-Colomina et al. 2014). En particulier, l'organisme *Flectobacillus* présent à l'aval est impliqué dans la dégradation de la matière organique complexe en nutriments, les rendant ainsi accessibles aux autres organismes (Corno et al. 2015).

De plus, les protéobactéries, présentes à toutes les stations, jouent un rôle central dans les cycles biogéochimiques et influencent la disponibilité en carbone, azote, phosphore et soufre (Gupta et Gupta 2021). Leur capacité à coloniser des environnements divers et à s'adapter à des variations de qualité de l'eau reflète ainsi leur importance écologique. Plus spécifiquement, le genre *Pirellula*, identifié dans l'effluent, contribue au processus de dénitrification en réduisant les excès de nitrate dans le milieu associé aux effluents miniers et permettant de maintenir l'équilibre des cycles biogéochimiques (Fraser 2004). Toutefois, certaines cyanobactéries présentent dans l'effluent, telle que *Tychonema* CCAP 1459-11B affectent la disponibilité en nutriments en favorisant les phénomènes de compétition avec les autres organismes autotrophes, notamment pour le nitrate (Gariépy 2019). Une perturbation de l'écosystème peut ainsi se produire et affecter la structure des communautés. D'autres organismes exclusivement retrouvés dans l'effluent comme *Tychonema* CCAP 1459-11B et *Tabrizicola* illustrent une adaptation à des environnements perturbés et enrichis en contaminants (Tarhriz et al. 2020, Shams et al. 2015). Ces genres témoignent de la résistance des communautés bactériennes aux perturbations anthropiques, mais également des changements écologiques induits par les activités minières (Lenart-Boroń et al.

2022). Cependant, en parallèle, la perte d'organismes sensibles à la pollution comme *Wilmottia Ant-Ph58* indique une perte potentielle de biodiversité, soulignant une dégradation de l'écosystème naturel.

Par ailleurs, les dissimilarités marquées observées entre les stations en fonction de la composition des communautés eucaryotes ont mis en évidence des genres et ordres spécifiques retrouvés à chaque station. À l'amont, les diatomées, en particulier les *Fragilariales*, dominent, tandis qu'à l'effluent, les genres *Chlamydomonas* et *Rhizaspididae* sont prédominants. Cette différenciation semble liée aux conditions environnementales uniques de chaque site, influençant la composition des communautés microbiennes. Plus généralement, les milieux peu perturbés, où la lumière n'est pas limitante, sont souvent dominés par des organismes photosynthétiques, bien que cette tendance puisse varier en fonction de la nature du milieu, des interactions entre les espèces et de la compétition pour les ressources. À l'effluent, les organismes tels que *Chlamydomonas* sont bien adaptés aux environnements riches en nutriments et perturbés par les contaminants. En plus de leur activité photosynthétique, ces algues possèdent des mécanismes de tolérance aux métaux (Singh et al. 2006). Le site aval se distingue par un profil environnemental modérément enrichi en nutriments, ce qui semble offrir des conditions favorables à une plus grande diversité d'organismes benthiques, y compris des genres spécifiques tels que *Chaetoniida* et *Haplotaxida*, typiques de ce site. Ces organismes, notamment les vers détritivores, contribuent aux processus de décomposition et de recyclage des nutriments (Wallace et al. 1997, Giere 2008). Leur rôle dans la dégradation de la matière organique est crucial pour maintenir un équilibre trophique stable, permettant la prolifération d'autres groupes tels que les stramenopiles, notamment *Ochromonas*, qui est capable d'effectuer la photosynthèse tout en étant mixotrophe. La présence de cet organisme est cohérente avec un milieu présentant un enrichissement modéré, compatible avec sa capacité à exploiter des ressources inorganique et organique (Andersson et al. 1989).

2.3.3 Effet du gradient environnemental sur la qualité nutritionnelle du biofilm

La littérature scientifique met en évidence l'importance des paramètres physiques et chimiques sur la composition en lipides des biofilms aquatiques. Les biofilms, en tant que matrice complexe d'organismes autotrophes et hétérotrophes, présentent des profils en acides gras fortement influencés par leur environnement (Gladyshev et al. 2011, Gonçalves et al. 2017). Ces profils sont à la base de la qualité nutritionnelle. En effet, les acides gras, notamment certains PUFA, sont essentiels pour la croissance et la reproduction des consommateurs primaires. Notre étude appuie

ces observations en montrant que la composition en acides gras varie significativement en fonction des sites étudiés, reflétant ainsi l'impact des gradients environnementaux. De nombreuses études ont souligné le rôle des PUFA, comme l'acide linoléique et l'acide α -linoléique, dans les processus physiologiques des organismes aquatiques, notamment en raison de leur incapacité à être synthétisés de novo par les consommateurs primaires (Huggins et al. 2004, Guo et al. 2016). Cette étude vient appuyer ces observations en identifiant une teneur plus élevée en PUFA dans les biofilms des sites offrant un meilleur accès à la lumière, comme à l'amont, où les conditions environnementales semblent favoriser la présence de producteurs autotrophes. Parmi les groupes identifiés dans nos échantillons, les diatomées (telles que les *Fragilariiales*) et les Chlorophycées (en particulier le genre *Microspora*) sont reconnus pour leur capacité à produire des PUFA, des acides gras essentiels pour les consommateurs primaires dans la chaîne trophique aquatique (Dunstan et al. 1993, Thompson 1996). Toutefois, la capacité des diatomées à proliférer varie selon les taxons et les conditions environnementales. Certaines espèces sont adaptées aux milieux oligotrophes, tandis que d'autres prospèrent dans des environnements méso- ou eutrophes. De plus, la disponibilité en lumière joue un rôle clé dans leur croissance, influençant la dynamique des communautés selon les conditions locales. Grâce à leur capacité d'adaptation, ces organismes jouent un rôle central dans les écosystèmes aquatiques, indépendamment du caractère oligotrophe des milieux. Ainsi, un tel profil lipidique est particulièrement bénéfique dans un environnement oligotrophe où les ressources nutritionnelles sont limitées (Guo et al. 2016). *A contrario*, dans des environnements plus contraignants, les biofilms présentent un profil lipidique différent. Les sites présentant des contraintes environnementales, telles qu'une présence accrue de contaminants issus des eaux de procédés comme l'effluent ou plus sombre et riche en carbone organique dissous comme à l'aval, affichent une composition dominée par les MUFA ou les SFA. Les MUFA sont caractéristiques des environnements soumis à des pressions anthropiques, et les SFA sont généralement associés à des biofilms développés dans des conditions limitantes pour les autotrophes (Guschina et Harwood 2009). Ces observations sont appuyées par les résultats obtenus dans cette étude : le site effluent, caractérisé par des concentrations élevées en sulfate et nitrate, ainsi que le site aval où la concentration en carbone organique dissous est supérieure à 20 mg/L, présentent une proportion relative plus élevée en MUFA et SFA comparativement au site amont. Les résultats confirment que la pression environnementale, qu'elle soit chimique ou liée à des conditions limitantes comme la lumière, influence la structure biochimique des biofilms. Dans ces milieux, certains organismes adaptés aux conditions extrêmes, tel que *Chlamydomonas*, influence la structuration des biofilms. En effet, *Chlamydomonas* (présente à l'effluent) produit des SFA et

MUFA qui l'aident à survivre dans des environnements difficiles (Harris 2009). Ces acides gras sont impliqués dans le maintien de l'intégrité des membranes cellulaires et la gestion des stress oxydatifs, facilitant la survie dans des environnements perturbés. *Chlamydomonas* est notamment connue pour ses mécanismes de tolérance au stress chimique (Singh et al. 2006).

Il est important de noter que, bien que des changements dans la composition des acides gras aient été observés, l'absence totale de PUFA au site aval semble étonnante, particulièrement compte tenu des connaissances actuelles. Dans plusieurs études, notamment celle de Fadhlaoui et al. (2020), il a été observé que des stress environnementaux, tels que l'exposition à des métaux lourds comme le nickel, peuvent altérer la proportion de PUFA dans les biofilms. Cependant, bien que la concentration de ces acides gras puisse diminuer en réponse à ces stress, les PUFA restent généralement présents, bien qu'en quantités réduites. Cette constatation a également été rapportée par Malbezin et al. (2024), qui ont étudié l'impact des herbicides sur la composition lipidique des biofilms. Selon leurs observations, bien que l'exposition aux contaminants chimiques puisse affecter la diversité des acides gras, les PUFA demeurent dans les biofilms, même si leur proportion varie. Cette résilience relative des PUFA pourrait être influencée par la présence d'organismes benthiques spécifiques, qui jouent un rôle dans la dynamique des profils en acides gras. Les groupes Chaetoniida et Haptophyta, caractéristiques du site aval, affectent la dynamique, en particulier en termes de production de SFA et de PUFA, en fonction des sources de nutriments disponibles (Giere 2008). Ainsi, la quasi-absence de PUFA dans le biofilm au site aval reflète une réduction marquée de ces acides gras, probablement liée à la pression environnementale spécifique à ce site. La combinaison d'une forte teneur en contaminants (sulfate, nitrate), d'une concentration élevée en carbone organique dissous (> 20 mg/L), ainsi que d'un accès limité à la lumière constitue un environnement défavorable pour les producteurs primaires synthétisant les PUFA. De plus, l'altération du profil lipidique observée en aval ne fait pas seulement état d'une absence de PUFA, elle met en évidence une transformation globale de la communauté microbienne. Cette restructuration s'accompagne d'une baisse de la qualité nutritionnelle du biofilm, affirmant l'hypothèse selon laquelle les changements dans la chimie de l'eau influencent la composition biochimique du biofilm et reflètent une restructuration fonctionnelle et taxonomique des communautés en aval par rapport à l'amont et l'effluent.

2.4 Conclusion

Cette étude met en évidence l'effet d'un gradient chimique causé par les effluents miniers sur la composition des communautés eucaryotes et procaryotes benthiques, ainsi que les ajustements biochimiques et biologiques mis en place au sein du biofilm. Le biofilm soumis à des fluctuations de composés sulfures–cyanures et de métaux montre une adaptation de réponse en fonction des conditions environnementales, démontrant ainsi des interactions complexes entre la chimie de l'eau, la diversité biologique et les cycles biogéochimiques impliqués. Ce gradient se traduit par des modifications marquées de la composition spécifique des communautés : à l'amont, les communautés diatomiques sont dominées par des espèces indicatrices de bonne qualité de l'eau, tandis que celles de l'aval et de l'effluent révèlent la présence d'espèces tolérantes ou indicatrices de milieux perturbés. Ces observations confirment que les processus miniers modifient la chimie de l'eau et induisent une restructuration des communautés.

L'analyse des profils en acides gras (PUFA, MUFA, SFA) suggère que les biofilms représentent des bons indicateurs de perturbations environnementales. Le site situé en amont, dominé par des diatomées et des *Chlorophycées*, produit des profils lipidiques à haute valeur nutritionnelle (grande proportion d'EPA et de DHA). *A contrario*, les biofilms influencés par les effluents miniers présentent des compositions dominées par des cyanobactéries comme *Tychonema* CCAP 1459 - 11B, suggérant une adaptation aux conditions de stress. Les communautés riches en PUFA offrent une ressource de haute qualité pour les consommateurs primaires, tandis que celles riches en SFA/MUFA peuvent limiter cette fonction écologique. Au-delà des PUFA, l'analyse conjointe des MUFA et des SFA a permis de documenter finement les ajustements métaboliques des communautés soumises aux stress environnementaux. Ces descripteurs lipidiques apportent une information précieuse sur la physiologie des organismes et la structure fonctionnelle du biofilm.

Les analyses de la structure taxonomique des biofilms ont révélé des ajustements écologiques clairs, en réponse au gradient chimique créé par les effluents miniers. En amont, les communautés eucaryotes sont dominées par des archaeplastida, incluant *Microspora*, et sont caractérisées par la présence d'espèces de diatomées telles que *Fragilaria capucina* var. *gracilis*, indicatrice d'une bonne qualité de l'eau. Ces communautés de diatomées reflètent un milieu aquatique peu perturbé. En aval, la structure taxonomique devient plus complexe, avec une diversité accrue dans les groupes eucaryotes, dominée par des opisthokonta, stramenopiles et alveolata. Des organismes comme les *Chaetonotida*, *Haplotaxida* et *Hymenostomatia* se

développent. La diversité des diatomées y est également plus élevée, avec certaines espèces indicatrices de milieux peu pollués à modérément altérés, comme *Achnanthes minutissimum sensu lato*. Des déformations de valves de diatomées sont également observées à ce site, indiquant un stress plus marqué. Dans l'effluent, la dominance des archaéplastida cède la place à une structure communautaire influencée par des conditions chimiques sévères et marquée par l'apparition de rhizaria. La présence de genres tels que *Chlamydomonas* et des *Rhizosporidiales* témoigne d'une réponse adaptative aux contraintes environnementales extrêmes. Chez les procaryotes, la dominance des cyanobactéries, telle que *Wilmottia Ant-Ph58*, en amont, est progressivement remplacée par des communautés dominées par les protéobactéries et les bacteroidota dans les zones affectées par les effluents. Des genres comme *Flectobacillus* et *Tychonema CCAP 1459-11B* illustrent cette transition, confirmant ainsi que les communautés benthiques s'adaptent aux conditions de contamination croissante. Ces résultats confirment les hypothèses selon lesquelles les effluents miniers entraînent une restructuration marquée des communautés benthiques, avec l'émergence d'espèces tolérantes, dont les caractéristiques écologiques sont cohérentes avec les changements environnementaux observés.

Ainsi, la mise en place de procédés de traitement, comme celui développé par le COREM, représente une avancée technologique et une piste prometteuse pour réduire l'effet des effluents sur les écosystèmes aquatiques. Cette étude souligne les limites rencontrées avec les approches traditionnelles et met l'accent sur l'emploi d'approches multi-descripteurs. En s'appuyant sur une combinaison de données biochimiques, morphologiques et taxonomiques, cette recherche illustre l'intérêt d'une analyse intégrée pour comprendre les effets des effluents miniers.

Certaines limites ont été identifiées. Les mécanismes moléculaires sous-jacents à la tolérance des biofilms aux contaminants, bien que suggérés par la présence de genres comme *Tabrizicola* et *Tychonema CCAP 1459 - 11B*, n'ont pas été investigués. Une approche métagénomique offrirait des informations complémentaires, une analyse fonctionnelle approfondie permettrait d'explorer les stratégies adaptatives des biofilms aux perturbateurs environnementaux. De plus, l'analyse spatio-temporelle, limitée à deux campagnes d'échantillonnage, ne permet pas de capturer pleinement les dynamiques saisonnières. Bien que la composition lipidique ait été étudiée, les répercussions sur les consommateurs primaires et les transferts trophiques n'ont pas été analysées et seraient intéressantes à approfondir. Une approche écosystémique intégrant des

outils taxonomiques, biochimiques et fonctionnels permettrait le développement de bioindicateurs robustes et prédictifs.

Cette recherche démontre que les effluents miniers modifient la chimie des cours d'eau et restructurent les biofilms benthiques, essentiels aux cycles biogéochimiques et aux réseaux trophiques. Les biofilms, grâce à leurs signatures biochimiques et leur plasticité écologique, se révèlent être des indicateurs clés pour évaluer la santé des milieux aquatiques. Les résultats obtenus mettent en lumière non seulement les modifications lipidiques, mais aussi les changements dans la composition des communautés procaryotes (notamment la prédominance des protéobactéries dans les milieux perturbés) et eucaryotes apportant une réponse intégrée aux quatre hypothèses initiales. Toutefois, les contrastes marqués observés entre les sites ne peuvent être attribués spécifiquement à l'effet du nitrate. Cet effet particulier est examiné plus en détail dans le deuxième chapitre de ce mémoire. Les apports méthodologiques et les perspectives identifiées ouvrent la voie à une gestion durable des écosystèmes aquatiques, intégrant des solutions technologiques et écologiques adaptées aux défis imposés par les activités humaines.

3. CHAPITRE 2 : INFLUENCE DU NITRATE DANS LES CHANGEMENTS DE COMMUNAUTÉS

Les effluents issus des activités minières enrichissent les cours d'eau en divers composés tels que les métaux, le sulfate et le nitrate (Al et al. 2006), affectant la composition et le fonctionnement des communautés benthiques. Ces communautés impliquées dans les cycles biogéochimiques représentent une ressource nutritive essentielle pour les consommateurs primaires. En effet, comme démontré dans le chapitre 1, les communautés constituant le biofilm en amont des rejets miniers et ceux retrouvés en aval diffèrent, tant sur l'aspect taxonomique que biochimique, se répercutant ainsi sur leur qualité nutritionnelle.

La réponse des biofilms reste toutefois complexe. Les organismes réagissent à une combinaison de stress environnementaux, rendant l'identification d'effets spécifiques liés à un seul composé difficile (Culp et al. 2000). Des études menées sur les communautés microbiennes ont permis de mieux identifier ces interactions en isolant certains paramètres d'intérêt. La restructuration des communautés sous l'influence des métaux a été mise en évidence dans de nombreux travaux (Soldo et Behra 2000 ; Gardham et al. 2015), tandis que d'autres études appuient une réponse des biofilms à un enrichissement en nutriments (Hillebrand et Sommer 2000 ; Rier et Stevenson 2002 ; Carr et al. 2005). Ainsi, la complexité chimique des environnements contaminés implique une nécessité pour les biofilms de développer des stratégies adaptatives leur permettant de maintenir leurs fonctions écologiques malgré les perturbations. Parmi les composés constituant les effluents, le nitrate est identifié comme un facteur important influençant les communautés aquatiques (Hu et al. 2022). En effet, ce dernier représente un nutriment essentiel stimulant la productivité primaire (Howarth et al. 2021). Toutefois, un excès dans le milieu peut engendrer des changements de la structure des communautés (Howarth et al. 2021). De plus, les implications fonctionnelles des restructurations demeurent difficiles à identifier précisément. Les communautés de microorganismes peuvent présenter une résistance face aux perturbations environnementales et maintenir certains traits fonctionnels tels que la composition en acides gras, malgré des divergences taxonomiques. La stabilité fonctionnelle qui en découle provient d'une redondance fonctionnelle, différentes espèces remplissent des rôles écologiques semblables indépendamment de leur variabilité taxonomique (Louca et al. 2018). *A contrario*, certaines perturbations induisent des altérations des profils biochimiques, affectant la valeur nutritionnelle des biofilms (Soldo et Behra 2000). Il est donc essentiel d'opter pour une approche intégrative combinant une analyse taxonomique et fonctionnelle.

Dans le cadre de ce mémoire, un intérêt particulier est porté sur l'influence du nitrate dans la réponse des communautés benthiques soumises aux effluents miniers de la mine Agnico Eagle. Afin de mettre en évidence l'effet du paramètre nitrate, et limiter l'influence de paramètres annexes, la mise en place d'expériences en mésocosmes est pertinente (Culp et al. 2000, Laderriere 2021). Les mésocosmes permettent ainsi de révéler la réponse d'un biofilm naturel face à une exposition au nitrate et d'étudier si ces derniers sont les principaux contributeurs à la réponse du biofilm en conditions *in situ*. Les résultats de cette expérience vont permettre d'observer l'intérêt de la mise en place du nouveau procédé développé par le COREM visant à réduire les concentrations de nitrate dans les effluents miniers en confirmant ou démentant un effet du nitrate sur les communautés benthiques en conditions contrôlées.

Cette étude vise à évaluer comment un biofilm répond à des environnements chimiques différents. Les mésocosmes vont permettre de mesurer :

- La réponse du biofilm à un changement dans la chimie de l'eau lié aux activités minières;
- La contribution spécifique du nitrate à cette réponse ;
- La résistance des biofilms et leur capacité à maintenir des fonctions écologiques essentielles en conditions de stress chimique.

3.1 Méthodologie

3.1.1 Dispositif expérimental

Des expériences en mésocosmes ont été réalisées au sein de l'INRS afin d'étudier la réponse du biofilm à une perturbation minière, ainsi que la part de cette réponse liée au nitrate. À ces fins, du biofilm a été récolté lors de la dernière campagne d'échantillonnage aux sites amont, aval et effluent afin de former un biofilm composite. Ce biofilm composite formé a été utilisé comme inoculum de départ pour les expériences et exposé sur une durée de 30 jours.

Afin de répondre aux objectifs de ce volet, deux gradients d'exposition ont été établis à partir des données physico-chimiques obtenus à partir des échantillons d'eau prélevés sur le terrain. Ces données ont permis ainsi d'établir les concentrations visées dans les mésocosmes pour chacun des deux gradients : "Minier" et "Nitrate". Le gradient minier vise à reconstituer les conditions de

terrain afin d'observer en conditions contrôlées l'effet des rejets miniers sur le cours d'eau ainsi la concentration la plus faible représente les concentrations retrouvées à l'amont de la rivière Blake, et la concentration la plus élevées celles observées à l'aval de celle-ci. Une condition intermédiaire a été ajoutée dans les expériences. L'influence du nitrate est observée au travers du gradient nitrate, ce dernier utilise une eau reconstituée mimant les conditions amont. Toutefois, les concentrations en nitrate au sein des mésocosmes vont varier le long du gradient. La condition la plus faible du gradient est la même que celle utilisée pour le gradient minier et représente donc l'amont de la rivière Blake, les concentrations de nitrate utilisées pour le gradient nitrate correspondent aux concentrations de nitrate établis dans le gradient minier pour les conditions intermédiaire et aval. La composition chimique des deux gradients est recensée au sein du tableau 6.

Tableau 6 : Composition chimique de l'eau reconstituée des mésocosmes pour les deux gradients d'exposition

	condition	Nitrate (mg/L)	Sulfate (mg/L)	Calcium (mg/L)	Potassium (mg/L)	Magnésium (mg/L)	Sodium (mg/L)	Chlorure (mg/L)	Silicium (mg/L)	Fluorure (mg/L)
Minier	aval	34,43	311,33	81,37	10,93	6,29	68,23	31,47	3,18	0,27
	intermédiaire	17,49	156,75	43,35	5,70	3,92	36,02	18,33	3,20	0,16
	NO ₃ min / Amont	0,54	2,17	5,32	0,48	1,55	3,81	5,19	3,23	0,04
Nitrate	NO ₃ intermédiaire	17,49	2,17	5,32	0,48	1,55	3,81	5,19	3,23	0,04
	NO ₃ max	34,43	2,17	5,32	0,48	1,55	3,81	5,19	3,23	0,04

La mise en place de ces expériences a nécessité l'utilisation de 15 aquariums de 7,5 L, trois réplifications par condition, chacun munis d'une pompe et d'un bulleur afin d'oxygéner les milieux tout au long des expositions (Figure 12). Afin d'aider le biofilm à se développer, cinq plaques en plexiglas ont été ajoutées dans chaque aquarium, permettant ainsi d'augmenter les surfaces d'accroche. Les aquariums étant situés à proximité d'une fenêtre, un revêtement opaque a été disposé autour de ces derniers afin de limiter le développement des algues (principalement des algues vertes filamenteuses). Afin de maintenir des concentrations stables au sein des mésocosmes, l'eau reconstituée des aquariums a été renouvelée tous les 3 jours. Le biofilm a été prélevé le 30ème jour. A cette fin, les aquariums ont été siphonnés en conservant une faible

quantité d'eau. Le biofilm a ensuite été gratté à l'aide de brosses à dents et mis en suspension dans l'eau restante des aquariums. Les biofilms en suspension ont été centrifugés et placés dans des cryotubes de 5 mL, puis conservés à -80°C.



Figure 12 : Photographie du dispositif expérimental mis en place

3.1.2 Caractérisation de la structure des communautés benthiques

Le protocole utilisé pour procéder à l'extraction et au séquençage des échantillons d'ADN est le même que celui de la section 2.2.2.2 du chapitre 1. Dans ce chapitre, en plus de l'analyse des communautés eucaryotes (18S rRNA) et procaryotes (16S rRNA), les champignons ont également été étudiés par séquençage des régions ITS2 de l'ARNr à l'aide des amorces ITS86F (5'-GTGAATCATCGAATCTTTGAA-3') et ITS4R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').

3.1.3 Analyse des acides gras

Le protocole utilisé pour procéder à l'extraction et l'analyse des acides gras dans ce chapitre est le même que celui de la section 2.2.2.3 du chapitre 1.

3.1.4 Analyses statistiques

Les données de séquençage ont été générées à l'aide de la plateforme Illumina MiSeq en mode paired-end, ciblant les régions V4-V5 du gène ARNr 16S pour les procaryotes (amorces 515FB et 926R), la région V4 du gène ARNr 18S pour les eucaryotes (amorces E572F et E1009R) et les régions ITS2 du gène ARNr pour les champignons (amorces ITS86F et ITS4R). Le traitement bioinformatique a été effectué en utilisant le pipeline DADA2 dans R. Les séquences brutes ont d'abord été filtrées et tronquées afin d'éliminer les séquences de faible qualité. Une étape d'apprentissage des profils d'erreur a permis d'inférer des variantes de séquences exactes (ASV) sans recours au clustering traditionnel. Les lectures appariées ont ensuite été fusionnées, puis une table d'ASV a été construite. Les séquences chimériques ont été détectées et retirées à l'aide d'une méthode consensus. L'assignation taxonomique a été réalisée à l'aide de bases de données de référence spécifiques à chaque marqueur : SILVA v138.1 pour les séquences 16S, PR2 v5.0.0 pour les séquences 18S et UNITE (mise à jour du 4 avril 2024) pour les ITS. Les données ont été intégrées dans des objets de type phyloseq pour l'exploration de la structure des communautés microbiennes.

La visualisation des données et les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide de R version 4.2.2 en utilisant les packages ggplot2 version 3.5.1 et ggpubr version 0.6.0. Les données de séquençage ont été analysées sur R par analyse de la diversité alpha en utilisant l'indice Chao1. La distance de Bray–Curtis a été utilisée comme mesure de la diversité beta et visualisée par analyse en composante principales non-métrique (NMDS) avec le package vegan, version 2.6.4. Les différences de composition des communautés en fonction de la condition (gradient minier) et de la concentration en nitrate ont été établies en utilisant une PERMANOVA, ainsi que la fonction adonis2 du package vegan.

Les diagrammes en barres taxonomiques ont été visualisés à l'aide du package fantaxtic version 0.2.0, à partir des données transformées en abondances relatives. Une analyse de similarité (SIMPER) a été effectuée sur les abondances relatives des genres retrouvés dans les conditions les plus faibles et les plus élevées des deux gradients à l'aide du package vegan version 2.6.4.

Les données de lipides ont été visualisées avec une analyse en composantes principales. Une PERMANOVA suivie d'un test post-hoc par paire Adonis avec une correction de Holm-Bonferroni ont également été menés afin de dégager un effet des concentrations en nutriments dans le gradient minier et en nitrate dans le gradient de nitrate sur la composition en acides gras. Des

diagrammes en barres ont été réalisés afin de visualiser la répartition des principales classes d'acides gras pour chaque gradient. Les différences statistiquement significatives entre les conditions des deux gradients pour les classes d'acides gras SFA, MUFA et PUFA ont été testées à l'aide du test de Kruskal-Wallis et du test post-hoc de Dunn par paire avec correction de Holm-Bonferroni à l'aide du package rstatix version 0.7.2.

3.2 Résultats

3.2.1 Analyses des communautés de biofilm

3.2.1.1 Composante bactérienne

La visualisation de la composition de la communauté bactérienne NMDS (stress = 0,054) montre que les différentes conditions expérimentales selon les deux gradients étudiés (Figure 13A) sont associées avec des assemblages distincts. Les échantillons de la condition NO_3 min / Amont forment un groupe distinct des autres conditions, tant pour le gradient minier que pour le gradient de nitrate, montrant une composition spécifique à cet environnement. Une dispersion plus marquée des échantillons de cette condition suggère une plus grande hétérogénéité au sein des communautés bactériennes comparativement aux autres conditions. Le long du gradient minier, les conditions intermédiaires et aval se différencient peu, suggérant des similarités dans la composition des communautés entre ces deux conditions. Le gradient de nitrate présente une tendance similaire, les communautés NO_3 intermédiaire et NO_3 max sont plus similaires entre elles, qu'avec la condition NO_3 min / Amont. Toutefois, la différenciation observée avec une PERMANOVA est plus marquée entre les conditions du gradient de nitrate ($Df = 2$, $F = 4,624$, $p = 0,006$) que celle observée pour le gradient minier ($Df = 2$, $F = 3,833$, $p = 0,014$), suggérant une influence plus nette du nitrate sur la structuration des communautés, possiblement favorisée par l'absence d'autres contraintes associées à des contaminants comme les métaux.

L'analyse de la diversité alpha (indice Chao1) n'a pas mis en évidence de différences significatives de richesse spécifique entre les conditions, que ce soit le long du gradient minier ($p = 0,09$) ou de nitrate ($p = 0,73$) (Figure 13B). Cependant, une tendance à la hausse de la richesse spécifique est observable le long des deux gradients.

Les aquariums ont été inoculés avec un biofilm présentant une communauté dominée par des protéobactéries. D'autres phylum étaient présents tels que des bactérioidotes (*Ferruginibacter*), des cyanobactéries (*Wilmottia Ant-Ph58*) et des planctomycètes (Figure 13C). Pour les deux gradients d'exposition, la condition la plus faible étant partagée entre les deux, la communauté observée était dominée par les protéobactéries, notamment par le genre *Aquabacterium*. En considérant le gradient minier, face à des milieux de plus en plus enrichis, les communautés étaient dominées par les protéobactéries *Aquabacterium* dont l'abondance relative demeure élevée, mais d'autres genre tels que *Luteimonas* et *Methylibium* se sont aussi développés. De plus, le développement de cyanobactéries dans les conditions intermédiaires et aval est à relever avec le genre *Phormidium* SAG 37.90.

La réponse du biofilm au gradient de nitrate montre un profil de réponse similaire à celui du gradient minier. Les mêmes groupes d'organismes répondent aux changements d'environnements. Toutefois, un développement accru des cyanobactéries du genre *Phormidium* SAG 37.90 est observable au détriment des protéobactéries *Aquabacterium*. Les communautés sont donc partagées entre les cyanobactéries et les protéobactéries lorsque les concentrations en nitrate sont plus élevées dans le milieu.

Une analyse SIMPER a permis d'identifier les organismes contribuant le plus aux différences observées le long des deux gradients (Tableau 7). Ces résultats viennent compléter les analyses NMDS et de taxonomie en faisant ressortir les espèces responsables des variations dans la composition des communautés. Le long du gradient minier, les communautés des conditions NO₃ min / Amont et Aval sont principalement différenciées par des protéobactéries et une cyanobactérie. La condition aval présente une diminution de l'abondance relative des protéobactéries *Aquabacterium*, *Novosphingobium*, *Paucibacter*, *Cupriavidus*, *Reyranella* et *Dyella* ainsi qu'une augmentation de l'abondance relative de *Luteimonas*, *Sphingopyxis*, *Rhizobacter*, *Methylibium* et de la cyanobactérie *Phormidium* SAG 37.90. Ces organismes représentant ensemble 39,9 % de la dissimilarité. Les différences observées le long du gradient de nitrate sont principalement expliquées par les mêmes organismes que pour le gradient minier. Ainsi, les différences entre les conditions NO₃ min / Amont et Aval sont marquées par une augmentation de l'abondance relative de *Phormidium* SAG 37.90 et une diminution de *Aquabacterium* à l'aval, représentant respectivement 20,6 % et 14,7 % de la dissimilarité. D'autres organismes contribuent également à cette dissimilarité avec une hausse de *Sphingopyxis* et de *Luteimonas* et une baisse de *Novosphingobium*, *Paucibacter* et *Reyranella*. Ces procaryotes contribuent à 14.7 % des variations observées.

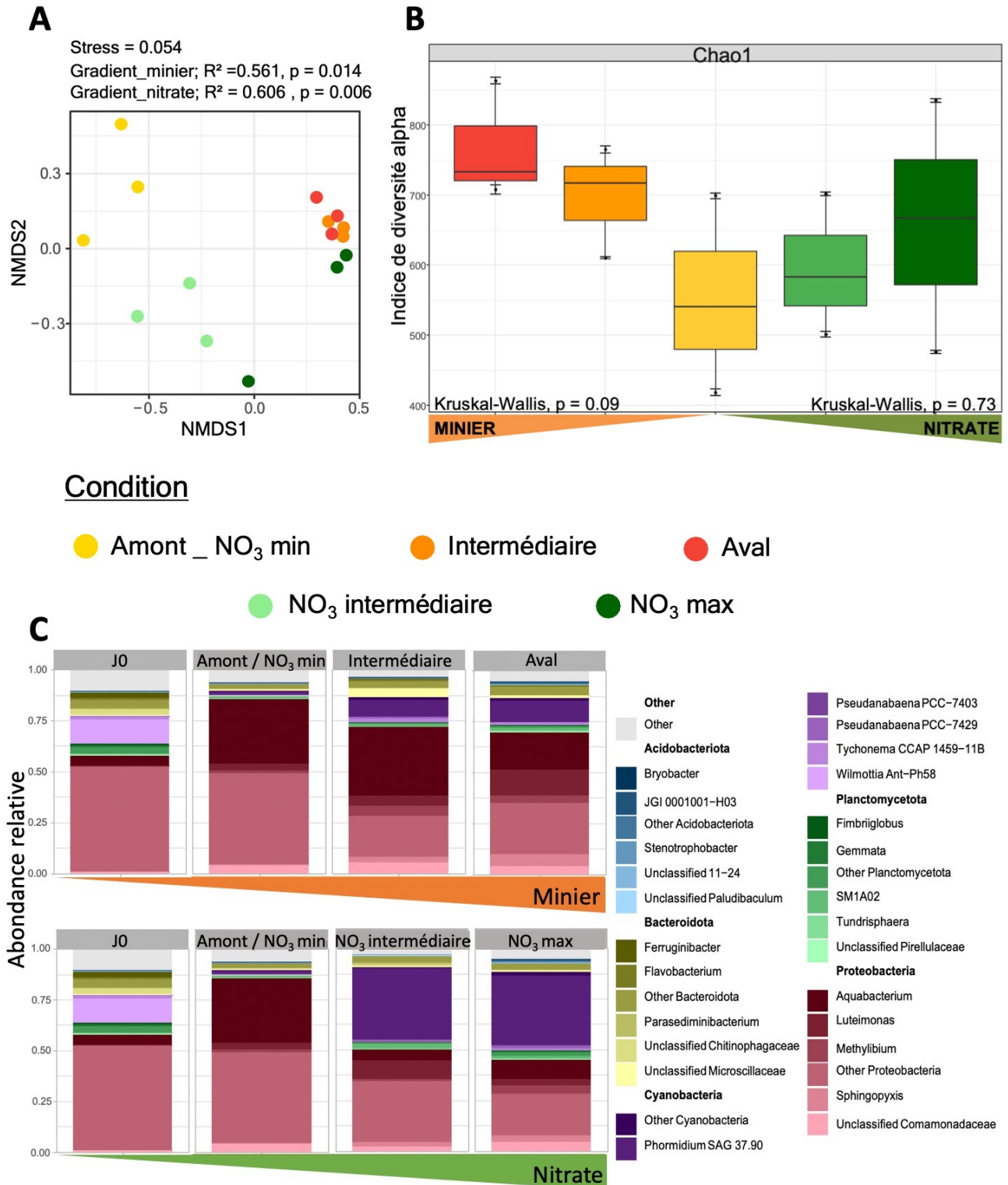


Figure 13 : NMDS des communautés procaryotes en fonction des deux gradients, basée sur une distance de Bray-Curtis. Les distances entre les points illustrent la similarité des communautés bactériennes entre les conditions. (A) Richesse spécifique des communautés procaryotes le long des deux gradients (Chao1) (B) Profils taxonomiques des communautés procaryotes à l'échelle du genre. Seuls les genres les plus abondants sont représentés. (C)

Tableau 7 : Analyse SIMPER des principaux taxons contribuant à la dissimilarité des communautés bactériennes le long des gradients minier (A) et de nitrate (B) Seuls les taxons ayant la plus forte contribution sont affichés.

A	Abondance (%)		Contribution (%)	P
	Amont / NO ₃ min	Aval		
<i>Aquabacterium</i>	33,81	18,74	9,20	0,54
<i>Luteimonas</i>	3,85	13,61	6,08	0,21
<i>Novosphingobium</i>	10,32	2,52	5,82	0,07
<i>Phormidium SAG 37.90</i>	1,90	11,32	5,61	0,98
<i>Sphingopyxis</i>	0,56	5,76	3,07	0,01
<i>Paucibacter</i>	5,60	0,59	3,04	0,24
<i>Rhizobacter</i>	0,77	4,05	1,94	0,05
<i>Cupriavidus</i>	2,62	0,05	1,51	0,01
<i>Reyranella</i>	3,93	1,80	1,37	0,11
<i>Methylibium</i>	2,00	4,16	1,33	0,7
<i>Dyella</i>	1,58	0,01	0,95	0,76

B	Abondance (%)		Contribution (%)	P
	Amont / NO ₃ min	NO ₃ max		
<i>Phormidium SAG 37.90</i>	1,90	37,14	20,61	0,01
<i>Aquabacterium</i>	33,81	9,08	14,73	0,07
<i>Novosphingobium</i>	10,32	1,08	5,71	0,17
<i>Paucibacter</i>	5,60	2,42	3,34	0,21
<i>Reyranella</i>	3,93	0,45	2,05	0,01
<i>Sphingopyxis</i>	0,56	3,80	1,88	0,28
<i>Luteimonas</i>	3,85	3,30	1,76	0,84

3.2.1.2 Composante eucaryote

L'analyse NMDS réalisée sur les données de 18S (stress = 0,165) montre quelques différences dans la composition des communautés eucaryotes entre les différentes conditions expérimentales pour les deux gradients testés (Figure 14A). La valeur du stress étant élevée, on note que la tendance n'est pas aussi robuste que pour les procaryotes. Les échantillons de la condition NO₃ min / Amont forment un groupe distinct des autres conditions, tant pour le gradient minier que pour le gradient de nitrate, montrant une composition spécifique à cet environnement. Pour le gradient minier, les différentes conditions sont différenciées et les communautés NO₃ min / Amont sont les plus dissimilaires. Le regroupement des échantillons plus serré des conditions NO₃ min /

Amont et Aval indique une composition eucaryote homogène, tandis que la dispersion des échantillons de la condition intermédiaire montre une hétérogénéité des communautés au sein de cette condition. La composition des communautés au sein du gradient de nitrate suggère un gradient de différenciation. Au sein de ce gradient, les communautés des conditions NO₃ intermédiaire et NO₃ max sont peu différenciées et présentent plus de similarité dans leur structure qu'avec celles de la condition NO₃ min / Amont. La PERMANOVA a révélé une différenciation significative des communautés eucaryotes des biofilms le long des deux gradients étudiés. L'effet du gradient minier est statistiquement plus marqué (Df = 2, F = 3,205, p = 0,004) que celui du gradient de nitrate (DF = 2, F = 3,399, p = 0,012). Bien que les deux gradients influencent la structuration des communautés, la plus faible valeur de p associée au gradient minier indique une séparation plus robuste des assemblages eucaryotes le long de cette perturbation, suggérant un effet plus fort des effluents miniers sur la composition des biofilms.

L'analyse de la richesse spécifique (indice Chao1) n'a pas révélé de différence significative entre les conditions le long des deux gradients étudiés (Figure 14B). Cependant, une augmentation du nitrate semble engendrer une tendance à la hausse de la richesse spécifique des communautés.

Le biofilm inoculé dans les mésocosmes présentait une communauté eucaryote diversifiée, rassemblant plusieurs phyla. Cette communauté était principalement dominée par des archaeplastida, notamment des *Chlorellales* et des *Sphaeropleales*, ainsi que des organismes *TSAR*, *Colpodea_X* et *Hypotrichia* (Figure 14C). Le long du gradient minier, le biofilm soumis à la condition amont était dominé par des organismes *TSAR*, particulièrement des *Peritrichia_2* et en moindre abondance relative des *Naviculales*. Lorsque soumis à la condition intermédiaire de ce gradient, le biofilm s'est restructuré avec un développement du phylum obazoa et notamment de *Rozellomycota_X*. Le groupe *TSAR* était toujours représenté, toutefois cette condition a permis un développement accru des *Naviculales* au détriment de *Peritrichia_2*. Les conditions aval du gradient minier ont stimulé d'avantage le développement de *Naviculales* qui dominent la communauté. Les organismes *TSAR* et *Cymbellales* ont également été stimulés par rapport aux autres conditions du gradient. *Rozellomycota_X* a présenté une abondance relative plus élevée qu'en cas d'exposition à l'amont mais moins importante que face aux conditions intermédiaires.

Des concentrations accrues de nitrate dans le milieu d'exposition, comme observé le long du gradient de nitrate, entraînent des modifications de la dominance au sein des communautés eucaryotes du biofilm. Ainsi, la condition NO₃ intermédiaire est dominée par des *Naviculales* et le développement de *Peritrichia_2*, principal organisme de la condition NO₃ min y est limité. Cette

concentration en nitrate permet également l'apparition de *Cymbellales*. Une augmentation plus importante de nitrate telle que dans la condition NO₃ max entraine une communauté majoritairement composée d'organismes TSAR (un groupe spécifique de protistes : Telonemia, Stramenopila, Alveolata, et Rhizaria), tels que *Naviculales* et *Hypotruchia*. Un autre organisme, *Rozellomycota_X*, est également présent au sein de cette communauté.

L'analyse SIMPER réalisée sur les données a permis d'identifier pour les deux gradients les organismes contribuant le plus aux dissimilarités dans la composition des communautés (Tableau 8). Les communautés du gradient minier NO₃ min / Amont et Aval sont principalement différenciées par des organismes TSAR, avec une diminution de l'abondance relative de *Peritrichia_2* et une augmentation de *Naviculales* dans l'aval, représentant respectivement 32,7 % et 22,3 % de la dissimilarité totale. Le long du gradient de nitrate, les différences observées entre les conditions NO₃ min / Amont et NO₃ max sont expliquées par une diminution de *Peritrichia_2*, ainsi qu'une augmentation de *Naviculales* et l'obazoa *Rozellomycota_X*, contribuant respectivement à 32,7 %, 13,6 % et 10,9 % de la dissimilarité.

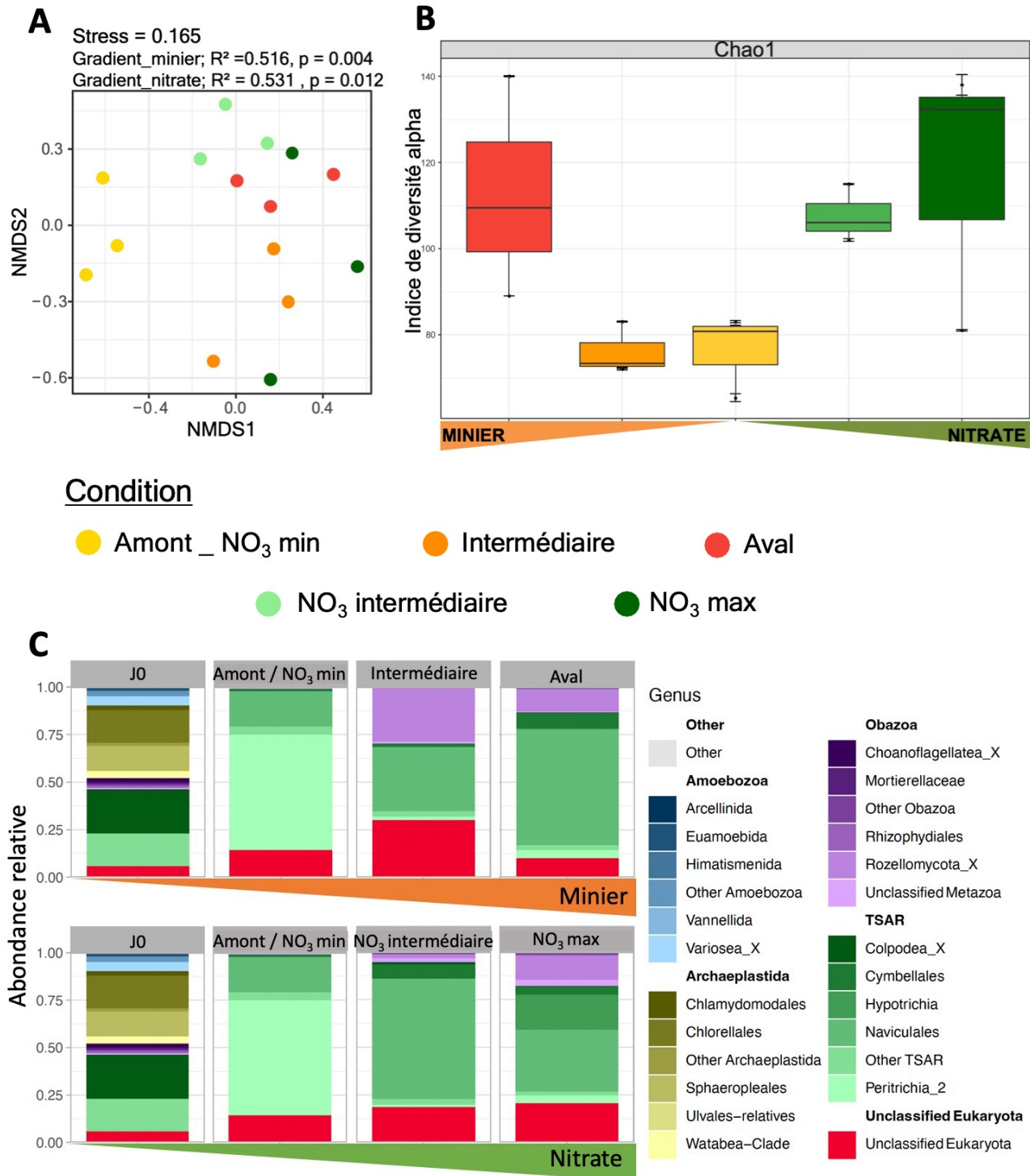


Figure 14 : NMDS des communautés eucaryotes en fonction des deux gradients, basée sur une distance de Bray-Curtis. Les distances entre les points illustrent la similarité des communautés eucaryotes entre les conditions (A) Richesse spécifique des communautés eucaryotes le long des deux gradients (Chao1) (B) Profils taxonomiques des communautés eucaryotes à l'échelle du genre. Seuls les genres les plus abondants sont représentés. (C)

Tableau 8 : Analyse SIMPER des principaux taxons contribuant à la dissimilarité des communautés eucaryotes le long des gradients minier (A) et de nitrate (B) Seuls les principaux contributeurs à la dissimilarité sont illustrés.

A	Abondance (%)		Contribution (%)	P
	Amont / NO ₃ min	Aval		
<i>Peritrichia_2</i>	69,84	4,51	32,67	**
<i>Naviculales</i>	25,8	70,45	22,33	

B	Abondance (%)		Contribution (%)	P
	Amont / NO ₃ min	NO3 max		
<i>Peritrichia_2</i>	69,84	4,45	32,69	**
<i>Naviculales</i>	25,8	46,06	13,6	
<i>Rozellomycota_X</i>	0,34	22,05	10,86	

3.2.1.3 Composante fongique

La NMDS réalisée sur les communautés fongiques (stress = 0,053) permet d'observer une différenciation selon les conditions expérimentales des deux gradients étudiés (Figure 15A). La PERMANOVA indique une structuration significative des communautés fongiques le long du gradient minier (Df = 2, F = 5,570, p = 0,008). Pour le gradient de nitrate, bien que la PERMANOVA indique une tendance à la différenciation, l'effet n'est pas statistiquement significatif (Df = 2, F = 3,345, p = 0,09). La condition NO₃ min / Amont présente la plus faible dispersion des échantillons, suggérant une plus grande homogénéité des communautés fongiques dans cet environnement. En revanche, les autres conditions montrent une variabilité plus marquée, reflétant une structuration plus hétérogène des communautés fongiques sous l'effet des gradients environnementaux.

L'analyse de la diversité alpha (indice Chao1) n'a pas permis de mettre en évidence de différences significatives entre les conditions que ce soit pour le gradient minier (p = 0,066) ou le gradient de nitrate (p = 0,11) (Figure 15B). Toutefois, une tendance à une augmentation de la richesse spécifique est observée dans les conditions intermédiaires et maximales des deux gradients. Cette tendance suggère un effet potentiel des apports en nutriments et des effluents miniers sur la diversité fongique, bien que ces variations ne soient pas statistiquement confirmées.

L'inoculum de biofilm au début des expériences présente une communauté dominée par des ascomycètes dont l'un des genres identifiés est *Fusicolla*. Des basidiomycètes sont également

présents au sein de la communauté fongique (Figure 15C). Après 30 jours d'exposition aux gradients minier et de nitrate, les communautés se sont restructurées, évoluant de façon similaire pour les deux gradients. L'exposition à la condition Amont / NO₃ min présentant la concentration en nitrate la plus faible permet le développement de mortierellomycota et plus particulièrement de *Mortierella* qui domine la communauté. Toutefois, le développement de cet organisme est limité graduellement le long des deux gradients par rapport à la condition la plus faible. Ces conditions permettent le développement de basidiomycètes, de l'ascomycète *Cladosporium* et du chytridiomycète *Betamyces*.

L'analyse SIMPER menée a mis en évidence la contribution principale aux dissimilarités de composition des communautés d'un seul et même organisme pour les deux gradients expérimentaux (Tableau 9). En effet, l'organisme *Mortierella* voit son abondance relative diminuée dans les conditions maximales des deux gradients, contribuant à 69,9 % de la dissimilarité le long du gradient minier et à 56,2 % pour le gradient de nitrate.

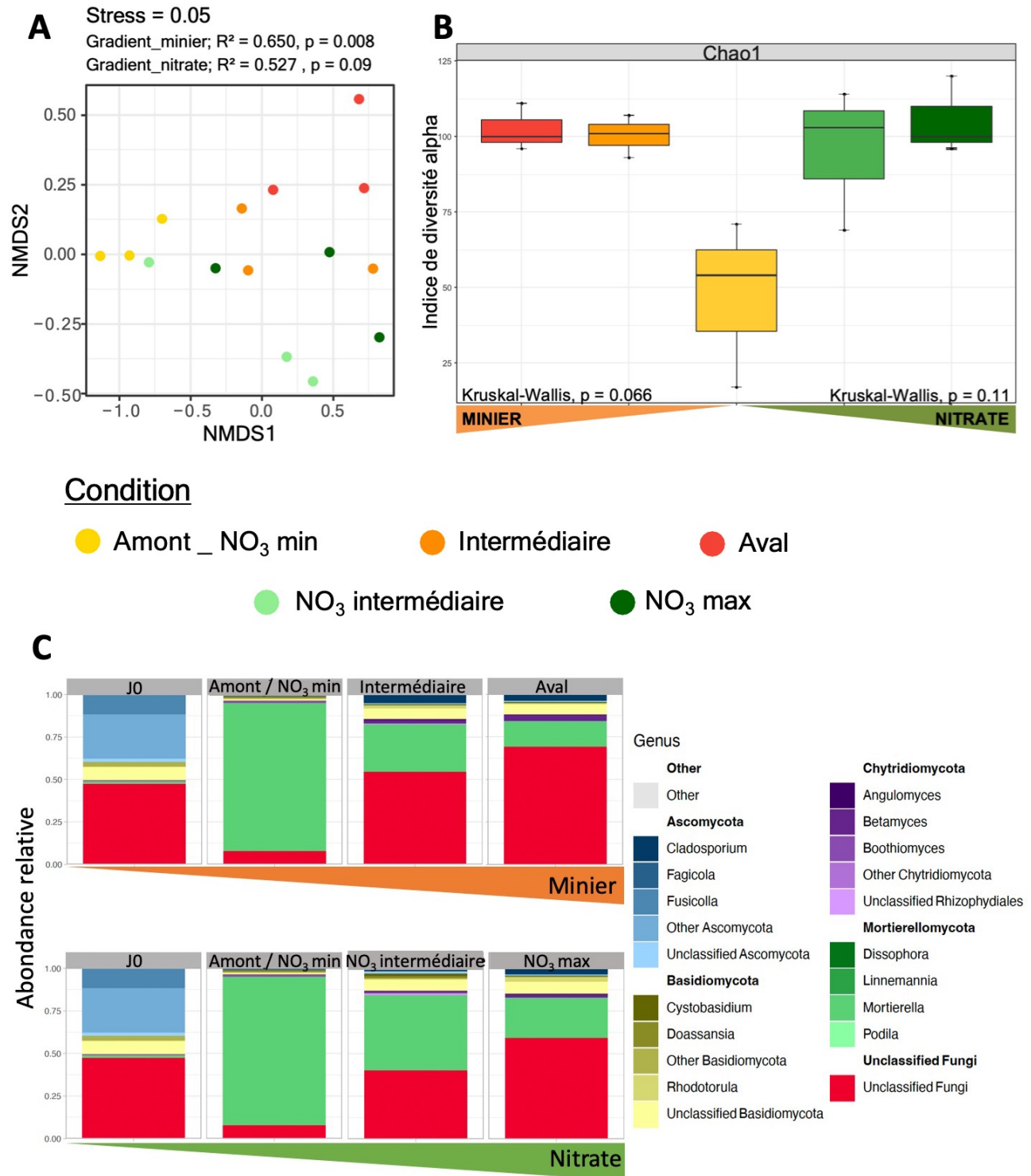


Figure 15 : NMDS des communautés fongiques en fonction des deux gradients, basée sur une distance de Bray-Curtis. Les distances entre les points illustrent la similarité des communautés fongiques entre les conditions (A) Richesse spécifique des communautés fongiques le long des deux gradients (Chao1) (B) Profils taxonomiques des communautés fongiques à l'échelle du genre. Seuls les genres les plus abondants sont représentés (C)

Tableau 9 : Analyse SIMPER des principaux taxons contribuant à la dissimilarité des communautés fongiques le long des gradients minier (A) et de nitrate (B). Seuls les principaux contributeurs à la dissimilarité sont illustrés

A	Abondance (%)		Contribution (%)	P
	Amont / NO ₃ min	Aval		
<i>Mortierella</i>	85,67	10,69	69,91	*

B	Abondance (%)		Contribution (%)	P
	Amont / NO ₃ min	NO ₃ max		
<i>Mortierella</i>	85,67	22,43	56,17	

3.2.2 Analyse des profils lipidiques

3.2.2.1 Gradient minier

L'effet du nitrate sur la qualité nutritionnelle des biofilms a été étudiée à travers des analyses en composante principale (ACP) réalisées sur les deux gradients établis. L'analyse du gradient minier a montré une différenciation de la composition en acides gras des biofilms selon les conditions environnementales (Figure 16A). En effet, la PERMANOVA réalisées sur les données a mis en évidence un effet significatif du gradient minier sur la composition du biofilm (Df = 2, F = 20,195, p = 0,001), expliquant 64,7 % de la variance observée. Le test post-hoc effectué a montré des différences significatives similaires entre toutes les conditions du gradient (p = 0,003). Les conditions NO₃ min / Amont et intermédiaire présentaient les différences les plus marquées. Le biofilm de la condition NO₃ min / Amont se caractérise par une prédominance d'acides gras saturés, spécifiquement les C15, C17, et C18, connus comme marqueurs bactériens. De plus, la présence de l'acide gras monoinsaturé C18:1n9, identifié comme marqueur des champignons, contribue également à la différenciation de cette condition par rapport aux deux autres (Figure 16B). Les conditions intermédiaire et aval révèlent une différenciation, s'organisant selon un gradient de composition en acides gras. Ainsi, de l'aval vers l'intermédiaire, un enrichissement en acides gras polyinsaturés peut être observé. Les principaux acides gras responsables de cette différenciation sont des marqueurs des algues non-diatomées C18:4n3 et C18:3n3, ainsi que le marqueur des diatomées C20:5n3. Un autre marqueur des diatomées, un acide gras monoinsaturé (C16:1n7) contribue également.

L'analyse des proportions des principaux types d'acides gras au sein des conditions du gradient minier reflète les résultats obtenus avec l'ACP. Des proportions élevées en PUFA sont observables dans les conditions aval et intermédiaire. Ces PUFA sont attribuables à la présence d'algues et de diatomées et indiquent une meilleure qualité nutritionnelle des biofilms comparée à celle du biofilm de la condition NO_3 min / Amont, dominée par les SFA (figure 17). Les analyses statistiques n'ont pas révélé de différence significative dans la proportion de MUFA entre les conditions le long du gradient minier. Toutefois, des différences significatives ont été observées pour les SFA (Kruskal-Wallis, $p < 0,001$) et PUFA (Kruskal-Wallis, $p < 0,001$). Un test post-hoc de Dunn a permis de mettre en évidence ces différences significatives. Les SFA sont significativement plus élevés dans la condition Amont / NO_3 min par rapport aux conditions intermédiaire ($p < 0,001$) et aval ($p < 0,05$), et une différence significative est également relevée entre les conditions intermédiaire et l'aval ($p < 0,05$). Les PUFA sont significativement plus élevés dans la condition intermédiaire par rapport à l'amont / NO_3 min ($p < 0,001$) et l'aval ($p < 0,05$), toutefois l'aval présente des proportions de PUFA significativement plus élevées que dans l'Amont / NO_3 min ($p < 0,05$).

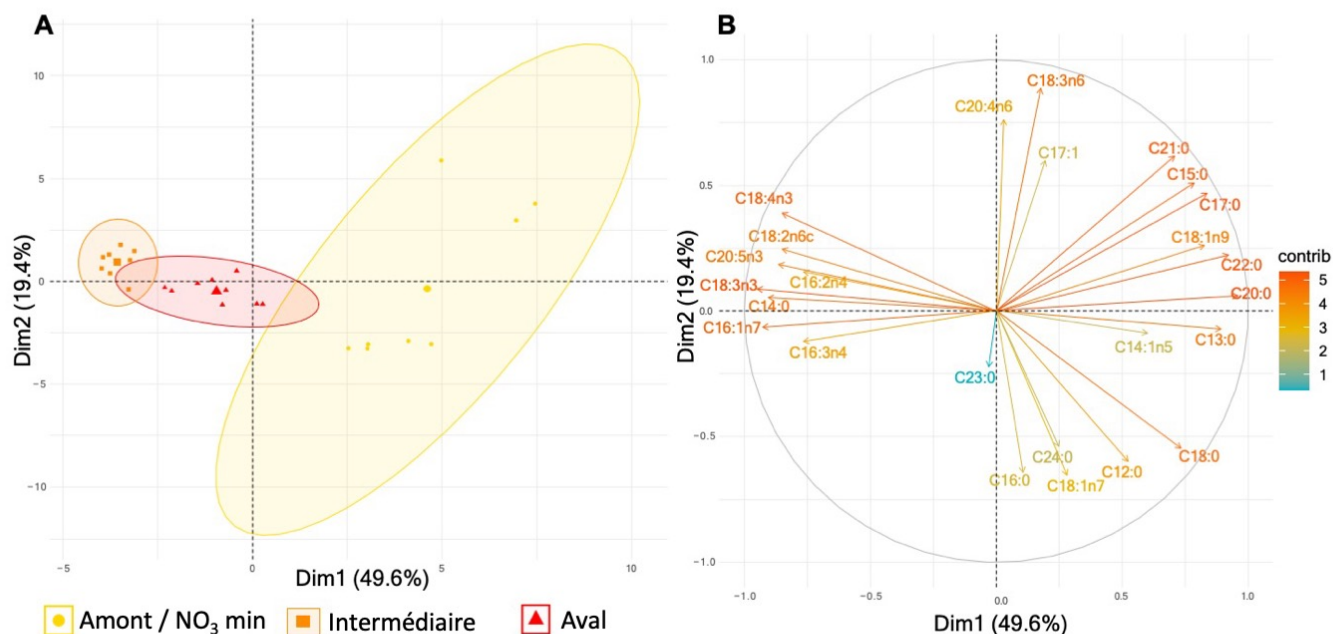


Figure 16 : Analyse en Composantes Principales réalisées sur les données d'acides gras des biofilms exposés au gradient minier qui a permis d'expliquer 69 % de la variance de la composition des assemblages de biofilm. Projection des observations par condition d'exposition (A) Projection des variables sur l'axe 1 et 2 de l'ACP

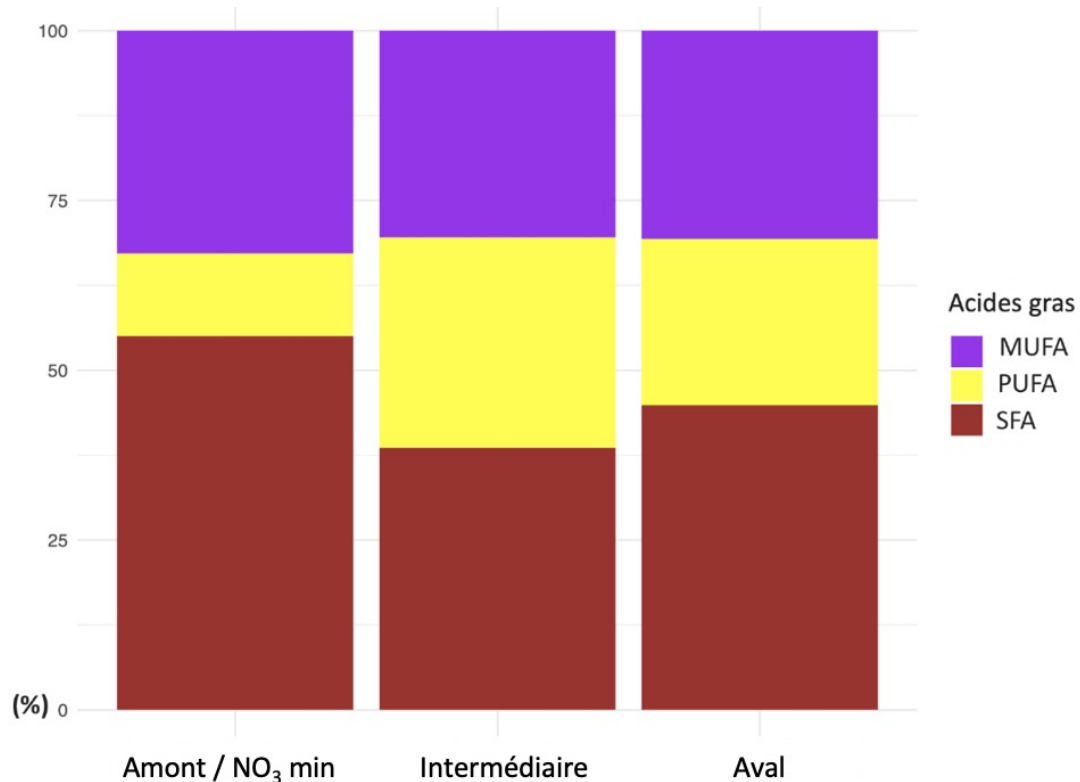


Figure 17 : Répartition des principaux groupes d'acides gras le long du gradient minier (en %)

3.2.2.2 Gradient de nitrate

L'analyse en composante principale réalisée sur le gradient de nitrate a révélé une nette différenciation de la condition NO₃ min / Amont par rapport aux conditions NO₃ intermédiaire et NO₃ max (Figure 18), ces deux dernières conditions étant peu différenciées entre elles. Une PERMANOVA a été menée sur les données du gradient de nitrate et a révélé un effet significatif de la concentration en nitrate sur la composition en acides gras des biofilms (Df = 2, F = 29,438, p = 0,001). Le test post-hoc a mis en évidence des différences significatives le long du gradient entre l'Amont / NO₃ min et NO₃ intermédiaire (p = 0,003) et Amont / NO₃ min avec NO₃ max (p = 0,003). Les conditions NO₃ intermédiaire et NO₃ max présentent également une différence significative (p = 0,005). Ainsi, la condition NO₃ min / Amont se caractérise par sa composition en acides gras marqueurs des bactéries tels que C15, C17 et C18. *A contrario*, les conditions NO₃ intermédiaire et NO₃ max se caractérise par des marqueurs des algues et des diatomées, notamment C16:1n7, C18:3n3, C18:4n3 et C20:5n3.

La qualité nutritionnelle des biofilms le long du gradient de nitrate a été étudiée en regardant la proportion des principales catégories d'acides gras présentes au sein des conditions (Figure 19). Cette analyse montre une augmentation des PUFA le long du gradient de nitrate. Ainsi, une augmentation du nitrate entraîne une hausse de la qualité nutritionnelle des biofilms en termes de composition lipidique. Des différences significatives ont été observées pour les SFA (Kruskal-Wallis, $p < 0,001$), MUFA (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) et PUFA (Kruskal-Wallis, $p < 0,001$). Un test post-hoc de Dunn a permis de mettre en évidence ces différences significatives. Les SFA sont significativement plus élevés dans la condition Amont / NO_3 min par rapport aux conditions NO_3 intermédiaire ($p < 0,001$) et NO_3 max ($p < 0,05$), aucune différence significative n'a été observée entre les conditions NO_3 intermédiaire et NO_3 max. Les PUFA sont significativement plus élevés dans la condition NO_3 max par rapport à l'amont / NO_3 min ($p < 0,001$) et NO_3 intermédiaire ($p < 0,05$). La proportion de PUFA dans la condition NO_3 intermédiaire est également significativement plus élevée que dans la condition Amont / NO_3 min ($p < 0,05$). Les MUFA ont révélé une différence significative seulement entre les conditions Amont / NO_3 min, où ils sont plus élevés par rapport à la condition NO_3 max ($p < 0,05$).

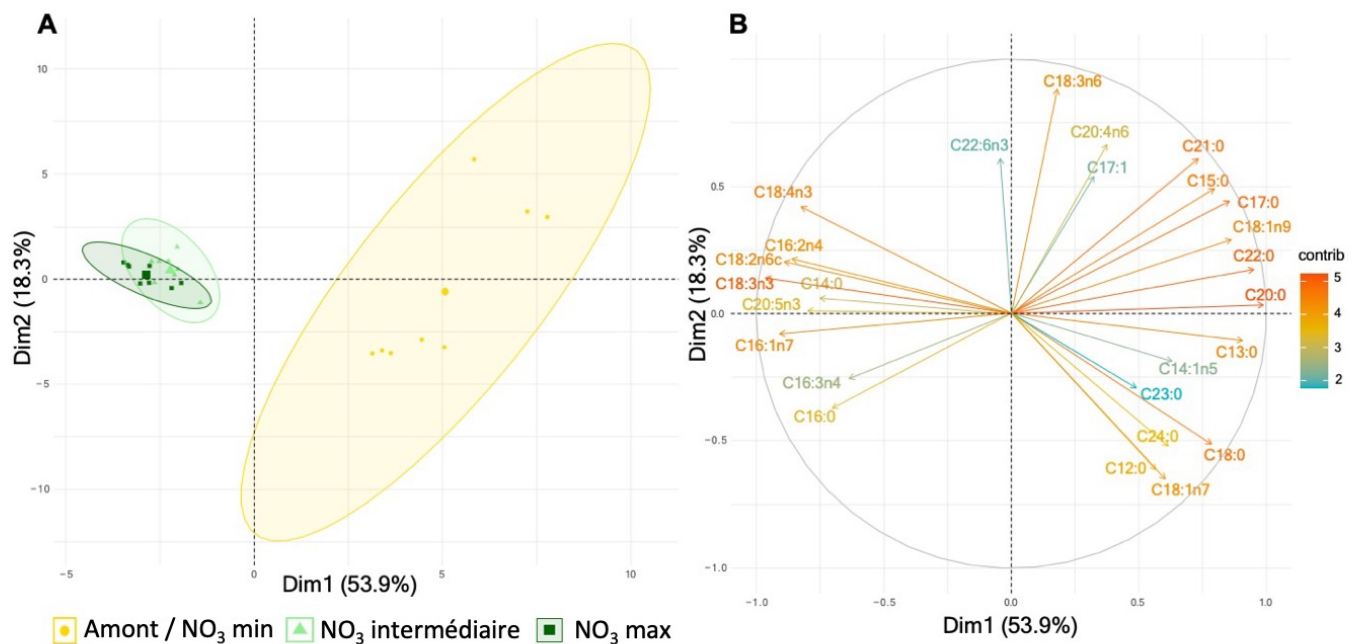


Figure 18 : Analyse en Composantes Principales réalisées sur les données d'acides gras des biofilms exposés au gradient de nitrate qui a permis d'expliquer 72,2 % de la variance de la composition des assemblages de biofilm. Projection des observations par condition d'exposition (A) Projection des variables sur l'axe 1 et 2 de l'ACP (B)

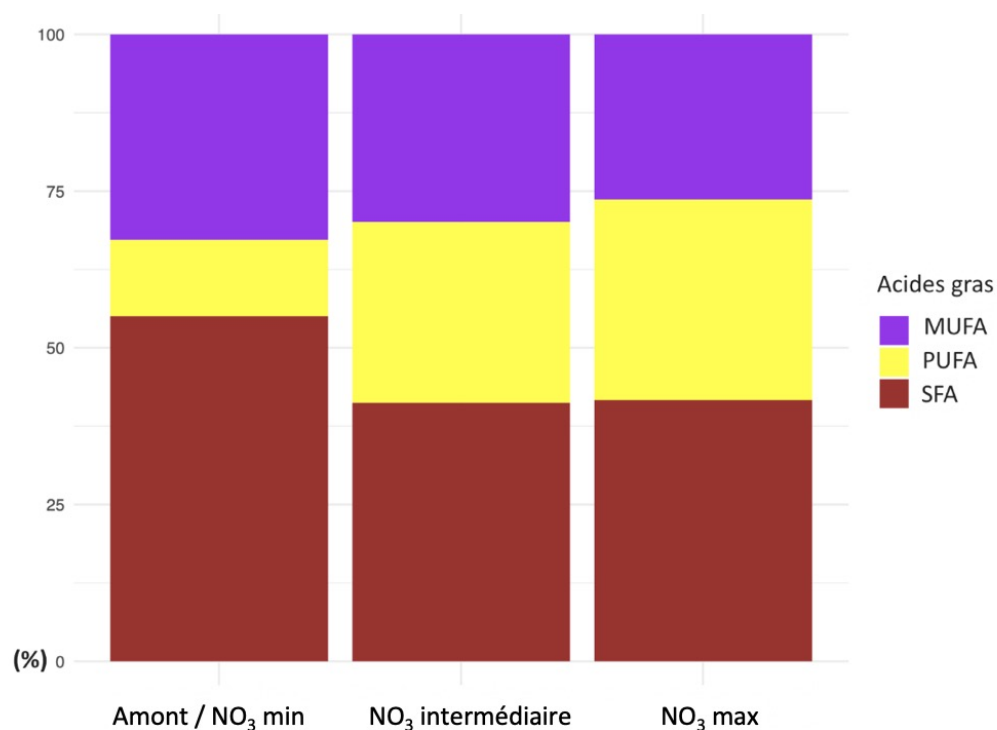


Figure 19 : Répartition des principaux groupes d'acides gras le long du gradient de nitrate (en %)

3.3 Discussion

3.3.1 Restructuration des communautés de biofilm en réponse à un gradient chimique

Les résultats de cette étude ont mis en évidence une restructuration des communautés périphytiques le long du gradient d'exposition mimant l'influence des effluents miniers en conditions contrôlées. Le gradient minier affecte les diversités bactériennes, eucaryotes et fongiques des biofilms. La richesse spécifique bactérienne montre une augmentation progressive le long du gradient, celle des champignons présente une augmentation similaire entre les conditions intermédiaire et maximale, tandis que celle des eucaryotes est plus importante dans la condition maximale. Ces résultats suggèrent une plus grande diversité bactérienne, eucaryote et fongique au sein du biofilm, y compris des espèces rares, en présence de concentrations plus élevées de nutriments (NO_3^- , Si, K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , SO_4^{2-} , Na^+). Cette diversité plus importante montre une réponse adaptative face aux variations environnementales engendrées par le gradient de nutriments. En effet, une augmentation de la richesse peut accroître la probabilité d'inclure

plusieurs espèces partageant des traits fonctionnels similaires, contribuant indirectement à la redondance fonctionnelle et à la résilience des écosystèmes. Ainsi, différents groupes fonctionnels au sein du biofilm peuvent remplir des rôles écologiques similaires, garantissant la stabilité des fonctions, même en cas de perturbations (Zeglin 2015).

De plus, il est établi qu'une augmentation de la diversité en milieu riche en nutriments tels que les conditions intermédiaire et aval ne constitue pas un phénomène isolé. De nombreuses études ont mis en évidence qu'un environnement plus riche en ressources favorise la diversification des communautés de microorganismes, en termes de richesse spécifique, mais également en termes de diversité fonctionnelles, ce qui permet aux biofilms de mieux répondre aux stress environnementaux (Lawes et al. 2016, Hoellein. 2011). Cependant, des conditions de faibles concentrations en nutriments (condition amont), bien que moins diversifiées, peuvent également être "stressantes" pour les communautés, en opérant des pressions sélectives qui favorisent les espèces les mieux adaptées à la rareté des ressources (Seballos et al. 2020, Philippot et al. 2021). Cette dynamique peut expliquer que les communautés exposées à une disponibilité plus limitée en nutriments se composent d'espèces spécifiques et potentiellement plus résilientes, capables de résister à de fortes compétitions pour l'accès aux ressources (Romero et al. 2020). Ainsi, la diversité n'est pas nécessairement faible, mais bien adaptée aux conditions extrêmes.

La composition chimique du milieu affecte la structure des communautés bactériennes. Les protéobactéries dominent les communautés le long du gradient de nutriments, toutefois, les genres observés diffèrent selon la concentration dans le milieu. Ainsi, les conditions amont et intermédiaire sont dominées par la β protéobactérie du genre *Aquabacterium*, une bactérie abondante dans les biofilms des systèmes d'eau potable (Kalmbach et al. 1999). Ce genre bactérien est capable d'utiliser l'oxygène et le nitrate comme accepteur d'électron montrant un métabolisme flexible (Kalmbach et al. 2000). Ainsi, dans un milieu pauvre en nutriments où la compétition pour les ressources est forte, la capacité d'*Aquabacterium* à utiliser l'oxygène lui permet de prospérer en milieu oligotrophe (Kalmbach et al. 1999). Bien que certains de ces organismes soient capables d'utiliser le nitrate en absence d'oxygène, la respiration aérobie est privilégiée en milieu oxygéné. La flexibilité métabolique d'*Aquabacterium* lui permettent d'être compétitif dans des milieux présentant des niveaux de nutriments variables (Chen et al. 2021). Dans un milieu enrichi en nutriments, tel que l'aval, les γ protéobactéries du genre *Luteimonas* prolifèrent. Le métabolisme de ces organismes peut expliquer leur développement ; ces derniers utilisent la respiration aérobie mais peuvent également utiliser le nitrate, lui conférant un avantage compétitif lorsque les nutriments sont abondants dans le milieu. De plus, *Luteimonas* est capable

d'utiliser une large gamme de composés organiques comme source de carbone et d'énergie, lui permettant de proliférer (Lipski et Stackebrandt 2015). Ces organismes sont donc compétitifs métaboliquement, mais sont également capable de synthétiser des enzymes hydrolytiques et métabolites secondaires inhibant la croissance des bactéries utilisant les mêmes ressources (Lipski et Stackebrandt 2015).

La dominance de bêta et gamma protéobactéries au sein des biofilms est en adéquation avec la littérature scientifique. En effet, ces bactéries ont été identifiées comme étant généralement les plus abondantes dans les cours d'eau et dans les biofilms (Araya et al. 2003 ; Gao et al. 2005). Des études précédentes ont également mis en évidence une augmentation de ces protéobactéries dans des milieux présentant des concentrations élevées en carbone organique dissous, en nitrate-nitrite et en matière organique, avec leur rôle dans la dénitrification (Gao et al. 2005, Rubin et al. 2007). Le gradient de nutriments a également affecté les cyanobactéries en favorisant le développement du genre *Phormidium* SAG 37.90. Le genre *Phormidium* est associé à des milieux riches en azote organique ou en ammonium, et tolère des niveaux faibles de phosphore (Zhang et al. 2021). Cependant, ces formes d'azote n'étaient pas présentes initialement dans le milieu. Leur potentielle présence (ces formes d'azote n'ont pas été dosées dans cette étude) résulterait donc principalement des processus de recyclage des nutriments. Les protéobactéries, notamment, jouent un rôle clé en dégradant la matière organique produite par les cyanobactéries, libérant ainsi de l'ammonium et du phosphate qui sont ensuite disponibles pour les cyanobactéries, favorisant leur prolifération (Paerl et Otten 2013). Ce mécanisme illustre l'interdépendance entre les différents groupes bactériens au sein du biofilm.

Les communautés eucaryotes présentent également un remaniement en réponse à un gradient de nutriments. En présence de faibles concentrations en nutriments le genre *Peritrichia* domine la communauté. Des études ont mis en évidence la capacité de ciliés sessiles à survivre dans des environnements pauvres en nutriments, notamment grâce à leur alimentation basée sur les bactéries hétérotrophes (Moreno et al. 2010, Safi et al. 2014). La présence abondante d'*Aquabacterium* dans de tels milieux peut favoriser leur développement. Toutefois, lorsque la disponibilité en nutriments augmente et que la biomasse algale s'intensifie, cette niche écologique évolue. Les *Peritrichia* deviennent moins compétitifs au profit d'organismes adaptés à des conditions eutrophes. De plus, *Rozellomycota*, des parasites opportunistes proliférant dans des milieux riches en matière organique, peuvent se développer davantage dans un contexte d'augmentation de la biomasse algale et bactérienne, leur fournissant une source accrue d'hôtes et de substrat pour compléter leur cycle parasitaire (Grossart et al. 2019).

La réponse des communautés fongiques au gradient de nutriments tendant vers une baisse de l'abondance relative du genre *Mortierella* est semblable à celle observée dans la littérature scientifique. Ces organismes sont des champignons saprotrophes fréquemment associés à des environnements aquatiques oligotrophes à mésotrophes, où la compétition pour les ressources est modérée (Grossart et al. 2019). L'étude menée par Cudowski et al. (2015) confirme également l'association de ces organismes dans de tels environnements en montrant que *Mortierella* se développe dans des canaux présentant de faibles niveaux de phosphore et d'azote. Une augmentation des nutriments dans le milieu stimule la prolifération de bactéries et cyanobactéries modifiant la composition du biofilm en favorisant des organismes opportunistes capables d'utiliser les nutriments supplémentaires. Une étude a montré que des champignons saprotrophes exposés à un enrichissement chronique en azote perdent leur capacité à décomposer efficacement la matière organique, limitant ainsi leur développement (Van Diemen et al. 2017). Le genre *Mortierella* ne peut donc être compétitif dans des environnements riches en nutriments. *A contrario*, le genre *Cladosporium* présente des capacités accrues à proliférer dans des milieux riches en nutriments en métabolisant des composés organiques complexes issus de la biomasse bactérienne et/ou algale (Liu et al. 2024). L'augmentation de la proportion ce genre de champignon le long du gradient de nutriments n'est donc pas surprenant dans notre étude. De plus, Siriarchawatana et al. (2024) ont démontré la prolifération de *Cladosporium* dans des rivières affectées par des apports importants en azote et phosphore, appuyant sa tolérance aux environnements eutrophes.

3.3.2 Contribution spécifique du nitrate

Dans cette étude, l'augmentation des concentrations de nitrate a stimulé la prolifération de cyanobactéries du genre *Phormidium*. Une réponse similaire a été observée dans le gradient minier, suggérant que le nitrate – bien qu'associé à d'autres composés chimiques – constitue un facteur structurant majeur. Cette convergence des réponses biologiques entre les deux gradients, malgré des contextes physico-chimiques différents, indique que *Phormidium* est particulièrement sensible à la disponibilité en nitrate, et que certains organismes du biofilm peuvent réagir de manière comparable même dans des environnements perturbés. Ces résultats coïncident avec les travaux de McAllister et al. (2016) qui ont montré que des apports élevés en nitrate, en particulier associés à de faibles concentrations en phosphore, favorisent la prolifération de *Phormidium* dans les écosystèmes aquatiques. En conditions de limitation en phosphore, *Phormidium* est capable de stocker et de recycler efficacement ce nutriment à partir de sa

biomasse (Loza et al. 2014). Certaines cyanobactéries, dont *Phormidium*, privilégient l'utilisation du nitrate par rapport à d'autres sources d'azote telles que l'ammonium ou l'azote organique. En présence de fortes concentrations en nitrate, elles peuvent ainsi augmenter leur taux de croissance et devenir plus compétitives, leur permettant de dominer les communautés microbiennes (Loza et al. 2014). Cependant, bien que certaines cyanobactéries puissent fixer l'azote atmosphérique, *Phormidium* ne semble pas posséder cette capacité. Sa préférence pour le nitrate peut donc expliquer sa forte croissance dans les milieux enrichis en azote, ce qui lui permet de surpasser d'autres organismes autotrophes dans un environnement compétitif (Heath et al. 2016). Cette dominance peut être renforcée par la capacité des biofilms cyanobactériens à modifier leur microenvironnement, en libérant des composés organiques ou en altérant les gradients chimiques locaux (oxygène, pH). Ils influencent la disponibilité et l'accessibilité des nutriments pour d'autres espèces microbiennes, ce qui leur permet de renforcer leur position dominante dans la communauté (Grossart et al. 2019). D'autre part, ce genre sécrète des exopolysaccharides lui permettant d'adhérer aux substrats et de former des biofilms denses. Ces structures offrent une protection contre le stress environnemental tout en optimisant l'absorption des nutriments, l'azote stimulant l'activité enzymatique impliquée dans leur assimilation (Artigas et al. 2015, Canning et Death 2021). Ainsi, un apport excessif en nitrate favorise la croissance des organismes autotrophes au détriment des bactéries hétérotrophes. De plus, les proliférations de *Phormidium* sont souvent associées à une synthèse de toxines (anatoxine-a, homoanatoxine-a), leur permettant de limiter la compétition avec les autres organismes (McAllister et al. 2016, Zhang et al. 2021) ainsi que le broutage par les consommateurs (Fiałkowska et al. 2014).

Notre étude a également révélé une augmentation de l'abondance relative des *Naviculales* et des *Hypotrachia*, au détriment des *Peritrichia*, ainsi qu'une hausse de *Rozellomycota* et une diminution de *Mortierella*. Les changements dans la disponibilité des nutriments, la compétition interspécifiques et les interactions trophiques peuvent expliquer ces dynamiques. Cette dynamique est comparable à celle observée dans le gradient minier, où les *Naviculales* augmentent également, ce qui suggère que certaines diatomées profitent de l'enrichissement en nutriment, particulièrement en nitrate. La littérature a mis en évidence que certaines diatomées, notamment certaines espèces appartenant à l'ordre des *Naviculales*, ont la capacité de prospérer dans des milieux oligotrophes où le phosphore est limitant, en présence d'azote (Potapova et Charles 2003). De plus, plusieurs groupes d'organismes aquatiques, y compris les diatomées présentent des mécanismes de stockage intracellulaire du phosphore. *A contrario*, les *Hypotrachia* n'augmentent que dans le gradient de nitrate, indiquant que leur développement est limité par

d'autres facteurs présents dans le gradient minier. En effet, les ciliés *Hypotrichia*, des protistes hétérotrophes adaptés à des environnements riches en matière organique et en nitrate (Beaver et Crisman 1989) se développent au détriment de *Peritrichia*, observé dans le milieu pauvre en nitrate. Contrairement aux *Peritrichia*, associés à des milieux stables et oligotrophes, les *Hypotrichia* présentent une tolérance aux variations de nutriments (Li et al. 2008). En stimulant la production de matière organique par les algues et bactéries autotrophes, les apports en nitrate peuvent favoriser le développement des *Hypotrichia*, en augmentant la disponibilité des proies (Canning et Death 2021). Les *Peritrichia* semblent donc défavorisés par les changements trophiques opérés et sont remplacés par les *Hypotrichia*, plus opportunistes. Les *Rozellomycota*, souvent identifiés comme des parasites d'autres microorganismes (Grossart et al. 2019) pourraient voir leur abondance augmentée dans les milieux riches en nitrate en réponse à la prolifération de *Naviculales* et *Hypotrichia*, qui représentent des hôtes potentiels pour ces organismes. Une modification des conditions trophiques au sein des biofilms, telle qu'une disponibilité accrue en matière organique dissoute, pourrait expliquer leur développement (Canning et Death 2021). *A contrario*, une hausse du nitrate dans l'environnement marque un déclin des *Mortierella*, un champignon saprotrophe impliqué dans la décomposition de la matière organique. Stevenson (2014) a mis en évidence qu'un excès d'azote dans le milieu affecte l'équilibre entre les décomposeurs et les producteurs primaires, par une réduction de la disponibilité en substrats organiques complexes utilisés par *Mortierella*. D'autre part, la croissance des diatomées et cyanobactéries libère de la matière organique exploitée plus efficacement par les bactéries hétérotrophes (Canning et Death 2021). Ainsi, la compétition avec ces bactéries pourrait expliquer la diminution de *Mortierella*. Cette réponse négative est également présente dans le gradient minier, renforçant un effet inhibiteur du nitrate sur la prolifération des champignons saprotrophes, quel que soit la complexité du milieu.

L'analyse des biofilms en réponse aux deux gradients reflète des dynamiques distinctes mais interconnectées, où le nitrate joue un rôle structurant majeur sur les communautés benthiques. Dans son ensemble, le gradient minier semble fortement dirigé par la concentration en nitrate dans le milieu, démontrant que ce composé est central dans la structuration des communautés, le rendant potentiellement plus important que d'autres facteurs physico-chimiques associés aux effluents miniers. De plus, malgré des contextes environnementaux différents, certaines trajectoires de réponses présentent des similarités pour certains groupes spécifiques d'organismes. Une réponse convergente est observée pour les *Naviculales* et les *Hypotrichia* notamment, bien que les conditions du milieu diffèrent entre les deux gradients. Cela suggère des

mécanismes d'adaptation permettant aux communautés de s'organiser en fonction de la disponibilité en nitrate afin d'optimiser leur résistance aux perturbations. Cependant, une variabilité persiste entre les deux gradients indiquant que l'influence du nitrate ne peut être interprétée de manière isolée. Cette dernière interagit avec d'autres facteurs liés aux activités minières, modulant ainsi la dynamique des communautés benthiques de façon complexe.

3.3.3 Influence du nitrate sur la qualité nutritionnelle du biofilm

La structure et la valeur nutritionnelle des biofilms pour les consommateurs primaires dans les écosystèmes aquatiques est influencée, entre autres, par l'enrichissement en nutriments (Hill et al. 2011). Les résultats de cette étude indiquent une augmentation marquée des acides gras polyinsaturés en réponse à un apport de nutriments, et plus particulièrement lors d'un enrichissement en nitrate. Dans ce contexte, la dynamique lipidique des biofilms semble principalement dirigée par la présence de nitrate, comme en témoigne la réponse plus marquée dans le gradient nitrate que dans le gradient minier. Ce dernier, bien que calqué sur un effluent réel, n'incluait pas les métaux associés *in situ*, mais visait plutôt à reproduire les autres composés présents. La différence d'intensité de réponse entre les deux gradients suggère ainsi que certains composés présents dans l'effluent réel peuvent atténuer l'effet stimulant du nitrate sur la production de PUFA. Plusieurs études soutiennent le rôle clé du nitrate dans la prolifération des diatomées et d'autres groupes algaux producteurs de PUFA, tels que les *Cryptophytes* (Opute 1974, Taipale et al. 2013, Guo et al. 2016a).

En condition de faible disponibilité en nutriments, les biofilms sont dominés par des communautés bactériennes et cyanobactériennes, ces organismes synthétisent principalement des acides gras SFA et MUFA (Gulis et Suberkropp 2003, Guo et al. 2016b, Dubois-Brissonet et al. 2016, Huang et al. 2019). Les SFA et MUFA jouent un rôle essentiel pour certaines fonctions cellulaires, cependant, ils ne représentent pas la valeur nutritionnelle des PUFA, indispensables à la croissance et à la reproduction des consommateurs primaires (Brett et Müller - Navarra 1997). Lorsque les milieux sont enrichis, la structure des communautés évolue, tendant vers une dominance de diatomées et autres groupes d'algues, privilégiant ainsi la synthèse de PUFA tels que l'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5n3) (Guo et al. 2017, Bell et Tocher 2009). Ces acides gras sont importants pour les consommateurs en étant impliqués dans la physiologie des organismes aquatiques. Ils régulent notamment la fluidité membranaire par leur implication dans les signaux cellulaires et le métabolisme énergétique (Thompson 1996, Geiger 2019). Ainsi, la

présence de diatomées capables de convertir des précurseurs lipidiques en EPA via des voies enzymatiques spécifiques est essentielle (Opute 1974, Taipale et al. 2013). De plus, les *Chlorophytes* contribuent également en produisant des PUFA, notamment l'acide alpha-linoléique (ALA, C18:3n3) et l'acide stéaridonique (SDA, C18:4n3) (Thompson 1996). La qualité nutritionnelle du biofilm repose donc en grande partie sur sa teneur en diatomées et autres groupes alguaux et sa composition en PUFA. En effet, des études ont montré que les invertébrés aquatiques qui se nourrissent d'un biofilm riche en PUFA présentent des taux de croissance et de reproduction plus élevés que ceux consommant des biofilms riches en bactéries et cyanobactéries, donc pauvres en PUFA (Brett et Müller-Navarra 1997, Guo et al. 2016a). Les PUFA sont mieux assimilés par les consommateurs primaires (Hill et al. 2011, Guo et al. 2017). L'augmentation des nutriments favorisent donc indirectement la disponibilité des PUFA en affectant la structure de la communauté. Les nutriments jouent ainsi un rôle important dans le transfert énergétique au sein des réseaux trophiques.

Nos résultats ont montré une augmentation des PUFA, principalement issus des diatomées et autres algues en réponse à une hausse du nitrate dans le milieu. La similarité des réponses entre les deux gradients indique que dans le gradient de nutriments, le nitrate apparaît comme l'un des facteurs principaux de la composition lipidique des biofilms. Contrairement à enrichissement en nutriments qui favorise une large diversité d'organismes autotrophes et hétérotrophes, une augmentation spécifique de nitrate stimule la prolifération de microalgues riches en PUFA et améliore la qualité nutritionnelle du biofilm (Guschina et Harwood 2009, Guo et al. 2021). L'excès de nitrate dans l'environnement engendre des déséquilibres écologiques, mais peut toutefois aussi favoriser la production de biofilm présentant une meilleure qualité nutritionnelle, bénéfique aux niveaux trophiques supérieurs (Brett et Müller-Navarra 1997, Bell et Tocher 2009).

3.4 Conclusion

Ce chapitre a permis d'étudier la réponse d'un même biofilm à différents environnements chimiques, en s'attardant sur les modifications de la chimie de l'eau induites par les activités minières. Plus spécifiquement, cette étude a permis de caractériser les effets du nitrate sur la structure du biofilm et sur la résistance de ces communautés dans un contexte d'altérations physico-chimiques liées à la composition ionique de l'eau. L'exposition des biofilms aux gradients de nutriments et de nitrate a mis en évidence une restructuration des communautés bactériennes, eucaryotes et fongiques, indiquant une capacité adaptative des biofilms en réponse aux variations

de la qualité de l'eau. Une hausse de la diversité bactérienne et fongique ainsi que des changements dans la composition taxonomique des communautés eucaryotes face à l'augmentation des nutriments témoignent de la plasticité écologique des biofilms et de leur résistance face aux perturbations environnementales.

L'analyse comparative des deux gradients a mis en évidence une plus grande différenciation des communautés eucaryotes et fongiques le long du gradient minier, tandis que les communautés procaryotes présentent une différenciation plus marquée selon le gradient de nitrate. Ainsi, les grands groupes microbiens expriment des stratégies et sensibilités qui leur sont spécifiques face aux facteurs abiotiques. L'enrichissement en nutriment du gradient minier peut affecter indirectement la structure des communautés en favorisant la production primaire (diatomées) et l'accumulation de matière organique. De tels changements dans le milieu peuvent engendrer une restructuration des réseaux trophiques au sein des mésocosmes, en altérant les phénomènes de compétition et de prédation. Les communautés fongiques au sein des biofilms suivent une direction similaire le long du gradient minier. Les champignons saprotrophes (*Mortierella*) impliqués dans la dégradation de la matière organique complexe et le recyclage des nutriments voient leur abondance déclinée dans des environnements enrichis. En effet, dans ces milieux, les organismes fournissant la matière organique changent et peuvent favoriser une hausse de composés simples issus des exsudats algaux. La présence de composés simples favorise la prolifération de bactéries hétérotrophes qui présentent des capacités d'assimilation de ces composés plus efficaces. Ainsi, une compétition entre les champignons et les bactéries peut induire le déclin de champignons saprotrophes benthiques, et entraîner une dominance d'organismes opportunistes ou parasitaires (*Rozellomycota*). *A contrario*, les communautés procaryotes sont principalement structurées par le gradient de nitrate. Les bactéries, principales actrices des cycles biogéochimiques, sont sensibles à l'augmentation de nitrate dans le milieu. En effet, le nitrate agit comme une force de sélection favorisant des groupes fonctionnels spécialisés, notamment les bactéries nitrifiantes, dénitrifiantes ou assimilatrices. Ce facteur induit une réorganisation des communautés bactériennes, avec le développement d'organismes pouvant exploiter le nitrate comme ressource ou accepteur d'électron.

Cette étude illustre donc l'importance des interactions microbiennes dans la structuration du biofilm exposé à une simulation d'effluent miniers. En effet, la dominance de β protéobactéries du genre *Aquabacterium* dans la condition oligotrophe, ainsi que la prolifération de γ protéobactéries du genre *Luteimonas* dans les conditions enrichies en nutriments appuie l'influence des apports en azote et en carbone organique dissous sur la composition bactérienne. D'autre part, dans les

milieux riches en nutriments, la prolifération de cyanobactéries du genre *Phormidium* montre le rôle essentiel des processus de recyclage des nutriments. Cette prolifération étant stimulée par des apports élevés en nitrate et de faibles concentrations en phosphore dans l'environnement, *Phormidium* est capable de stocker et de recycler efficacement le phosphore. Ce genre présente également une préférence pour le nitrate comme source d'azote, lui permettant ainsi de dominer les communautés. De plus, l'abondance des ciliés sessiles du genre *Peritrichia* en condition pauvre en nutriments, ainsi que leur déclin dans les milieux plus eutrophes, suggèrent un phénomène de compétition accrue avec les bactéries et cyanobactéries. La présence de diatomées benthiques *Naviculales* reflètent également des capacités d'adaptation à de tels milieux, notamment en situation de faible rapport N:P. La prolifération du genre *Hypotrichia* au détriment de celui des *Peritrichia* illustre la plasticité écologique des ciliés et leurs capacités à se développer dans divers environnements. Le flux de nutriments et la compétition pour la matière organique influencent également la structure des communautés fongiques engendrant une hausse d'organismes opportunistes tels que le genre *Rozellomycota* et une baisse de l'abondance relative des *Mortierella*.

Un enrichissement en nutriment, et plus spécifiquement en nitrate, a induit une restructuration des communautés, favorisant le développement de bactéries, algues, ciliés et champignons au détriment d'autres groupes. Les résultats de l'étude ont montré que cette réorganisation a des conséquences directes sur la synthèse et la disponibilité des acides gras polyinsaturés, indispensables à la croissance et à la reproduction des consommateurs primaires. Ainsi, l'apport de nitrate stimule la production de PUFA révélant la place des biofilms comme vecteurs de qualité nutritionnelle au sein des réseaux trophiques. Toutefois, cela questionne sur les implications à long terme de telles modifications sur la stabilité des écosystèmes aquatiques.

Certaines limites restent à considérer. Cette étude a été menée en conditions contrôlées, permettant d'isoler l'effet d'un gradient chimique et d'un gradient de nitrate. Toutefois, cela ne reflète pas la complexité des milieux naturels où d'autres facteurs biotiques et abiotiques interviennent. Il serait donc intéressant d'explorer des gradients chimiques plus complexes, intégrant d'autres contaminants tels que des métaux lourds. Bien que l'approche taxonomique utilisée a permis d'identifier les principaux groupes d'organismes affectés par les gradients étudiés, une exploration des réponses fonctionnelles des biofilms pourrait être pertinente. Une analyse métagénomique ou méta transcriptomique permettrait de mieux appréhender les mécanismes d'adaptation sous-jacents et d'évaluer les conséquences écologiques des restructuration observées. De plus, une étude des interactions trophiques au sein des biofilms

aiderait à mieux comprendre les processus de stabilisation des communautés en réponse aux perturbations anthropiques.

4. CONCLUSION

Les effluents miniers représentent une source de perturbation majeure pour les écosystèmes aquatiques, en introduisant dans le milieu des métaux et composés azotés tels que le nitrate. Cette étude vise à évaluer les effets spécifiques du nitrate issu de l'industrie minière sur les biofilms aquatiques, à l'aide d'une approche multi-descripteurs combinant des analyses taxonomiques et biochimiques. L'objectif général était d'évaluer dans quelle mesure le nitrate influence la structure et la qualité nutritionnelle des biofilms en vue de la mise en place du procédé de réduction du nitrate développé par le COREM.

Les résultats obtenus dans le premier volet de l'étude ont mis en évidence que les effluents miniers affectent la composition des communautés de biofilm, engendrant une restructuration des communautés microbiennes et une altération des profils lipidiques entre l'amont et l'aval du site minier étudié. La prolifération de certains groupes, tels que des cyanobactéries résistantes aux contaminants dans l'effluent, indique un ajustement de la composition du biofilm aux conditions de stress. Toutefois, ces changements se font au détriment d'espèces eucaryotes productrices d'acides gras polyinsaturés, entraînant des effets directs sur la qualité nutritionnelle du biofilm, ce qui pourrait avoir des implications sur les réseaux trophiques aquatiques. Par ailleurs, les biofilms montrent une plasticité écologique face aux perturbations chimiques du milieu.

Dans le second volet expérimental, l'étude a porté sur la place du nitrate dans la réponse du biofilm à travers une approche en mésocosmes. Les résultats ont démontré qu'une augmentation des apports en nutriments, ou plus spécifiquement en nitrate, induit une restructuration des communautés de biofilm. Ces réponses adaptatives ont été étudiées à plusieurs niveaux : une hausse de la diversité bactériennes et fongique, la prolifération de cyanobactéries du genre *Phormidium*, ainsi qu'un changement des communautés fongiques et de ciliés. Ces changements de composition ont eu des répercussions sur la production et la disponibilité des acides gras polyinsaturés, essentiels pour les consommateurs primaires, montrant l'importance des biofilms dans le fonctionnement des réseaux trophiques.

Les résultats obtenus mettent également en évidence un contraste entre les observations de terrain et les expérimentations en conditions contrôlées. En effet, dans le chapitre 1 portant sur l'analyse des données de terrain, les échantillons prélevés à l'amont, présentent une prédominance d'acides gras polyinsaturés, tandis qu'une diminution marquée de ces composés est observée dans les biofilms des milieux affectés. À *contrario*, les expériences en mésocosmes

dans le chapitre 2 révèlent une tendance opposée : la condition la plus faible en nutriments pour les deux gradients expérimentaux est caractérisée par une abondance d'acides gras saturés, tandis que les PUFA sont associés aux conditions les plus riches. Ces divergences soulignent la complexité des réponses écologiques face aux effluents miniers et rappellent l'importance du contexte environnemental dans l'interprétation des résultats. En laboratoire, l'augmentation des acides gras polyinsaturés est associée à la prolifération d'organismes phototrophes telles que les chlorophytes et les diatomées, ces dernières étant bénéfiques pour la chaîne trophique. Les résultats de terrain révèlent une baisse de ces acides gras polyinsaturés, probablement liée à une dominance des communautés par des protéobactéries. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette différence : en milieu naturel, la présence de composés organiques humiques et de décomposeurs influence la dynamique microbienne. De plus, les brouteurs, consommateurs primaires, exercent une pression de prédation accrue sur les eucaryotes producteurs d'acides gras polyinsaturés, essentiels à leur nutrition. Une réduction de la lumière disponible sur le site aval, situé en zone forestière, est également susceptible d'affecter la productivité photosynthétique des biofilms et leur composition. D'autre part, bien que les mésocosmes aient permis d'isoler l'effet du nitrate en maintenant les autres ions constants, les milieux naturels demeurent soumis à une variabilité plus importante (débit, température, substrat, autres sources d'azote), qui module les réponses biologiques observées. Ces éléments soulignent la nécessité d'une interprétation nuancée des résultats, et encouragent à une validation en conditions réelles du potentiel écologique du procédé du COREM, après sa mise en fonction. S'il apparaît prometteur pour limiter la charge en nitrate dans les effluents miniers, son implantation à large échelle devra s'accompagner de suivis écosystémiques sur le long terme, pour garantir son efficacité écologique et assurer la résilience des communautés aquatiques exposées.

En outre, ces recherches ont permis d'évaluer l'intérêt du nouveau procédé développé par le COREM visant à réduire les concentrations en nitrate dans les effluents miniers, en démontrant l'effet de ces derniers sur la chimie des cours d'eau récepteurs, la structuration et la fonction écologique des biofilms aquatiques (cycles biogéochimiques, réseaux trophiques). Elles soulignent également l'intérêt des biofilms comme indicateurs des effets des effluents miniers, grâce à leur réponse rapide aux variations chimiques et leur capacité à intégrer les fluctuations environnementales. Leur utilisation en complément des analyses physico-chimiques, constitue un outil pertinent pour le suivi des milieux aquatiques. De plus, les signatures biochimiques telles que le profil en acides gras des biofilms permettent d'estimer indirectement les répercussions des contaminants sur les niveaux trophiques supérieurs, en offrant une approche intégrative pour la

gestion des milieux aquatiques. Sur un plan appliqué, les résultats obtenus sont pertinents pour la gestion et la réglementation des effluents. Bien que les expérimentations en mésocosmes aient montré que des apports en nitrate favorisent la production d'acides gras polyinsaturés, bénéfiques pour les consommateurs primaires, cette observation doit être nuancée. En effet, cette hausse de la qualité nutritionnelle s'accompagne également d'une prolifération d'organismes phototrophes, incluant des diatomées mais aussi des cyanobactéries du genre *Phormidium*, dont certaines souches sont capables de produire des cyanotoxines, pouvant ainsi soulever une nouvelle problématique écologique. Par ailleurs, une augmentation de la biomasse photosynthétique mène à une hausse de la matière organique, susceptible d'engendrer des processus de décomposition favorisant l'eutrophisation. Ainsi, cette étude fournit des éléments scientifiques en faveur du contrôle des concentrations de nitrate dans les rejets industriels, non seulement en raison de leur influence sur la structure des communautés benthiques, mais aussi pour prévenir les effets indirects sur le fonctionnement des réseaux trophiques et la qualité écologique des écosystèmes aquatiques.

Cependant, cette étude ne permet pas de déterminer précisément les mécanismes moléculaires sous-jacents impliqués dans les réponses du biofilm. Une approche métagénomique et méta transcriptomique permettrait une meilleure compréhension des mécanismes adaptatifs utilisés. Une analyse spatio-temporelle pourrait également permettre d'intégrer une dimension saisonnière des réponses, tandis que des études sur les effets indirects sur les consommateurs primaires et les transferts trophiques affinaient l'évaluation des conséquences écologiques des perturbations. Ces recherches encouragent le développement de bioindicateurs robustes et prédictifs pouvant contribuer à une gestion plus durable des écosystèmes aquatiques. La considération des interactions complexes entre contaminants, communautés microbiennes et réseaux trophiques est essentielle pour évaluer l'influence des activités anthropiques et orienter les stratégies de préservation des milieux aquatiques affectés.

Dans ce contexte, le procédé développé par le COREM représente un premier pas vers une gestion plus durable des eaux industrielles. En permettant de réduire efficacement les concentrations en nitrate, cette technologie constitue un levier pour limiter les effets des rejets industriels sur les écosystèmes aquatiques. Ce dispositif, axé sur la régénération du cyanure et la récupération des métaux de base, représente une avancée dans l'optimisation du traitement des eaux industrielles. La compagnie minière partenaire du projet répond déjà aux exigences réglementaires actuelles. Ce procédé anticipe donc d'éventuelles restrictions environnementales futures, notamment concernant le nitrate, et contribue à une exploitation minière plus responsable.

Les résultats obtenus confirment la pertinence d'un tel dispositif en révélant les effets du nitrate sur la structuration des biofilms, et par extension, sur la chaîne trophique. Toutefois, son efficacité écologique à long terme reste à approfondir, notamment en s'attardant sur la résilience des écosystèmes. L'intégration de telles technologies dans les pratiques industrielles doit également s'accompagner d'un suivi écologique rigoureux afin de garantir une gestion efficace des cours d'eaux. En associant recherche et application technologique, ce projet ouvre la voie à de nouvelles stratégies d'atténuation des perturbations minières, intégrées aux dynamiques écologiques des écosystèmes aquatiques.

5. BIBLIOGRAPHIE

Adarme-Vega, T. C. et al. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microbial Cell Factories*, 11, 96. (2012).
<https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-96>

Al, T. A. et al. Effects of acid-sulfate weathering and cyanide-containing gold tailings on the transport and fate of mercury and other metals in Gossan Creek: Murray Brook mine, New Brunswick, Canada. *Applied Geochemistry* 21, 1969–1985 (2006).
<https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2006.08.013>

Andersson, A., Falk, S., Samuelsson, G. & Hagström, Å. Nutritional characteristics of a mixotrophic nanoflagellate, *Ochromonas* sp. *Microbial Ecology*, 17, 251–262 (1989).
<https://doi.org/10.1007/BF02012838>

Araya, R., Tani, K., Takagi, T., Yamaguchi, N. & Nasu, M. Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. *FEMS Microbiology Ecology* 43, 111–119 (2003).
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2003.tb01050.x>

Arndt, H. Rotifers as predators on components of the microbial web (bacteria, heterotrophic flagellates, ciliates) — a review. *Hydrobiologia* 255, 231–246 (1993).
<https://doi.org/10.1007/BF00025844>

Armon et Hänninen Editors. *Environmental Indicators*. (Springer Netherlands, Dordrecht, 2015).
<https://doi.org/10.1007/978-94-017-9499-2>.

Artigas, J., Romani, A. & Sabater, S. Nutrient and enzymatic adaptations of stream biofilms to changes in nitrogen and phosphorus supply. *Aquatic Microbial Ecology* 75, 91–102 (2015). <https://doi.org/10.3354/ame01745>

Battin, T. J., Besemer, K., Bengtsson, M. M., Romani, A. M. & Packmann, A. I. The ecology and biogeochemistry of stream biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 14, 251–263 (2016).
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.15>

- Barranguet, C. et al. Studying undisturbed autotrophic biofilms: still a technical challenge. *Aquatic Microbial Ecology*, 34, 1–9 (2004). <https://doi.org/10.3354/ame034001>
- Beaver, J. R. & Crisman, T. L. The role of ciliated protozoa in pelagic freshwater ecosystems. *Microbial Ecology*, 17, 111–136 (1989). <https://doi.org/10.1007/BF02011847>
- Bell, M. V. & Tocher, D. R. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in aquatic ecosystems: general pathways and new directions. in *Lipids in Aquatic Ecosystems* (eds. Kainz, M., Brett, M. T. & Arts, M. T.) 211–236 (Springer New York, New York, NY, 2009). https://doi.org/10.1007/978-0-387-89366-2_9
- Bergström, A. & Jansson, M. Atmospheric nitrogen deposition has caused nitrogen enrichment and eutrophication of lakes in the northern hemisphere. *Global Change Biology* 12, 635–643 (2006). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2006.01129.x>
- Bik, H. M. et al. Sequencing our way towards understanding global eukaryotic biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution* 27, 233–243 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.11.010>
- Bonnineau, C. et al. Role of biofilms in contaminant bioaccumulation and trophic transfer in aquatic ecosystems: current state of knowledge and future challenges. in *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 253* (ed. de Voogt, P.) vol. 253 115–153 (Springer International Publishing, Cham, 2020). https://doi.org/10.1007/398_2019_39
- Bott, T.L (1996). “Algae in microscopic food webs,” in *Algal Ecology*, eds. R. Jan Stevenson, Max L. Bothwell, Rex L. Lowe, James H. Thorp (Elsevier B.V)
- Brett, M. & Müller-Navarra, D. The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic food web processes. *Freshwater Biology* 38, 483–499 (1997). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.1997.00220.x>
- Brochu, S. (2009). Assessment of ANFO on the environment (Technical Investigation 09-01). DRDC Valcartier. <https://apps.dtic.mil/sti/tr/pdf/ADA593200.pdf>
- Burkholder, J.M (1996). “Algae in microscopic food webs,” in *Algal Ecology*, eds. R. Jan Stevenson, Max L. Bothwell, Rex L. Lowe, James H. Thorp (Elsevier B.V)

- Cai, H., Zeng, Y. & Jiang, H. Draft genome sequence of *Elstera cyanobacteriorum*, a novel facultative aerobic bacterium isolated from cyanobacterial aggregates in a eutrophic lake. *Gene Reports* 9, 136–138 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2017.10.007>
- Canning, A. D. & Death, R. G. The influence of nutrient enrichment on riverine food web function and stability. *Ecology and Evolution* 11, 942–954 (2021). <https://doi.org/10.1002/ece3.7107>
- Cardinale, B. J. Biodiversity improves water quality through niche partitioning. *Nature* 472, 86–89 (2011). <https://doi.org/10.1038/nature09904>
- Carr, G. M., Morin, A. & Chambers, P. A. Bacteria and algae in stream periphyton along a nutrient gradient. *Freshwater Biology* 50, 1337–1350 (2005). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2005.01401.x>
- Cashman, M. J., Wehr, J. D. & Truhn, K. Elevated light and nutrients alter the nutritional quality of stream periphyton. *Freshwater Biology* 58, 1447–1457 (2013). <https://doi.org/10.1111/fwb.12142>
- Chan, W. S. et al. Metal accumulations in aquatic organisms and health risks in an acid mine-affected site in South China. *Environmental Geochemistry Health*, 43, 4415–4440 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10653-021-00923-0>
- Chen, Y.-J. et al. Metabolic flexibility allows bacterial habitat generalists to become dominant in a frequently disturbed ecosystem. *The ISME Journal* 15, 2986–3004 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00988-w>
- Cheney, C. L., Eccles, K. M., Kimpe, L. E., Lehnher, I. & Blais, J. M. Mercury deposition to lake sediments near historic gold mines in northern Canada. *Environmental Pollution* 342, 123038 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.123038>
- Chiriac, M., Haber, M. & Salcher, M. M. Adaptive genetic traits in pelagic freshwater microbes. *Environmental Microbiology* 25, 606–641 (2023). <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16313>
- Corno, G., Salka, I., Pohlmann, K., Hall, A. & Grossart, H. Interspecific interactions drive chitin and cellulose degradation by aquatic microorganisms. *Aquatic Microbial Ecology*, 76, 27–37 (2015). <https://doi.org/10.3354/ame01765>

Coste, M., Boutry, S., Tison-Rosebery, J. & Delmas, F. Improvements of the Biological Diatom Index (BDI): Description and efficiency of the new version (BDI-2006). *Ecological Indicators* 9, 621–650 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2008.06.003>

Cudowski, A., Pietryczuk, A. & Hauschild, T. Aquatic fungi in relation to the physical and chemical parameters of water quality in the Augustów Canal. *Fungal Ecology* 13, 193–204 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.10.002>

Culp, J. M., Lowell, R. B. & Cash, K. J. Integrating mesocosm experiments with field and laboratory studies to generate weight-of-evidence risk assessments for large rivers. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 1167–1173 (2000). <https://doi.org/10.1002/etc.5620190450>

Dewi Puspita, I., Kamagata, Y., Tanaka, M., Asano, K. & Nakatsu, C. H. Are uncultivated bacteria really uncultivable? *Microbial Environment*, 27, 356–366 (2012). <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME12092>

Doose, C., Fadhlou, M., Morin, S. & Fortin, C. Thorium Exposure Drives Fatty Acid and Metal Transfer from Biofilms to the Grazer *Lymnaea* sp. *Environmental Toxicology and Chemistry* 40, 2220–2228 (2021). <https://doi.org/10.1002/etc.5067>

Doose, C., Morin, S., Malbezin, L., Vedrenne, J. & Fortin, C. Effects of thorium on bacterial, microalgal and micrometazoan community structures in a periphytic biofilm. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 218, 112276 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112276>

Dopheide, A., Lear, G., Stott, R. & Lewis, G. Preferential feeding by the ciliates *Chilodonella* and *Tetrahymena* spp. and effects of these protozoa on bacterial biofilm structure and composition. *Applied Environmental Microbiology*, 77, 4564–4572 (2011). <https://doi.org/10.1128/AEM.02421-10>

Doronina, N. V., Kaparullina, E. N. & Trotsenko, Y. A. *Methyloversatilis thermotolerans* sp. nov., a novel thermotolerant facultative methylotroph isolated from a hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64, 158–164 (2014). <https://doi.org/10.1099/ijs.0.055046-0>

Dubois-Brissonnet, F., Trotier, E. & Briandet, R. The biofilm lifestyle involves an increase in bacterial membrane saturated fatty acids. *Frontiers in Microbiology*, 7, (2016). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01673>

Duffus, J. H. 'Heavy metals' a meaningless term? (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry 74, 793–807 (2002). <https://doi.org/10.1351/pac200274050793>

Dunstan, G. A., Volkman, J. K., Barrett, S. M., Leroi, J.-M. & Jeffrey, S. W. Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae). Phytochemistry 35, 155–161 (1993). [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)90525-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90525-9)

Echeveste, P., Agustí, S. & Tovar-Sánchez, A. Toxic thresholds of cadmium and lead to oceanic phytoplankton: Cell size and ocean basin–dependent effects. Environmental Toxicology and Chemistry 31, 1887–1894 (2012). <https://doi.org/10.1002/etc.1893>

Elser, J. J. et al. Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. Ecology Letters 10, 1135–1142 (2007). <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01113.x>

Fadhlaoui, M., Laderriere, V., Lavoie, I. & Fortin, C. Influence of temperature and nickel on algal biofilm fatty acid composition. Environmental Toxicology and Chemistry 39, 1566–1577 (2020). <https://doi.org/10.1002/etc.4741>

Fadhlaoui, M., Pearce, N. J. T., Lavoie, I. & Fortin, C. Interactive effects of bismuth exposure (water and diet) and temperature on snail fatty acid composition, antioxidant enzymes and lipid peroxidation. Frontiers in Environmental Chemistry, 5, 1332967 (2024). <https://doi.org/10.3389/fenvc.2024.1332967>

Falkowski, P.G., Raven, J.A. Aquatic Photosynthesis. Princeton University Press. (2007).

Farag, A. M. et al. Concentrations of metals in water, sediment, biofilm, benthic macroinvertebrates, and fish in the Boulder River watershed, Montana, and the role of colloids in metal uptake. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 52, 397–409 (2007). <https://doi.org/10.1007/s00244-005-0021-z>

Fiałkowska, E., Pajdak-Stós, A., Chemical and mechanical signals in inducing Phormidium(Cyanobacteria) defence against their grazers, FEMS Microbiology Ecology, Volume 89, Issue 3, September 2014, Pages 659–669, <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12367>

- Filimonova, V., Gonçalves, F., Marques, J. C., De Troch, M. & Gonçalves, A. M. M. Fatty acid profiling as bioindicator of chemical stress in marine organisms: A review. *Ecological Indicators* 67, 657–672 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.03.044>
- Flemming, H.-C., Neu, T. R. & Wozniak, D. J. The EPS Matrix: The “House of Biofilm Cells”. *Journal of Bacteriology* 189, 7945–7947 (2007). <https://doi.org/10.1128/jb.00858-07>
- Flemming, H.-C. & Wingender, J. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 623–633 (2010). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Flemming, H.-C. et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14, 563–575 (2016). <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Foster, K. R. & Bell, T. Competition, not cooperation, dominates interactions among culturable microbial species. *Current Biology* 22, 1845–1850 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.08.005>
- Fraser, C. M. All things great and small. *Trends in Microbiology*. (2004). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2003.11.009>
- Früh, D., Norf, H. & Weitere, M. Response of biofilm-dwelling ciliate communities to enrichment with algae. *Aquatic Microbial Ecology*, 63, 299–309 (2011). <https://doi.org/10.1007/s00248-008-9470-z>
- Gao, X., Olapade, O. & Leff, L. Comparison of benthic bacterial community composition in nine streams. *Aquatic Microbial Ecology*, 40, 51–60 (2005).
- Gardham, S., Chariton, A.A. & Hose, G.C. Direct and indirect effects of copper-contaminated sediments on the functions of model freshwater ecosystems. *Ecotoxicology* 24, 61–70 (2015). <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1355-y>
- Gariépy, K. (2019). Étude sur les mésocosmes au Petit-Lac-Saint-François et à la Baie Missisquoi : influence des nutriments azotés sur les cyanobactéries [Master's thesis, Polytechnique Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/3888/>
- Gaysina, L. A., Saraf, A. & Singh, P. Cyanobacteria in Diverse Habitats. in *Cyanobacteria* 1–28 (Elsevier, 2019). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814667-5.00001-5>

Geiger. Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes. (Springer International Publishing, Cham, 2019). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-50430-8>

Giere, O. Meiobenthology: The microscopic motile fauna of aquatic sediments. Springer Science & Business Media (2008). <https://doi.org/10.1007/978-3-540-68661-3>

Gladyshev, M. I. et al. Efficiency of transfer of essential polyunsaturated fatty acids versus organic carbon from producers to consumers in a eutrophic reservoir. *Oecologia*. 165, 521–531 (2011). <https://doi.org/10.1007/s00442-010-1843-6>

Gomez Isaza, D. F., Cramp, R. L. & Franklin, C. E. Living in polluted waters: A meta-analysis of the effects of nitrate and interactions with other environmental stressors on freshwater taxa. *Environmental Pollution* 261, 114091 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114091>

Gray, N. Environmental impact and remediation of acid mine drainage: a management problem. *Environmental Geology* 30, 62–71 (1997). <https://doi.org/10.1007/s002540050133>

Gray, J. E. & Eppinger, R. G. Distribution of Cu, Co, As, and Fe in mine waste, sediment, soil, and water in and around mineral deposits and mines of the Idaho Cobalt Belt, USA. *Applied Geochemistry* 27, 1053–1062 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2012.02.001>

Gonçalves, A. M. M., Marques, J. C. & Gonçalves, F. Fatty acids' profiles of aquatic organisms: revealing the impacts of environmental and anthropogenic stressors. in *Fatty Acids* (ed. Catala, A.) (InTech, 2017). <https://doi.org/10.5772/intechopen.68544>

Groendahl, S., Kahlert, M. & Fink, P. The best of both worlds: A combined approach for analyzing microalgal diversity via metabarcoding and morphology-based methods. *PLoS ONE* 12, e0172808 (2017). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172808>

Grossart, H.-P. et al. Fungi in aquatic ecosystems. *Nature Reviews Microbiology*, 17, 339–354 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0175-8>

Guschina, I. A. & Harwood, J. L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research* 45, 160–186 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.01.001>

Guschina, I. A. & Harwood, J. L. Algal lipids and effect of the environment on their biochemistry. in *Lipids in Aquatic Ecosystems* (eds. Kainz, M., Brett, M. T. & Arts, M. T.) 1–24 (Springer New York, New York, NY, 2009). https://doi.org/10.1007/978-0-387-89366-2_1

- Gulis, V. & Suberkropp, K. Interactions between stream fungi and bacteria associated with decomposing leaf litter at different levels of nutrient availability. *Aquatic Microbial Ecology*, 30, 149–157 (2003). <https://doi.org/10.3354/ame030149>
- Gupta, R. & Gupta, N. *Fundamentals of bacterial physiology and metabolism*. (Springer Singapore, Singapore, 2021). <https://doi.org/10.1007/978-981-16-0723-3>.
- Guo, F., Kainz, M. J., Sheldon, F. & Bunn, S. E. The importance of high-quality algal food sources in stream food webs - current status and future perspectives. *Freshwater Biology*, 61, 815–831 (2016). <https://doi.org/10.1111/fwb.12755>
- Guo, F., Kainz, M. J., Sheldon, F. & Bunn, S. E. Effects of light and nutrients on periphyton and the fatty acid composition and somatic growth of invertebrate grazers in subtropical streams. *Oecologia* 181, 449–462 (2016). <https://doi.org/10.1007/s00442-016-3573-x>
- Guo, F., Bunn, S. E., Brett, M. T. & Kainz, M. J. Polyunsaturated fatty acids in stream food webs – high dissimilarity among producers and consumers. *Freshwater Biology* 62, 1325–1334 (2017). <https://doi.org/10.1111/fwb.12956>
- Guo, F., Bunn, S. E., Brett, M. T., Hager, H. & Kainz, M. J. The dark side of rocks: An underestimated high-quality food resource in river ecosystems. *Journal of Ecology* 109, 2395–2404 (2021). <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13647>
- Haack, T. K. & McFeters, G. A. Nutritional relationships among microorganisms in an epilithic biofilm community. *Microbial Ecology*, 8, 115–126 (1982). <https://doi.org/10.1007/BF02010445>
- Harpole, W. S. et al. Nutrient co-limitation of primary producer communities. *Ecology Letters* 14, 852–862 (2011). <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01651.x>
- Harris, E. H. *The Chlamydomonas sourcebook: Introduction to Chlamydomonas and its laboratory use* (Vol. 1). Academic Press (2009)
- Hayes, C. S., Aoki, S. K. & Low, D. A. Bacterial contact-dependent delivery systems. *Annual Review of Genetics*, 44, 71–90 (2010). <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091449>
- Heath, M., Wood, S. A., Young, R. G., Ryan, K. G., The role of nitrogen and phosphorus in regulating *Phormidium* sp. (cyanobacteria) growth and anatoxin production, *FEMS Microbiology Ecology*, 92, 3, fiw021, (2016). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw021>

- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & deWaard, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Biological Sciences*, 270, 313–321 (2003). <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R. & Peterson, S. B. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 15–25 (2010). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2259>
- Hill, W. R., Rinchar, J. & Czesny, S. Light, nutrients and the fatty acid composition of stream periphyton: Periphyton stoichiometry and fatty acids. *Freshwater Biology* 56, 1825–1836 (2011). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2011.02622.x>
- Hillebrand, H. & Sommer, U. Diversity of benthic microalgae in response to colonization time and eutrophication. *Aquatic Botany* 67, 221–236 (2000). [https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(00\)00088-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(00)00088-7)
- Hoellein, T.J., Arango, C.P. & Zak, Y. Spatial variability in nutrient concentration and biofilm nutrient limitation in an urban watershed. *Biogeochemistry* 106, 265–280 (2011). <https://doi.org/10.1007/s10533-011-9631-x>
- Hooper, D. U. et al. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecological Monographs* 75, 3–35 (2005). <https://doi.org/10.1890/04-0922>
- Howarth, R.W., Chan, F., Swaney, D.P. et al. Role of external inputs of nutrients to aquatic ecosystems in determining prevalence of nitrogen vs. phosphorus limitation of net primary productivity. *Biogeochemistry* 154, 293–306 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10533-021-00765-z>
- Hu, Y., Liu, T., Chen, N. & Feng, C. Changes in microbial community diversity, composition, and functions upon nitrate and Cr(VI) contaminated groundwater. *Chemosphere* 288, 132476 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132476>
- Huang, H. et al. Linking microbial respiratory activity with phospholipid fatty acid of biofilm from full-scale bioreactors. *Bioresour. Technol.* 272, 599–605 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.10.051>

Huggins, K., Frenette, J. & Arts, M. T. Nutritional quality of biofilms with respect to light regime in Lake Saint-Pierre (Québec, Canada). *Freshwater Biology* 49, 945–959 (2004). <https://belsp.uqtr.ca/id/eprint/256>

Jiang, C.-Y. *Roseomonas lacus* sp. nov., isolated from freshwater lake sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 25–28 (2006). <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63938-0>

Johnson, C. A. The fate of cyanide in leach wastes at gold mines: An environmental perspective. *Applied Geochemistry* 57, 194–205 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2014.05.023>

Kalmbach, S., Manz, W., Wecke, J. & Szewzyk, U. *Aquabacterium* gen. nov., with description of *Aquabacterium citratiphilum* sp. nov., *Aquabacterium parvum* sp. nov. and *Aquabacterium commune* sp. nov., three in situ dominant bacterial species from the Berlin drinking water system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 49, 769–777 (1999). <https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-769>

Kalmbach, S. In situ probing reveals *Aquabacterium commune* as a widespread and highly abundant bacterial species in drinking water biofilms. *Water Research* 34, 575–581 (2000). [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00179-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00179-7)

Kulichevskaya, I. S., Ivanova, A. A., Suzina, N. E., Sinnighe Damsté, J. S. & Dedysh, S. N. *Anatilimnocola floriformis* sp. nov., a novel member of the family Pirellulaceae from a boreal lake, and emended description of the genus *Anatilimnocola*. *Antonie van Leeuwenhoek* 115, 1253–1264 (2022). <https://doi.org/10.1007/s10482-022-01769-x>

Kurniawan, A., Ulfa, S. M. & Chamidah, C. The biosorption of copper(II) using a natural biofilm formed on the stones from the Metro River, Malang City, Indonesia. *International Journal of Microbiology* 2022, 1–6 (2022). <https://doi.org/10.1155/2022/9975333>

Laderriere, V., Paris, L.-E. & Fortin, C. Proton competition and free ion activities drive cadmium, copper, and nickel accumulation in river biofilms in a Nordic ecosystem. *Environments* 7, 112 (2020). <https://doi.org/10.3390/environments7120112>

Laderriere, V., Le Faucheur, S. & Fortin, C. Exploring the role of water chemistry on metal accumulation in biofilms from streams in mining areas. *Science of the Total Environment* 784, 146986 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146986>

Laderriere, Vincent (2021). Du milieu naturel aux mésocosmes : utilisation du biofilm comme bioindicateur de la contamination métallique des cours d'eau en région minière. Thèse. Québec, Doctorat en sciences de l'eau, Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique, 217 p. <https://espace.inrs.ca/id/eprint/12481>

Landers, J., Sullivan, S., Eby, L., Wilcox, A. C. & Langner, H. Metal contamination and food web changes alter exposure to upper trophic levels in upper Blackfoot River basin streams, Montana. *Hydrobiologia* 830, 93–113 (2019). <http://dx.doi.org/10.1007/s10750-018-3857-8>

Larned, S. T. A prospectus for periphyton: recent and future ecological research. *Journal of the North American Benthological Society* 29, 182–206 (2010). <https://doi.org/10.1899/08-063.1>

Lavoie, I., Campeau, S., Grenier, M. & Dillon, P. J. A diatom-based index for the biological assessment of eastern Canadian rivers: an application of correspondence analysis (CA). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 63, 1793–1811 (2006). <https://doi.org/10.1139/f06-084>

Lavoie, I., Lavoie, M. & Fortin, C. A mine of information: Benthic algal communities as biomonitors of metal contamination from abandoned tailings. *Science of the Total Environment* 425, 231–241 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.02.057>

Lavoie, I., Campeau, S., Zugic-Drakulic, N., Winter, J. G. & Fortin, C. Using diatoms to monitor stream biological integrity in Eastern Canada: An overview of 10 years of index development and ongoing challenges. *Science of the Total Environment* 475, 187–200 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.092>

Lavoie, I., Morin, S., Laderriere, V. & Fortin, C. Freshwater diatoms as indicators of combined long-term mining and urban stressors in Junction Creek (Ontario, Canada). *Environments* 5, 30 (2018). <https://doi.org/10.3390/environments5020030>

Lawes, J.C., Neilan, B.A., Brown, M.V., Clark, G.F., Johnston, E.L. Elevated nutrients change bacterial community composition and connectivity: high throughput sequencing of young marine biofilms. *Biofouling*. 32(1):57-69. (2016). <https://doi.org/10.1080/08927014.2015.1126581>

Leguay, S., Lavoie, I., Levy, J. L. & Fortin, C. Using biofilms for monitoring metal contamination in lotic ecosystems: The protective effects of hardness and pH on metal bioaccumulation. *Environmental Toxicology and Chemistry* 35, 1489–1501 (2016). <https://doi.org/10.1002/etc.3292>

- Lenart-Boroń, A. et al. Anthropogenic pollution gradient along a mountain river affects bacterial community composition and genera with potential pathogenic species. *Scientific Reports*, 12, 18140 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22642-x>
- Li, L. et al. Reconsideration of the phylogenetic positions of five peritrich genera, *Vorticella*, *Pseudovorticella*, *Zoothamnopsis*, *Zoothamnium*, and *Epicarchesium* (Ciliophora, Peritrichia, Sessilida), based on small subunit rRNA gene sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 55, 448–456 (2008). <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00351.x>
- Li, E. et al. Elevated nitrate simplifies microbial community compositions and interactions in sulfide-rich river sediments. *Science of the Total Environment* 750, 141513 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141513>
- Li-Beisson, Y., Thelen, J. J., Fedosejevs, E. & Harwood, J. L. The lipid biochemistry of eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research* 74, 31–68 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.01.003>
- Lipski, A. & Stackebrandt, E. S. *Luteimonas*. in *Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria* (ed. Whitman, W. B.) 1–3 (Wiley, 2015). <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01231>
- Little, A. J. et al. The impacts of century-old, arsenic-rich mine tailings on multi-trophic level biological assemblages in lakes from Cobalt (Ontario, Canada). *Science of the Total Environment* 709, 136212 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136212>
- Liu, Q. et al. Responses of the fungal-bacterial community and network to surface mulching and nitrogen fertilization in the Loess Plateau. *Plant Soil* 494, 111–126 (2024). <https://doi.org/10.1007/s11104-023-06260-8>
- Louca, S. et al. Function and functional redundancy in microbial systems. *Nature Ecology & Evolution* 2, 936–943 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0519-1>
- Loza, V., Perona, E. & Mateo, P. Specific responses to nitrogen and phosphorus enrichment in cyanobacteria: Factors influencing changes in species dominance along eutrophic gradients. *Water Research* 48, 622–631 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.10.014>

Machado, M. D. & Soares, E. V. Modification of cell volume and proliferative capacity of *Pseudokirchneriella subcapitata* cells exposed to metal stress. *Aquatic Toxicology* 147, 1–6 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.017>

Malbezin, L., Morin, S. & Lavoie, I. Effects of atrazine and S-metolachlor on stream periphyton taxonomic and fatty acid compositions. *Ecotoxicology* 33, 190–204 (2024). <https://doi.org/10.1007/s10646-024-02738-y>

Mikes, M. C., Martin, T. K., & Moe, W. M. *Azospira inquinata* sp. nov., a nitrate-reducing bacterium of the family Rhodocyclaceae isolated from contaminated groundwater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* Vol.71, (12). (2021) <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005172>

McAllister, T. G., Wood, S. A. & Hawes, I. The rise of toxic benthic *Phormidium* proliferations: A review of their taxonomy, distribution, toxin content and factors regulating prevalence and increased severity. *Harmful Algae* 55, 282–294 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.04.00>

McAllister, T. G., Wood, S. A., Greenwood, M. J., Broghammer, F. & Hawes, I. The effects of velocity and nitrate on *Phormidium* accrual cycles: a stream mesocosm experiment. *Freshwater Science* 37, 496–509 (2018). <https://doi.org/10.1086/699204>

McCarthy, J. F. & Shugart, L. R. *Biomarkers of environmental contamination*. (CRC Press, 2018). <https://doi.org/10.1201/9781351070263>

Mekuto, L., Ntwampe, S. K. O. & Akcil, A. An integrated biological approach for treatment of cyanidation wastewater. *Science of the Total Environment* 571, 711–720 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.040>

Ministère du développement durable, de l'environnement et de la lutte contre les changements climatiques. Le secteur minier au Québec – Enjeux environnementaux et cadre normatif pour les rejets liquides. 20 pages. [En ligne]. https://www.environnement.gouv.qc.ca/milieu_ind/bilans/mines-enjeux.pdf (page consultée le 2 septembre 2022).

Ministère de l'Énergie et Ressources naturelles. (2023). Choisir le secteur minier du Québec. Gouvernement du Québec. https://mrnf.gouv.qc.ca/wp-content/uploads/PR_Investir-secteur-minier_MRNF.pdf

Ministère du Développement durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs. (2013). Le Réseau - rivières. Gouvernement du Québec. <https://www.environnement.gouv.qc.ca/eau/bassinversant/reseau-riv/Reseau-rivieres.pdf>

Ministère du Développement durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs. (2025). Directive 019 sur l'industrie minière. Gouvernement du Québec. https://www.environnement.gouv.qc.ca/milieu_ind/directive019/directive-019-2025.pdf

Moreno, A. M., Matz, C., Kjelleberg, S. & Manefield, M. Identification of Ciliate grazers of autotrophic bacteria in ammonia-oxidizing activated sludge by RNA stable isotope probing. *Applied Environmental Microbiology*, 76, 2203–2211 (2010). <https://doi.org/10.1128/AEM.02777-09>

Morin, S. et al. Long-term survey of heavy-metal pollution, biofilm contamination and diatom community structure in the Riou Mort watershed, South-West France. *Environmental Pollution* 151, 532–542 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.04.023>

Morin, S. et al. Consistency in diatom response to metal-contaminated environments. in: Guasch, H., Ginebreda, A., Geislinger, A. (eds) *Emerging and Priority Pollutants in Rivers. The Handbook of Environmental Chemistry*, vol 19. Springer, Berlin, Heidelberg. (2012) https://doi.org/10.1007/978-3-642-25722-3_5

Morin, S. Réponses des communautés périphytiques aux contaminations toxiques. *Sciences de l'environnement. HDR Géochimie et écotoxicologie* (2015). <https://hal.inrae.fr/view/index/identifiant/tel-02601296>

Mudder, T. I. & Botz, M. M. *Chemistry and Treatment of Cyanidation Wastes*. Mining Journal Books LTD London 391 (2001).

Mulholland, P. J. et al. Stream denitrification across biomes and its response to anthropogenic nitrate loading. *Nature* 452, 202–205 (2008). <https://doi.org/10.1038/nature06686>

Nordstrom, D. K. Mine Waters: Acidic to Circumneutral. *Elements* 7, 393–398 (2011). <https://doi.org/10.2113/gselements.7.6.393>

Nyoyoko, V.F. "Chapter 13 - Proteobacteria response to heavy metal pollution stress and their bioremediation potential" in *Cost Effective Technologies for Solid Waste and Wastewater*

Treatment. Eds. Kathi, Srujana. Devipriya, Suja. Thamaraiselvi, K. (Elsevier Science) 147-159 (2022).

Olenici, A., Blanco, S., Borrego-Ramos, M., Momeu, L. & Baci, C. Exploring the effects of acid mine drainage on diatom teratology using geometric morphometry. *Ecotoxicology* 26, 1018–1030 (2017). <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1830-3>

Opute, F. I. Lipid and fatty-acid composition of diatoms. *Journal of Experimental Botany*, 25, 823–835 (1974). <https://doi.org/10.1093/jxb/25.4.823>

Paerl, H. W. & Otten, T. G. Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls. *Microbial Ecology*, 65, 995–1010 (2013). <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0159-y>

Persaud, A. A. et al. Regional changes in Cladocera (Branchiopoda, Crustacea) assemblages in subarctic (Yellowknife, Northwest Territories, Canada) lakes impacted by historic gold mining activities. *Hydrobiologia* 848, 1367–1389 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10750-021-04534-9>

Pinto, R. M., Soares, F. A., Reis, S., Nunes, C. & Van Dijck, P. Innovative strategies toward the disassembly of the EPS matrix in bacterial biofilms. *Frontiers in Microbiology* 11, 952 (2020). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00952>

Pipes, W. O. & Jones, P. H. Decomposition of organic wastes by *Sphaerotilus*. *Biotechnology and Bioengineering* 5, 287–307 (1963). <https://doi.org/10.1002/bit.260050405>

Philippot, L., Griffiths, B.S., Langenheder, S. Microbial community resilience across ecosystems and multiple disturbances. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 85:10.1128/mmbr.00026-20. (2021) <https://doi.org/10.1128/mmbr.00026-20>

Potapova, M. & Charles, D. F. Distribution of benthic diatoms in U.S. rivers in relation to conductivity and ionic composition. *Freshwater Biology* 48, 1311–1328 (2003). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2003.01080.x>

Redfield, A. C. The biological control of chemical factors in the environment. *American Scientist*, 46, 205-221 (1958).

Rendueles, O. & Ghigo, J.-M. Mechanisms of competition in biofilm communities. *Microbiology Spectrum*, 3, 3.3.28 (2015). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mb-0009-2014>

Ressources naturelles Canada. (2025). Minerals and the economy. Gouvernement du Canada. Retrieved [17 mars 2025], from <https://natural-resources.canada.ca/minerals-mining/mining-data-statistics-analysis/minerals-economy>

Roháček, K & Barták, M. Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications. *Photosynthetica* 37(3): 339-363 (1999) <https://doi.org/10.1023/A:1007172424619>

Romero Facuña, V., Sabater, S., Multiple stressors determine community structure and estimated function of river biofilm bacteria. *Applied Environmental Microbiology*. 86:e00291-20. (2020) <https://doi.org/10.1128/AEM.00291-20>

Rubin, M. A. & Leff, L. G. Nutrients and other abiotic factors affecting bacterial communities in an Ohio River (USA). *Microbial Ecology*, 54, 374–383 (2007). <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9209-2>

Russell, A. B., Peterson, S. B. & Mougous, J. D. Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose. *Nature Reviews Microbiology*, 12, 137–148 (2014). <https://doi.org/10.1038/nrmicro3185>

Safi, L. S., Fontoura, N. F., Severo, H. J. & Utz, L. R. Temporal structure of the peritrich ciliate assemblage in a large Neotropical lake. *Zoological Studies*, 53, 17 (2014). <https://doi.org/10.1186/s40555-014-0017-3>

Saros, J. E. et al. Sentinel responses of Arctic freshwater systems to climate: linkages, evidence, and a roadmap for future research. *Arctic Science* 9, 356–392 (2023). <https://doi.org/10.1139/as-2022-0021>

Santillan, E., Seshan, H., Constancias, F., Drautz-Moses, D. I. & Wuertz, S. Frequency of disturbance alters diversity, function, and underlying assembly mechanisms of complex bacterial communities. *npj Biofilms Microbiomes* 5, 8 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0079-4>

Schmitt, C. J., Brumbaugh, W. G. & May, T. W. Accumulation of metals in fish from lead–zinc mining areas of southeastern Missouri, USA. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67, 14–30 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.11.002>

- Schnurr, P. J., Espie, G. S. & Allen, G. D. The effect of photon flux density on algal biofilm growth and internal fatty acid concentrations. *Algal Research* 16, 349–356 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.04.001>
- Schoch, C. L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 109, 6241–6246 (2012). <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Seballos, RC., Wyatt, KH., Bernot, RJ., Brown, SP., Chandra, S., Rober, AR. Nutrient availability and organic matter quality shape bacterial community structure in a lake biofilm. *Aquatic Microbial Ecology* 85:1-18. (2020) <https://doi.org/10.3354/ame01937>
- Seder-Colomina, M. et al. *Sphaerotilus natans*, a neutrophilic iron-related sheath-forming bacterium: perspectives for metal remediation strategies. *Geomicrobiology Journal* 31, 64–75 (2014). <https://doi.org/10.1080/01490451.2013.806611>
- Shams, S. et al. Anatoxin-a producing *Tychonema* (Cyanobacteria) in European waterbodies. *Water Research* 69, 68–79 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.006>
- Sharma, K. K., Schuhmann, H. & Schenk, P. M. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies* 5, 1532–1553 (2012). <https://doi.org/10.3390/en5051532>
- Shugart, L. R., McCarthy, J. F. & Halbrook, R. S. Biological markers of environmental and ecological contamination: an overview. *Risk Analysis* 12, 353–360 (1992). <https://doi.org/10.1111/j.1539-6924.1992.tb00687.x>
- Singh, R., Paul, D. & Jain, R. K. Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in Microbiology* 14, 389–397 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.07.001>
- Siriarchawatana, P. et al. Fungal communities as dual indicators of river biodiversity and water quality assessment. *Water Research* 253, 121252 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.121252>
- Šlapeta, J., Moreira, D. & López-García, P. The extent of protist diversity: insights from molecular ecology of freshwater eukaryotes. *Proceedings of the Royal Society. Biological Sciences*, 272, 2073–2081 (2005). <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3195>

- Smith, V. H. Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems a global problem. *Environmental Science & Pollution Research*, 10, 126–139 (2003). <https://doi.org/10.1065/espr2002.12.142>
- Sogin, S. J., Sogin, M. L. & Woese, C. R. Phylogenetic measurement in procaryotes by primary structural characterization. *Journal of Molecular Evolution*, 1, 173–184 (1972). <https://doi.org/10.1007/BF01659163>
- Soldo, D. & Behra, R. Long-term effects of copper on the structure of freshwater periphyton communities and their tolerance to copper, zinc, nickel and silver. *Aquatic Toxicology* 47, 181–189 (2000). [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00020-X](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00020-X)
- Steinrücken, P., Mjøs, S. A., Prestegard, S. K. & Erga, S. R. Enhancing EPA content in an arctic diatom: a factorial design study to evaluate interactive effects of growth factors. *Frontiers in Plant Science*, 9, 491. (2018). <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00491>
- Stevenson, J. Ecological assessments with algae: a review and synthesis. *Journal of Phycology* 50, 437–461 (2014). <https://doi.org/10.1111/jpy.12189>
- Stewart, P. S. & Franklin, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Review Microbiology*, 6, 199–210 (2008). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1838>
- Stewart, E. J. Growing unculturable bacteria. *Journal of Bacteriology*, 194, 4151–4160 (2012). <https://doi.org/10.1128/jb.00345-12>
- Taipale, S. et al. Fatty acid composition as biomarkers of freshwater microalgae: analysis of 37 strains of microalgae in 22 genera and in seven classes. *Aquatic Microbial Ecology*, 71, 165–178 (2013). <https://doi.org/10.3354/ame01671>
- Tarhriz, V., Eyvazi, S., Shakeri, E., Hejazi, M. S. & Dilmaghani, A. Antibacterial and antifungal activity of novel freshwater bacterium *Tabrizicola aquatica* as a prominent natural antibiotic available in Qurugol Lake. *Pharmaceutical Sciences*, 26, 88–92 (2020). <https://doi.org/10.34172/PS.2019.56>
- Thienpont, J. R. et al. Multi-trophic level response to extreme metal contamination from gold mining in a subarctic lake. *Proceedings of the Royal Society. Biological Sciences*, 283, 20161125 (2016). <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.1125>

- Thomas, M. K. & Litchman, E. Effects of temperature and nitrogen availability on the growth of invasive and native cyanobacteria. *Hydrobiologia* 763, 357–369 (2016). <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2390-2>
- Thompson, G. A. Lipids and membrane function in green algae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1302, 17–45 (1996). [https://doi.org/10.1016/00052760\(96\)00045-8](https://doi.org/10.1016/00052760(96)00045-8)
- Tien, C.-J., Wu, W.-H., Chuang, T.-L. & Chen, C. S. Development of river biofilms on artificial substrates and their potential for biomonitoring water quality. *Chemosphere* 76, 1288–1295 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.06.013>
- Torres-Ruiz, M., Wehr, J. D. & Perrone, A. A. Trophic relations in a stream food web: importance of fatty acids for macroinvertebrate consumers. *Journal of the North American Benthological Society* 26, 509–522 (2007). <https://doi.org/10.1899/06-070.1>
- Torsvik, V., Daae, F. L., Sandaa, R.-A. & Øvreås, L. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology* 64, 53–62 (1998). [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(98\)00103-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(98)00103-5)
- Tsirigoti, A. et al. Biofilm cultivation of marine dinoflagellates under different temperatures and nitrogen regimes enhances DHA productivity. *Journal of Applied Phycology*, 32, 865–880. (2020). <https://doi.org/10.1007/s10811-019-02027-w>
- Tyson, G. W. & Banfield, J. F. Cultivating the uncultivated: a community genomics perspective. *Trends in Microbiology* 13, 411–415 (2005). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.07.003>
- van Diepen, L. T. A., Frey, S. D., Landis, E. A., Morrison, E. W. & Pringle, A. Fungi exposed to chronic nitrogen enrichment are less able to decay leaf litter. *Ecology* 98, 5–11 (2017). DOI: [10.1002/ecy.1635](https://doi.org/10.1002/ecy.1635)
- Van Zyl, A. W., Harrison, S. T. L. & van Hille, R. P. Biodegradation of thiocyanate by a mixed microbial population. *Mine Water* 6 (2011).
- Van Zyl, P.J., Ristow, N.E., Badenhorst, J., Botes, J.P. Biological degradation of cyanide and its application in gold processing. *South African Journal of Chemical Engineering*, 16(1), 12-20. (2011).

- Wach, M., Guéguen, J., Dagens, N., Tison-Rosebery, J., Delmas, F. Définition des sources d'incertitude du protocole diatomées en cours d'eau : Evaluation de la variabilité inter-opérateurs et de la variabilité interannuelle des notes. [Rapport de recherche] irstea. 2018, pp.110. ([hal-02608301](https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02608301))
- Wada, H. & Murata, N. The essential role of phosphatidylglycerol in photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 92, 205–215 (2007). <https://doi.org/10.1007/s11120-007-9203-z>
- Wagenhoff, A., Lange, K., Townsend, C. R. & Matthaei, C. D. Patterns of benthic algae and cyanobacteria along twin-stressor gradients of nutrients and fine sediment: a stream mesocosm experiment. *Freshwater Biology* 58, 1849–1863 (2013). <https://doi.org/10.1111/fwb.12174>
- Wallace, J. B., Eggert, S. L., Meyer, J. L. & Webster, J. R. Multiple trophic levels of a forest stream linked to terrestrial litter inputs. *Science* 277, 102–104 (1997). <https://doi.org/10.1126/science.277.5322.102>
- Wintermute, E. H. & Silver, P. A. Dynamics in the mixed microbial concourse. *Genes Development*, 24, 2603–2614 (2010). <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1985210>.
- Woese, C. R., Stackebrandt, E., Macke, T. J. & Fox, G. E. A Phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Systematic and Applied Microbiology* 6, 143–151 (1985). [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(85\)80047-3](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(85)80047-3)
- Yang, F., Zhang, H., Xie, S., Wei, C. & Yang, X. Concentrations of heavy metals in water, sediments and aquatic organisms from a closed realgar mine. *Environmental Science and Pollution Research*, 30, 4959–4971 (2023). <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22563-2>
- Yoon, M.-H., Ten, L. N., Im, W.-T. & Lee, S.-T. *Methylibium fulvum* sp. nov., a member of the Betaproteobacteria isolated from ginseng field soil, and emended description of the genus *Methylibium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 2062–2066 (2007). <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64909-0>
- Zeglin, L. H. Stream microbial diversity in response to environmental changes: review and synthesis of existing research. *Frontiers in Microbiology*, 6, (2015). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00454>

Zhang, Z. et al. Alteration of dominant cyanobacteria in different bloom periods caused by abiotic factors and species interactions. *Journal of Environmental Sciences* 99, 1–9 (2021).
<https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.06.001>

6. ANNEXE I : MATERIEL SUPPLEMENTAIRE CHAPITRE 1

Tableau 10 : Paramètres physico-chimiques observés aux 3 sites lors des 2 campagnes d'échantillonnage

	Amont		Aval		Effluent	
	06/07/2022	28/07/2022	06/07/2022	28/07/2022	06/07/2022	28/07/2022
NO ₃ (mg/L)	0,54	0,66	8,94	34,43	330,00	294,67
Al (mg/L)	0,37	0,46	0,31	0,32	0,06	0,07
COD (mg/L)	21	27,7	19	24,1	3,9	4,33
Fe (mg/L)	0,85	0,99	0,79	0,81	0,01	0,01
Si (mg/L)	3,23	3,8	3,02	3,18	0,35	0,03
Zn (mg/L)	0,06	0,08	0,04	0,08	0,06	0,02
SO ₄ (mg/L)	3,07	2,17	87,3	311,33	2560	2517
Na (mg/L)	3,81	5,37	21,2	68,23	546	486,67
Ca (mg/L)	5,67	5,32	29,4	81,37	655	627,33
Ba (mg/L)	0,01	0,01	0,01	0,02	0,03	0,03
Sr (mg/L)	0,03	0,03	0,08	0,21	1,45	1,52
Mn (mg/L)	0,03	0,04	0,05	0,07	1,3	1,11
pH	6,57	6,28	6,55	6,49	7,64	7,72

Tableau 11 : Liste des diatomées identifiées aux sites d'échantillonnage. Correspondance entre les codes des diatomées utilisés dans la Figure 9 et leurs noms scientifiques complets. Ce tableau permet d'identifier précisément chaque taxon présent aux différents sites d'échantillonnage.

Codes	Noms scientifiques
FCAPF5	<i>Fragilaria capucina</i> Desmazières 1825 forme 5
FCAPF7	<i>Fragilaria capucina</i> Desmazières 1825 forme 7
UULN	<i>Ulnaria ulna</i> (Nitzsch.) Compère
EOLI	<i>Eolimna</i> spp.
DVUL	<i>Diatoma vulgare</i> Bory 1824
ADMI	<i>Achnanthes minutissimum</i> (Kützinger) Czarnecki in Czarnecki & Edlund 1995
GPAR	<i>Gomphonema</i> sp. [G. cf. parvulum Kützinger 1849]
EUNO	<i>Eunotia</i> spp.
TFLO	<i>Tabellaria flocculosa</i> (Roth) Kützinger 1844
NNOT	<i>Navicula notha</i> Wallace 1960
NIPR	<i>Nitzschia pura</i> Hustedt 1954
PINU	<i>Pinnularia</i> spp.
NPAD	<i>Nitzschia palea</i> var. <i>debilis</i> (Kützinger) Grunow in Cleve & Grunow 1880
SPIN	<i>Staurosirella pinnata</i> (Ehrenberg) Williams & Round 1987
NZRA	<i>Nitzschia</i> sp. [N. cf. radicula Hustedt 1942]
GCBC	<i>Gomphonema</i> sp. [G. cf. cymbelliclinum Reichardt & Lange-Bertalot 1999]
SBRE	<i>Surirella brebissonii</i> Krammer & Lange-Bertalot 1987
NVEN	<i>Navicula veneta</i> Kützinger 1844

DITE	<i>Diatoma tenuis</i> Agardh 1812
DMON	<i>Diatoma moniliformis</i> Kützing 1833
NRHY	<i>Navicula rhynchocephala</i> Kützing 1844
ESLE	<i>Encyonema silesiacum</i> (Bleisch in Rabenhorst) Mann in Round & al. 1990
HCAP	<i>Hippodonta capitata</i> (Ehrenberg) Lange-Bertalot & al. 1996
BMIC	<i>Brachysira microcephala</i> (Grunow) Compère 1986
SAPH	<i>Surirella amphioxys</i> W.Smith 1856
NDIS	<i>Nitzschia dissipata</i> (Kützing) Grunow 1862
ACDF	<i>Achnanthidium deflexum</i> (Reimer) Kingston 2003
NAGN	<i>Nitzschia agnita</i> Hustedt 1957
CMEN	<i>Cyclotella meneghiniana</i> Kützing 1844
NGRE	<i>Navicula gregaria</i> Donkin 1861
SCVE	<i>Staurosira construens</i> var. <i>venter</i> (Ehrenberg) Hamilton in Hamilton et al. 1992
GOMP	<i>Gomphonema</i> spp.
GCBC	<i>Gomphonema</i> sp. [G. cf. <i>cymbelliclinum</i> Reichardt & Lange-Bertalot 1999]
NPAL	<i>Nitzschia palea</i> (Kützing) W.Smith 1856
EINC	<i>Eunotia incisa</i> Gregory 1854
NFON	<i>Nitzschia fonticola</i> Grunow 1879 sensu lato
FCRS	<i>Frustulia crassinervia</i> (Brébisson in W. Smith) Lange-Bertalot & Krammer 1996
NCRY	<i>Navicula cryptocephala</i> Kützing 1844
ESUB	<i>Eunotia subarcuatoides</i> Alles Nörpel & Lange-Bertalot 1991
EOMI	<i>Eolimna minima</i> (Grunow) Lange-Bertalot 1998
ENLB	<i>Encyonema lange-bertalotii</i> Krammer 1997 morphotype 1
CPLC	<i>Ctenophora pulchella</i> (Ralfs ex Kützing) Williams & Round 1986
ARIV	<i>Achnanthidium rivulare</i> Potapova & Ponader 2004
PSAT	<i>Psammothidium subatomoides</i> (Hustedt) Bukhtiyarova & Round 1996
NIFR	<i>Nitzschia frustulum</i> (Kützing) Grunow var. <i>frustulum</i>