

Artheau M. & Cordeiro P. (2005) — Echantillonnage des communautés d'invertébrés aquatiques souterrains et des communautés bactériennes du biofilm de l'affluent De Joly de la rivière de Padirac. *Rapport d'expédition CDS46/MNHN (Bichain J.M. coord.), octobre 2005* : 39-46

Echantillonnage des communautés d'invertébrés aquatiques souterrains et des communautés bactériennes du biofilm de l'affluent De Joly de la rivière de Padirac

Malvina ARTHEAU¹ & Pedro CORDEIRO²

¹ Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes, UMR 5177 Université Paul Sabatier 118 Route de Narbonne F-31062 Toulouse cedex 09

² Muséum national d'Histoire naturelle, Département Systématique et Evolution, USM602, 55 rue Buffon, F-75005 Paris

Correspondance / artheau@cict.fr

Résumé — L'incroyable topographie du réseau de Padirac a permis de mettre en place un protocole standardisé d'échantillonnage de la faune aquatique souterraine tout au long de l'affluent De Joly de la rivière de Padirac. Les résultats de ce dispositif sont actuellement en cours de traitement et devraient permettre d'analyser l'évolution de la structure des communautés d'invertébrés aquatiques souterraines le long d'un gradient surface/milieu souterrain profond. L'échantillonnage de la faune a de plus été couplé à des mesures de chimie de l'eau et des prélèvements des communautés bactériennes du biofilm. Le protocole d'analyse des communautés bactériennes est décrit ici. L'ensemble de ces données devrait permettre d'obtenir une image précise du fonctionnement de l'écosystème aquatique souterrain du De Joly.

Mots-clefs — échantillonnage en milieu souterrain - réseau karstique de Padirac - invertébrés aquatiques souterrains - biofilm.

Abstract — The Padirac network displays an amazing topography which made it possible to achieve a standardized sampling protocol for the aquatic invertebrate fauna of the De Joly tributary. The data issued of this sampling campaign are currently analysed in order to stress out the importance of a surface/groundwater gradient on the structures of the subterranean aquatic invertebrates communities. Chemical analyses of the De Joly River waters, as well as sampling of the biofilm bacteria have also been done. Protocol for analysing the bacterial community is described here. All these data should give a precise image of the functioning of the underground De Joly River ecosystem.

Key words — subterranean sampling - Padirac karstic network - subterranean aquatic invertebrates - biofilm.

INTRODUCTION

En milieu aquatique souterrain les zones accessibles à l'échantillonnage présentent souvent une très grande hétérogénéité spatiale. Les gours, zones d'infiltrations superficielles, résurgences et siphons requièrent des méthodes d'échantillonnage de la faune différentes adaptées à chacun de ces « types » d'eau souterraine. La comparaison entre grottes où entre sites au sein d'une même grotte en devient compliquée, voire impossible.

L'affluent De Joly de la rivière de Padirac possède certaines caractéristiques des rivières de surface telles la présence de méandres, d'accélération de courant, de plats et de déliés ; il est également soumis à l'influence de l'arrivée d'eau de ses trois affluents : l'affluent Bonnebouche, l'affluent Lafaurie et l'affluent Beaucheron.

Le De Joly est accessible sur toute sa longueur depuis le siphon terminal, proche de la surface, jusqu'à la jonction avec la rivière de Padirac quelques 5 Km plus loin. Cette accessibilité ainsi que les faibles hauteurs d'eau (entre 0,5m et 1m au moment de l'échantillonnage), et la présence de substrat ont permis de mettre en place un protocole standardisé d'échantillonnage de la faune d'invertébrés aquatiques le long de son cours. Des prélèvements de biofilm ont également été effectués ainsi que des mesures de chimie de l'eau (Concentrations en calcium, magnésium, phosphates, composés azotés, matière organique dissoute).

L'ensemble des données récoltées durant cette campagne est actuellement en cours d'analyse. Elles devraient nous permettre de répondre aux questions suivantes : Dans quelle mesure les paramètres chimiques de l'eau varient-ils le long du De Joly ? La structure des communautés faunistiques varie-t-elle en fonction de l'éloignement à la surface ? Les affluents présentent-ils un impact sur la composition faunistique du De Joly ? Quelles sont les relations entre les paramètres chimiques de l'eau, les communautés bactériennes et les communautés invertébrés ?

MATERIELS ET METHODES

L'affluent De Joly

L'affluent De Joly présente quasiment 4 000 m de longueur entrecoupé par deux chaos (Ascar et Fabriol). Les caractéristiques topographiques sont variables puisqu'à certains points le cours d'eau présente un mètre de largeur tandis qu'à d'autres il atteint plusieurs mètres. De même des sections rectilignes contrastent avec de longues suites de méandres de différentes amplitudes. La température varie sensiblement entre le siphon terminal et le point de jonction avec la rivière de Padirac. A la période de l'échantillonnage certains points de l'affluent De Joly présentait plutôt des caractéristiques de milieu lentique (eaux stagnantes ou courant lent) que de milieu lotique (eau courante). De plus les différentes zones de l'affluent De Joly présentent une hétérogénéité de composition et de profondeur du substrat. Certaines zones étant composées d'une couche de plusieurs centimètres de sables et graviers alors que dans d'autres le sable est quasiment absent et seul subsistent des galets directement posés sur le substrat rocheux.

Stations

Les douze stations échantillonnées ont été réparties le long de l'affluent depuis le siphon terminal jusqu'à sa perte (**Annexe 1 & 2**). Afin de mesurer l'effet d'un gradient amont-aval sur la faune aquatique souterraine nous avons dans un premier temps déterminé un site le plus amont possible : PAD217 au niveau du siphon terminal et le site aval PAD206 qui encadrent notre zone d'étude. Entre ces deux stations nous avons pris le parti d'échantillonner en amont et en aval de chaque affluent (PAD209, PAD210, PAD212, PAD213, PAD215 et PAD216), afin de pouvoir prendre en compte leur impact sur la faune du De Joly. Enfin, nous avons réparti quatre autres stations (PAD 207, PAD208, PAD211 et PAD218), le long du De Joly de façon à couvrir l'ensemble de l'affluent de la façon la plus homogène possible. L'échantillonnage a eu lieu entre le 18/04/2005 et le 20/04/2005.

Le débit a été mesuré au niveau de la station aval, PAD206 le 18/04/2005 et le 19/04/2005. Pour ces mesures de débit nous avons mesuré la largeur, profondeur et la vitesse du courant en deux points de l'affluent. Les mesures de largeur et profondeur ont été effectués à l'aide d'un décimètre et la vitesse du courant a été calculée en mesurant le temps parcouru par un bouchon en liège sur une longueur déterminée. Le débit moyen est calculé à partir de trois mesures de vitesse en un point donné.

Prélèvement de la faune aquatique souterraine

Pour chaque station trois types de prélèvement de faune ont été effectués :

Prélèvement au filet Surber (Vide de maille 500 μ m)

Le filet utilisé présente une base délimitée par des tiges métalliques de 20 cm par 25 cm de côté et représentant une surface de 1/20^{ème} de m², cette surface est prolongée par le filet proprement dit (**Figures 1 & 2**). L'ouverture du filet est placée face au courant. Le substrat est remué à la main au niveau de la surface délimitée par le cadre métallique posé au sol. Les substrats meubles sont ainsi échantillonnés sur une épaisseur de quelques centimètres en fonction de la nature du substrat.

Figure 1 — Filet Surber utilisé pour les prélèvements de faune benthique dans l'affluent De Joly de la rivière de Padirac



Prélèvement au filet à main (Vide de maille 150 μ m)

Afin de compléter les prélèvements faits au Surber, des prélèvements au filet à main ont été effectués. En effet, du fait de la faible densité des invertébrés aquatiques souterrains un risque existe que les prélèvements standardisés au Surber ne donnent pas une image exhaustive de la faune présente à un endroit donné du cours d'eau. Les prélèvements au filet à main permettent d'échantillonner une surface plus large de substrat selon un protocole similaire à celui employé pour le Surber : raclage du substrat et récolte des particules ainsi mises en suspension dans le filet placé face au courant (**Figure 2**).

Prélèvement au filet à plancton (Vide de maille 300µm)

Le filet à plancton permet de prélever exclusivement la faune présente dans la colonne d'eau : le plancton. L'échantillonnage s'effectue en faisant dériver le filet dans la colonne d'eau. Un opérateur fait circuler le filet autour de la zone échantillonnée. Le filet est ensuite inversé et rincé à l'eau. Le contenu du rinçage est mis en flacon pour analyse postérieure au laboratoire.

La rivière de Padirac a également été échantillonnée grâce à des pièges à appâts déposés dans les gours remplis d'eau en haut du chaos Martel et au fond de la rivière en amont et en aval du chaos Marignan. Les pièges sont constitués de bouteilles plastiques sectionnées au tiers supérieur qui est inversé formant ainsi un entonnoir. Un appât carné est placé dans la bouteille. L'ouverture en entonnoir permet ainsi l'entrée de l'animal attiré par l'appât mais empêche sa sortie.

Les échantillons ont été fixés au formaldéhyde à 6% puis nettoyés à l'eau déminéralisée et préservés dans de l'éthanol à 70%. Le tableau de l'annexe 1 récapitule les stations de prélèvement et le type de prélèvements effectués pour chaque station.



Figure 2 — Prélèvements de sédiments (à gauche) et Surber (à droite) dans le réseau profond (© Bob Ascargorta 2005)

Données de chimie de l'eau

Nous avons de plus effectué deux prélèvements d'eau au niveau des stations PAD206 (aval De Joly) et PAD 217 (siphon terminal) afin d'en réaliser l'analyse chimique au laboratoire. Un demi litre d'eau est prélevé dans un pot stérile dans une partie non remuée du cours d'eau, ou en amont d'une région remuée. Les échantillons ont ensuite été ramenés au laboratoire où les dosages de composés azotés, phosphates, calcium, magnésium, potassium et carbone organique dissout ont été réalisés.

Échantillonnage et analyse de communautés bactériennes du biofilm**Échantillonnage**

Pour ces mêmes stations (PAD206 et PAD217) deux prélèvements de galets ont été réalisés (Tableau 2). Les galets sont un substrat sur lequel se développe le biofilm, essentiellement constitué de bactéries maintenues dans une matrice de polymères. Les galets ont été conservés dans des sachets à l'abri de la lumière et de l'oxygène. Les analyses de biofilm ont ensuite été réalisées au laboratoire.

Analyse des communautés bactériennes du biofilm

Les biofilms sont le résultat de la fixation et du développement de micro-organismes sur les surfaces, ou interfaces, exposées à des environnements humides non stériles. Les micro-organismes fixés synthétisent des polymères et forment ainsi des films de quelques micromètres à quelques millimètres d'épaisseur, totalement différents du milieu environnant et régis par une organisation interne complexe (Watnick & Kolter, 2000).

Mesures de MSSC (Matière Sèche Sans Cendre) — 60 mL (3x30mL) de suspension homogène de biofilm sont centrifugés pendant 20 min à 4500 rpm. Les culots sont déposés dans une coupelle

d'aluminium, pesés, puis mis à sécher à l'étuve pendant 6h à 105°C et pesés à nouveau. Enfin, ils sont passés au four à mouffle à 500°C pendant 8h et pesés pour calculer le MSSC par g MS.

Analyse des profils métaboliques (Biolog) — Les microplaques de type Biolog Ecoplate™ sont utilisées pour l'analyse de l'activité potentielle des communautés bactériennes en utilisant des sources uniques de carbone. Chaque plaque contient 31 substrats en trois réplicats soit 93 puits. Le protocole utilisé est le suivant : 10 mL de solution de biofilm sont centrifugés (12000 rpm, 20 min, 4°C, Jouan K-63F), les culots sont récupérés et passés au vortex pendant 20 min dans 1 ml de solution de Tetrasodium-pyrophosphate (0.2%), puis laissés au repos pendant 3 min. 0,15 ml de surnageant sont dilués 100 fois avec une solution de NaCl à 0.9%, 0.1 ml de la solution obtenue est ensuite transférée dans chacun des puits des plaques.

Analyse de la diversité bactérienne : PCR (Polymerase Chain Reaction), DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) — 10 ml de suspension de biofilm sont centrifugés (12000 × g, 20 min, 4°C, Jouan K-63F). L'extraction de l'ADN est réalisée à partir des culots ainsi obtenus en utilisant le kit commercial « UltraClean Soil DNA kit » (Bio101, Vista CA, USA). Les quantités d'ADN extrait sont quantifiées par fluorimétrie (SYBR Green– Sigma -Fluorokan Ascent II; Labosystems, Helsinki, Finland).

L'ADN extrait (20 ng) est amplifié par PCR à partir des amorces universelles EUB GCclamped 341F: 5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3' et EUB 907R : 5'-CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT-3'. Les résultats de PCR sont ensuite quantifiés par une électrophorèse sur gel d'agarose à 1.65%.

La DGGE est réalisée à partir du système "D-Code Universal Mutation detection System" (Bio Rad). 500 ng d'ADN sont déposés sur un gel d'acrilamide avec un gradient d'urée et de formamide de 30 à 70% (100% de dénaturant correspondant à 7 M d'urée et 40 % de formamide déionisée). L'électrophorèse est ensuite déclenchée pour une durée de 16 heures à 150V et 60°C.

Enfin, l'ADN est marqué au SYBR Green (Sigma) pendant 30 min pour permettre la visualisation des bandes par fluorescence sous rayons UV (302 nm, transillumination).

L'image des gels est photographiée avec une camera CCD reliée à un ordinateur utilisant le logiciel Biocapt V97.03 (Vilber Lourmat). L'analyse d'image est ensuite réalisée grâce au logiciel Bio-ID++/Bio-gene 1D V97.06 (Vilber Lourmat). Pour chacun des deux échantillons un profil densiométrique est généré afin de déterminer la contribution relative de chaque bande par rapport à l'ensemble du signal. Les intensités relatives des bandes ont ainsi permis de déduire l'abondance relative des différents types bactériens et de calculer des indices de diversité de Shannon, où p_i est la proportion du type i par rapport au nombre total de types n dans la communauté considérée.

$$H' = -\sum_{i=1}^{i=n} p_i \ln p_i$$

Les bandes DGGE dominantes sont coupées et séquencées (Sequencing technical facilities, IIEFG) selon le protocole « Quick start Kit » avec « CEQ™2000 Dye Terminator Cycle Sequencing » proposé par Beckman Coulter. Les séquences sont ensuite comparées à celles déposées dans la banque de données ADN GenBank à l'aide du logiciel BLAST. Elles sont ensuite alignées pour permettre la construction d'un arbre phylogénétique (arbre résumant les relations de parenté entre les fragments d'ADN séquencés) à l'aide du logiciel ARB (www.arb-home.de).

L'arbre phylogénétique des séquences partielles d'ADN ribosomal 16S bactérien est réalisé à partir des bandes de DGGE dominantes. L'arbre est obtenu selon la méthode du neighbor joining (arbre NJ). Les valeurs de bootstrap sont basées sur 1000 simulations et affichées pour des valeurs > 50%. Les arbres de similarités sont obtenus par les méthodes de parcimonie et du maximum de vraisemblance. Les images de gels sont actuellement en cours d'analyse.

Tri et détermination des invertébrés aquatiques souterrains

Les échantillons de faune seront triés à la loupe binoculaire. Les organismes seront séparés selon les grands groupes taxonomiques : amphipodes, isopodes, mollusques, hydracariens, copépodes, oligochètes et ostracodes et conservés dans de l'éthanol à 70% avant d'être envoyés à des spécialistes de chaque taxon pour détermination.

PREMIERS RESULTATS

Mesures de débit

Mesures effectuées le 18/04/2005 sur une section rectiligne en aval du chaos Ascar
 Débit 1=16 L.s⁻¹; Débit 2=10,6 L.s⁻¹; Débit 3=12,9 L.s⁻¹; Débit 4=12,58 L.s⁻¹
 Débit moyen =13,02 L.s⁻¹

Chimie de l'eau

Le **tableau 1** récapitule les valeurs des différents composés dosés. L'eau de l'affluent de Joly est une eau calcique (68,83 mg/L et 93,9mg/L pour PAD206 et PAD217 respectivement), moyennement dure (25°f et 23°f pour PAD206 et PAD217 respectivement), avec de faibles valeurs en Nitrates, Nitrites, Phosphates et Phosphore total. Les valeurs de carbone organique dissout (COD) trouvées au niveau du siphon terminal sont relativement élevées : 3,07 mg/L.

Analyse des communautés bactériennes du biofilm

Actuellement seuls les résultats de MSSC sont disponibles (**Tableau 2**). Le prélèvement De Joly aval, PAD206 présente des quantités de matière sèche sans cendre, nettement plus élevées que le prélèvement réalisé au niveau du siphon terminal PAD217.

Tableau 1 — Résultats des analyses de chimie de l'eau au niveau dans la partie aval (PAD206) et au niveau du siphon terminal (PAD 217) du De Joly.

	PAD206	PAD217
N-NH4 (mg/L)	0	0,005
N-NO2 (mg/L)	0	0,001
N-NO3 (mg/L)	1,486	1,002
P-PO4 (mg/L)	0,031	0,048
PTD (mg/L)	0,042	0,056
Na (mg/L)	3,06	4,49
K (mg/L)	1,85	1,85
Mg (mg/L)	2,56	4,09
Ca (mg/L)	68,83	93,9
Dureté totale (°f)	18	25
Dureté calcique (°f)	17	23
COD (mg/L)	1,837	3,07

Tableau 2 — Quantités de matière sèche sans cendre (MSSC), obtenues par grattage des cailloux prélevés aux stations PAD206 et PAD207

	Moyenne	
	MSSC	MSSC
	g / m ²	g / m ²
PAD 206	50	
PAD 206	60	
PAD 206	55	
PAD 206	55	55
PAD 217	1	
PAD 217	1	
PAD 217	1	
PAD 217	1	1

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La topographie de l'affluent De Joly de la rivière de Padirac a permis de réaliser un échantillonnage standardisé de la faune aquatique souterraine. Être à même d'échantillonner une rivière sur une grande partie de son parcours est une opportunité rare en milieu souterrain. De même, pouvoir réaliser trois types de prélèvements complémentaires pour chaque station, à la fois quantitatifs et qualitatifs devrait nous permettre de nous affranchir des différents biais dus à l'hétérogénéité des méthodes d'échantillonnage utilisées habituellement en milieu souterrain. L'étude de la composition faunistique (richesse spécifique, abondances relatives des différents taxa, abondance par surface...) des différents prélèvements nous donnera une image de l'évolution spatiale de cette composition le long du gradient amont / aval du De Joly ainsi que de l'éventuelle influence des apports de ses affluents sur la composition faunistique.

De plus nous avons pu coupler les prélèvements d'invertébrés à deux prélèvements de biofilms bactériens. En milieu souterrain, les organismes dépendent d'une part des apports de matière organique exogène, et d'autre part des bactéries qui présentent une source non négligeable de matière organique. Les analyses des communautés bactériennes vont nous permettre d'une part de comparer ces communautés

avec celles d'autres milieux souterrains (nappe, zone hyporhéique ...) et de caractériser des communautés spécifiques des grottes ; et d'autre part d'appréhender le fonctionnement de l'écosystème dans son ensemble en prenant en compte les interactions aussi bien entre les invertébrés et les conditions physico-chimiques, qu'entre les bactéries du biofilm, le milieu environnant et leur prédateurs.

Finalement il est important de noter que l'établissement de ce protocole dans le De Joly devrait permettre d'autres études pour étudier les variations aussi bien faunistiques que physico chimiques. En effet, la limite de notre échantillonnage sur seulement quelques jours ne nous donnera qu'une image ponctuelle de la réelle biodiversité de ce milieu.

REMERCIEMENTS — Un grand merci à Jean-François Fabriol et Bob Ascargota pour leur inestimable patience, pour nous avoir soutenus, guidés, conseillés, et énormément appris tout au long des progressions. Merci à Carole Deschamps, Joël Trémoulet, et Bernard Lips pour leur aide précieuse et leur participation enthousiaste lors des prélèvements. Tous nos remerciements à tous les membres de l'expédition Lesur, pour nous avoir acceptés avec générosité au sein de cette aventure. Un grand merci à tous ceux qui ont rendu cette expédition possible, chapeau bas à tout le travail d'organisation réalisé en amont. Merci à ceux qui nous ont chaleureusement accueilli avant et après « la chute ». Et enfin, merci à Jean-Michel Bichain de nous avoir entraînés dans cette grande aventure.

Annexe 1 — Stations échantillonnées dans la rivière de Padirac et l'affluent De Joly entre le 16/04/2005 et le 20/04/2005. *MA* Malvina Artheau ; *PC* Pedro Cordeiro Estrela ; *JT* Joël Trémoulet ; *CD* Carole Deschamps.

Code Station	Numéro Opération de prélèvement	Date	Durée	Type de prélèvement	Vide de maille	Récolteur
PAD201	29	16/04/2005	5 jours	Piège à appât		MA
PAD202	31	16/04/2005	5 jours	Piège à appât		PC
PAD203	41	17/04/2005		Filet à main		MA
PAD204	42	17/04/2005	4 jours	Piège à appât		MA
PAD205	48	17/04/2005	4 jours	Piège à appât		MA
PAD206	1	18/04/2005		Filet phréatobiologique	300	MA
PAD206	2	18/04/2005		Surber	500	MA
PAD206	11	18/04/2005		Caillou/ Biofilm		MA
PAD206	12	18/04/2005		Eau (500ml)		JT
PAD207	3	18/04/2005		Filet phréatobiologique	300	JT
PAD207	4	18/04/2005		Surber	500	MA
PAD208	5	18/04/2005		Filet phréatobiologique	300	MA
PAD208	6	18/04/2005		Surber	500	MA
PAD208	13	18/04/2005		Filet à main	150	MA
PAD209	7	18/04/2005		Surber	500	MA
PAD209	8	18/04/2005		Filet à main	150	MA
PAD209	30	18/04/2005		Filet phréatobiologique	300	BL
PAD210	14	18/04/2005		Filet à main	150	MA
PAD210	10	18/04/2005		Surber	500	PC
PAD210	9	18/04/2005		Filet phréatobiologique	300	MA
PAD211	20	20/04/2005		Surber	500	JT
PAD211	21	20/04/2005		Filet phréatobiologique	300	CD
PAD211	22	20/04/2005		Filet à main	150	MA
PAD212	23	20/04/2005		Surber	500	JT
PAD212	24	20/04/2005		Filet phréatobiologique	300	CD
PAD212	25	20/04/2005		Filet à main	150	MA
PAD213	26	20/04/2005		Surber	500	JT
PAD213	28	20/04/2005		Filet à main	150	MA
PAD214	44	19/04/2005		Graviers		PC
PAD215	19	19/04/2005		Surber	500	PC
PAD215	43	19/04/2005		Filet phréatobiologique	300	PC
PAD215	32	20/04/2005		Surber	500	JT
PAD215	33	20/04/2005		Filet phréatobiologique	300	CD
PAD215	34	20/04/2005		Filet à main	150	MA
PAD216	17	19/04/2005		Filet phréatobiologique	300	PC
PAD216	18	19/04/2005		Surber	500	PC
PAD216	35	20/04/2005		Filet à main	150	MA
PAD216	36	20/04/2005		Filet phréatobiologique	300	CD
PAD216	37	20/04/2005		Surber	500	JT
PAD217	15	19/04/2005		Surber	500	PC
PAD217	16	19/04/2005		Filet phréatobiologique	300	PC
PAD217	38	20/04/2005		Surber	500	JT
PAD217	39	20/04/2005		Filet phréatobiologique	300	CD
PAD217	40	20/04/2005		Filet à main	150	MA
PAD218	45	20/04/2005		Filet phréatobiologique	300	CD
PAD218	46	20/04/2005		Filet à main	150	MA

Annexe 2 — Situation des prélèvements dans l'affluent De Joly (Pad100 à 109 module Mollusques, PAD200 à 217 ce module)

