



Evaluation de l'intégrité fonctionnelle des écosystèmes lotiques du sud-ouest de la France

Magali Brosed

► To cite this version:

Magali Brosed. Evaluation de l'intégrité fonctionnelle des écosystèmes lotiques du sud-ouest de la France. Ecologie, Environnement. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2016. Français. NNT : 2016TOU30389 . tel-01878472

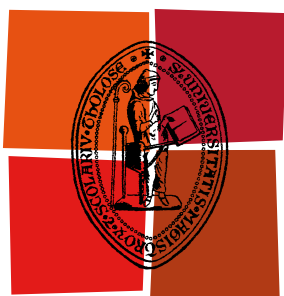
HAL Id: tel-01878472

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01878472>

Submitted on 21 Sep 2018

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

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



Université
de Toulouse

THÈSE

**En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

Délivré par :

Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Discipline ou spécialité :

Ecologie fonctionnelle

Présentée et soutenue par :

Magali Brosed

le : 14 juin 2016

Titre :

Evaluation de l'intégrité fonctionnelle
des écosystèmes lotiques du sud-ouest de la France

Ecole doctorale :

Sciences de l'Univers, de l'Environnement et de l'Espace (SDU2E)

Unité de recherche :

EcoLab - Laboratoire écologie fonctionnelle et environnement

Directeur(s) de Thèse :

M. Eric Chauvet, Directeur de recherche CNRS

Rapporteurs :

M. Arturo Elosegui, Professeur, Univ. Pays Basque (Espagne)

M. François Guérol, Professeur, Univ. Lorraine

Membre(s) du jury :

M. Régis Céréghino, Professeur, Univ. Toulouse

Mme Fanny Colas, Ingénieure de recherche CNRS, IRSTEA

M. Antoine Lecerf, Maître de conférence, Univ. Toulouse

Mme Estelle Lefrançois, Ingénieure de recherche, Asconit-Consultant

M. Yorick Reyjol, Chargé de mission, ONEMA

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de ma thèse.

Tout d'abord, j'adresse mes remerciements aux piliers de cette recherche :



Eric Chauvet, mon directeur de thèse, pour m'avoir accordé sa confiance depuis l'écriture du projet à sa réalisation et soutenu dans les moments les plus délicats.



L'Agence de l'Eau Adour-Garonne qui a financé cette thèse et en particulier à Margaux Saüt et ses collaborateurs : Jean-Pierre Rebillard, Bernard Hypolyte, Lomig Leborgne.



Le bureau d'étude Asconit-Consultants et toute l'équipe toulousaine pour m'avoir appris leur métier !



Les membres du jury pour toutes les remarques qui permettront d'améliorer ce travail et poursuivre les recherches menées : Arturo Elosegui et François Guérolde pour avoir accepté d'être rapporteur de mon travail et les examinateurs Fanny Colas, Estelle Lefrançois, Régis Céréghino, Antoine Lecerf, Yorick Reyjol.

Je tiens à remercier vivement tous ceux qui ont collaboré à ce travail :



Robert Fernandez pour m'avoir accompagné sur le terrain, sa disponibilité et son soutien, Didier Lambrigot, ou Monsieur Ergostérol et Virginie Paré-Suc.



Sylvain Lamothe, un accompagnateur de chic et de choc pour toutes les étapes d'acquisition des données, depuis la récolte de la première feuille morte à la détermination du dernier invertébré.



Une pensée à Cécile Pouget qui a été une stagiaire motivée et d'une grande aide.

Je remercie également toute l'équipe qui m'a entouré durant cette recherche :



Les directeurs successifs d'EcoLab, Jean-Luc Probst et Franck Gilbert et l'équipe de Bioref pour leur soutien.



Le personnel de gestion, du secrétariat et de la logistique pour leur serviabilité : Cécile, Tshitcha, Régine, Catherine, Anne et Daniel.



Une pensée à tous les anciens doctorants : Aline, Andy, Amélie, Anthony, Camille, Eve, Ingrid et Yang.

Mes meilleurs vœux à ceux qui passeront bientôt l'étape : Charlotte, Joey, Maïwen et Nathalie. Bon courage à ceux qui sont arrivés plus tard, Doriane, Marjorie, Thibault, Soumayla et les autres! De grands encouragements pour ceux qui réalisent ce passage en même temps que moi, Jingmei et Sophie.



Un remerciement spécial à Mark Gessner avec qui j'ai réalisé mes premiers pas en recherche et qui m'a donné l'envie de réaliser ce challenge.

Enfin, je tiens à remercier toutes ces personnes qui ont agit dans l'ombre :



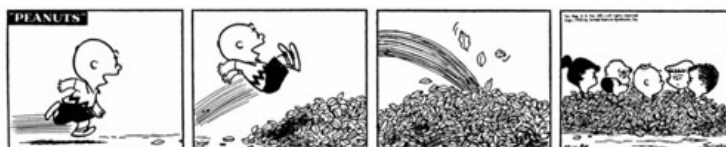
Mes grands supporters et amis Masha, docteur Louli et monsieur JérémY pour les pauses dépayantes, botaniques, statistiques et culinaires.



Juliette et Lucas pour leur gentillesse et leur soutien moral et technique.



Mon amoureux Walter, mes parents Paule et Marcello, mes proches, Cécile, Lucie, Lucille, Adèle, Victor et Julie pour leur tendresse.



L'esprit scientifique nous interdit d'avoir une opinion sur des questions que nous ne comprenons pas, sur des questions que nous ne savons pas formuler clairement.

Avant tout, il faut savoir poser des problèmes. Et quoi qu'on dise, dans la vie scientifique, les problèmes ne se posent pas d'eux-mêmes. [...] Rien ne va de soi. Rien n'est donné. Tout est construit.

Gaston Bachelard

La Formation de l'esprit scientifique (1938)

A Ambroise

Table des matières

Chapitre 1 : Introduction générale	15
Les eaux courantes : des écosystèmes à protéger	15
Evaluation de l'état écologique des eaux courantes au sein de l'Union Européenne	18
Développement d'une évaluation des fonctions écosystémiques	24
Développement d'un indicateur de l'intégrité fonctionnelle basé sur le processus de décomposition des litières	29
Objectif de la thèse et organisation du mémoire	33
 Chapitre 2 : Evaluation de l'intégrité fonctionnelle des cours d'eau impactés par les pesticides	 37
Résumé du chapitre.....	37
Introduction	39
Methods	41
<i>Study sites</i>	41
<i>Physical and chemical analyses of stream water</i>	42
<i>Leaf litter breakdown</i>	43
<i>Leaf-associated microorganisms and macroinvertebrates</i>	44
<i>Data analysis</i>	45
Results	45
<i>Pesticides</i>	45
<i>Leaf litter breakdown rates</i>	46
<i>Leaf-associated decomposers</i>	46
<i>Among-parameters correlations</i>	47
Discussion	50
Supplementary Material.....	57
 Chapitre 3 : Comparaison des indicateurs biotiques et des métriques liées au processus de décomposition à l'échelle régionale : enjeux pour l'évaluation du statut écologique des rivières.....	 63
Résumé du chapitre.....	63
Introduction	65
Material and methods	67
<i>Study sites</i>	67
<i>Physical and chemical analyses of stream water</i>	67
<i>Functional metrics</i>	69
<i>Structural metrics</i>	71
<i>Data analysis</i>	73

Results	74
<i>Structural indices and decomposition rates</i>	74
<i>Associated metrics from structural indices and decomposition</i>	78
<i>Structural and functional responses to environmental factors</i>	80
Discussion	84
Chapitre 4 : Evaluation de la qualité des eaux du bassin Adour-Garonne : vers l'utilisation de la décomposition des litières comme marqueur de l'intégrité de l'écosystème	89
Résumé du chapitre	89
Introduction	91
Matériel et Méthodes	93
<i>Sélection des sites d'étude</i>	93
<i>Paramètres physico-chimiques</i>	94
<i>Taux de décomposition et décomposeurs microbiens et invertébrés associés</i>	96
<i>Analyses des données</i>	96
Résultats	97
<i>Taux de décomposition sur les 84 sites d'étude</i>	97
<i>Taux de décomposition dans les sites tirés de la littérature</i>	99
<i>Influence des décomposeurs microbiens et invertébrés sur les taux de décomposition</i> ..	100
<i>Effets des facteurs environnementaux sur les taux de décomposition</i>	101
<i>Proposition de métriques d'évaluation de l'intégrité</i>	104
Discussion	107
<i>Facteurs contrôlant la décomposition des litières dans le bassin Adour-Garonne</i>	107
<i>Approche d'une évaluation de l'intégrité fonctionnelle</i>	109
<i>Proposition de métriques</i>	111
Matériel supplémentaire	115
Chapitre 5 : Discussion générale et conclusion	121
Bénéfices d'une évaluation fonctionnelle	121
Quantification du temps de réalisation	124
Optimisation du protocole d'application	126
· <i>Expression des taux de décomposition</i>	126
· <i>Expression de la masse restante de litière</i>	127
· <i>Prise en compte de la variabilité naturelle des taux de décomposition</i>	128
Conclusions	129
Bibliographie	133
Annexe	157

Table des illustrations

Figure 1 – Méthode d'ordination des cours d'eau selon Strahler.....	16
Figure 2 –. Catégories et exemples de services écosystémiques selon le cadre de l'Evaluation de l'Ecosystème du Millénaire.	17
Figure 3 – Règle d'agrégation des éléments de qualité dans la classification de l'état écologique pour le type de masse d'eau considéré.....	19
Tableau 1 – Définition générale des classes d'état écologique des cours d'eau en fonction des éléments de qualité d'après l'Arrêté du 27 juillet 2015.....	20
Figure 4 – Hydroécorégions de France métropolitaine distribuées par district hydrographique.	20
Tableau 2 – Définitions, catégories et exemples de l'analyse des composantes structurales des écosystèmes aquatiques, d'après Matthews et al. (1982).	25
Figure 5 – Mise en relation entre les éléments qui composent l'écosystème lotique et les processus écosystémiques associés (Palmer & Febria, 2012).	26
Figure 6 – Histogramme quantifiant le nombre d'études à comité de relecture relevant de l'évaluation de l'état fonctionnel des rivières à partir de la décomposition des litières et du métabolisme à partir d'une recherche dans Isi Web of Knowledge.	28
Tableau 3 – Résumé des résultats de l'analyse comparative des approches de biosurveillance traditionnelles (associées à la structure des communautés des invertébrés) et celles en cours de développement (traits fonctionnels et processus écosystémiques), d'après Bonada et al. (2006).....	32
Table 4 - Location and physicochemical characteristics of stream water of the 12 sites ranked according to the increasing pesticide toxicity (mTUD.magna).	42
Table 5 – Correlation matrix between response variables (means of the 6 experimental units for each stream), toxicity parameters and ammonium concentration, with Pearson correlation coefficient (bottom left) and P-values being displayed.....	48
Figure 7 – A: Total, microbial-driven and invertebrate-driven leaf breakdown rates (mean $\pm$ SE, n = 6) along the gradient of maximum toxic units for <i>Daphnia magna</i> encountered in the 12 sites. B: Total to microbial-driven breakdown rate ratio (mean $\pm$ SE, n = 6) along the gradient of maximum toxic units for <i>Daphnia magna</i>	49

Table S1 – List of pesticides detected at the 12 sites from March 2012 to March 2013 along with pesticide type (H: herbicide, F: fungicide, I: insecticide, M: metabolite), frequency of detection at all sites (% of sampling occasions), limit of quantification (LOQ), median effect concentration for <i>Daphnia magna</i> (EC50-D) and green algae (EC50-A) together with their corresponding maximum toxic unit (mTU _{D.magna} and mTU _{algae}) as determined from University of Hertfordshire (2013).....	57
Table S2 – Relative abundance (%) and total conidial production rate of leaf-associated aquatic hyphomycete species after 21 days of exposure at the 12 sites. Values are means (SE) of the 6 experimental units per stream.....	58
Table S3 – Relative abundance (%) of leaf-associated invertebrate taxa (including strict to occasional shredder*) and total invertebrate and shredder abundances after 21 days of exposure at the 12 sites.....	59
Table 6 – Descriptive statistics of environmental parameters at the 58 studied sites.	69
Figure 8 – Number of sites for each of the 5 classes of ecological status, from bad to high quality, for diatom-derived indicator (BDI) and invertebrate-derived indicators (IBGN and I ₂ M ₂) and among our 6158 stream sites (only 57 stream sites for I ₂ M ₂).....	75
Figure 9 – Relationships between litter decomposition rates (mean ± SE) and French structural indicators for benthic macroinvertebrates (IBGN and I ₂ M ₂) and diatoms (BDI) for 58 streams in SW France, and between structural indicators (bottom).	76
Figure 10 – Barplot of decomposition rates (mean ± SE) among quality categories – from bad (1) to very good (5) – based on invertebrate (IBGN and I ₂ M ₂) and diatom (BDI) indicators.....	77
Table 7 – Spearman correlation rank among structural indicators, decomposition rates and their associated metrics.	79
Table 8 – Pearson correlation coefficient among physical characteristics (elevation and catchment area), land uses, water chemistry and substratum scores for the 58 studied streams.	81
Figure 11 – Redundancy analysis (RDA 1) biplot showing the distribution of structural indicators under the influence of environmental variables.	82
Figure 12 – Redundancy analysis (RDA 2) biplot showing the distribution of decomposition rates under the influence of environmental variables.	83
Figure 13 – Localisation des 84 sites d'étude du bassin Adour-Garonne.....	94
Tableau 9 – Moyenne (± erreur standard, minimum-maximum entre parenthèses) des paramètres physicochimiques des sites et de qualité des eaux des 82 sites d'étude	

répartis dans les différentes hydroécorégions, ainsi que des sites de référence issus de la littérature (* Hladysz et al., 2011 et Lecerf et al., 2005 ; ** Lecerf et al., 2006).	95
Figure 14 – Taux de décomposition exprimés en jour^{-1} (A) et en degré-jour $^{-1}$ (B) et ratios des taux (C) dans les sites d'études.	98
Figure 15 – Taux de décomposition moyen ($\pm$ SE) exprimé en degré-jour $^{-1}$ et ratios moyens des taux ($\pm$ SE) dans les sites de référence de la Montagne Noire (en gris, d'après les données de Hladysz et al., 2011, n = 5) et dans les Coteaux aquitains (en blanc, d'après les données de Lecerf et al., 2006, n = 5).	99
Tableau 10 – Corrélations entre les taux de décomposition et les métriques fonctionnelles et structurelles associées.	100
Figure 16 – Distribution des taux de décomposition le long des gradients de concentration en phosphore dissous (P-PO $_4$), azote inorganique dissous (DIN) et azote ammoniacal (N-NH $_4$).	101
Figure 17 – Triplot des 5 métriques de la décomposition avec les variables environnementales disponibles pour les 84 sites étudiés.	103
Tableau 11 – Limites des 5 classes d'intégrité fonctionnelle pour chacune des 5 métriques de la décomposition, déterminées pour l'ensemble du bassin Adour-Garonne à partir des valeurs moyennes issues de la littérature (Hladysz et al., 2011).	104
Figure 18 – Graphique croisant le taux k_{total} et le ratio $k_{\text{invertébré}}/k_{\text{microbien}}$ obtenus pour les 84 sites d'étude, les cercles gris correspondants aux sites suivis pour la contamination par les pesticides dans le chapitre 1.	105
Figure 19 – Grille d'évaluation de la qualité fonctionnelle proposée, croisant le taux k_{total} et le ratio $k_{\text{invertébré}}/k_{\text{microbien}}$ obtenus pour les 84 sites d'étude, les cercles gris correspondants aux sites suivis pour la contamination par les pesticides dans le chapitre 1.	106
Figure S1 – Triplot des espèces d'hyphomycètes aquatiques (gris), des variables environnementales (noir) pour les 84 sites d'étude.	115
Figure S2 – Triplot des métriques de la décomposition (gris), des espèces d'hyphomycètes aquatiques (noir) pour les 84 sites d'étude.	116
Figure S3 – Triplot des décomposeurs invertébrés (gris), des variables environnementales (noir) pour les 84 sites d'étude.	117
Figure S4 – Triplot des taux de décomposition (gris) et des invertébrés benthiques déterminés à la famille et retrouvés dans les sacs à grosse maille (noir) pour les 84 sites d'étude.	118

Figure 20 – Proposition d'évaluation matricielle du statut écologique à partir des composantes structurelles et fonctionnelles.	123
Figure 21 – Evaluation matricielle du statut écologique à partir de la composante structurelle IBGN (graphique A) et IBD (graphique B) et de la composante fonctionnelle à partir des 58 sites étudiés dans la chapitre 2.....	124
Tableau 12 – Temps (en heure) nécessaire au suivi du processus de décomposition et à une évaluation complète sur 100 sites à partir de 6 répliques, composées chacune d'un sac à grosses mailles (GM) et d'un sac à fines mailles, relevées à une seule date (cf. Présent étude de thèse), comparé à celui correspondant à 7 dates de relevé et 5 répliques uniquement composées d'un sac GM, soit 35 sacs par site (Arroita et al., 2012 ; Table 3). Les évaluations ont été déterminées au niveau d'un site dans chacune des deux études, sauf pour la récolte des litières de la présente étude (100 sites). Selon les études, le nombre de répliques pour les analyses biologiques est 4 (*) ou 5 (**)..	125
Tableau 13 – Statistiques descriptives des taux de décomposition moyen et des ratios avant (a) et après suppression des valeurs aberrantes (b).	129

Chapitre 1 : Introduction générale

Les eaux courantes : des écosystèmes à protéger

Si l'on estime à $1,4 \times 10^{18} \text{ m}^3$ le volume d'eau sur Terre, les eaux douces représentent approximativement 3% de celui-ci (Shiklomanov and Rodda, 2003). En déduisant l'eau des glaciers et de la banquise, seulement 0,3% de ce volume correspond aux eaux douces continentales superficielles (dont rivières, lacs, marais, tourbières), soit l'eau douce renouvelable qui est issue du cycle de l'eau. Les synthèses scientifiques démontrent l'effet des activités humaines sur le cycle de l'eau au travers du changement de l'occupation des sols, de l'urbanisation et de l'industrialisation (ex. Gleick, 2003, Meybeck & Vörösmarty, 2004, Battarbee et al., 2015). La qualité de cette ressource connaît une forte dégradation se répercutant même sur des terres non habitées dans lesquelles on retrouve la trace et les conséquences des activités humaines, telles le dépôt atmosphérique de polluants organiques dans les eaux des lacs alpins (Schmid et al., 2007) ou l'acidification des eaux de surface par les pluies acides (Vitousek et al., 1997; Meybeck, 2003). D'après Vörösmarty et al. (2010), 80% de la population mondiale et 75% de la biodiversité sont exposées à un risque élevé d'insécurité en terme d'accès à la ressource en eau, notamment dans les régions d'agriculture intensive avec une densité humaine élevée.

Seule une proportion infime (soit environ 0,006% du volume total) d'eau douce du monde est présente dans les ruisseaux et rivières à un moment donné (Shiklomanov, 1993) et s'organise en réseaux hydrographiques, depuis l'amont avec les premiers filets d'eau en tête de bassin versant jusqu'à l'aval avec l'embouchure des fleuves au niveau des estuaires (Fig. 1). Ces milieux intègrent un biote en interaction avec les processus physiques et chimiques qui déterminent comment ces écosystèmes se structurent et fonctionnent (Allan & Castillo, 2009). Une multitude de facteurs environnementaux opèrent à différentes échelles et influencent l'écologie des écosystèmes lotiques (p. ex. Townsend et al., 2003). Le climat, la géologie et la topographie influent sur le système dans sa globalité pour déterminer entre autres le régime hydraulique, la présence régionale d'espèces (Poff, 1997), l'approvisionnement en énergie trophique, ainsi que le transport de la matière organique (Vannote, et al., 1980) et de nutriments (Newbold et al., 1982).

L'influence des activités humaines sur les écosystèmes lotiques se produit à plusieurs échelles spatio-temporelles et se traduit dans l'équilibre de ces interactions. Par exemple, le déversement ponctuel accidentel de polluants toxiques non rémanents altère les communautés sur des pas de temps allant de quelques jours à quelques années (Drake et al., 1999; Shinn et al., 2009; Thompson et al., 2015). A l'échelle de la décennie ou du siècle

se produisent des changements à long terme, comme ceux dus à l'occupation des sols (Harding et al., 1998; Allan, 2004; DeFries et al., 2004; Foley et al., 2005; Lucas et al., 2016) ou du climat (Macklin & Lewin, 2003; Palmer et al., 2008; Isaak et al., 2012). Les perturbations liées à l'appropriation des sols induisent des modifications dont les effets sur les écosystèmes lotiques s'observent à différentes échelles spatiales, du cours d'eau lui-même à la zone rivulaire et au bassin versant (Allan et al., 1997), ou à l'échelle planétaire tel que pour les flux de nutriments et de polluants (Dentener et al., 2006; Bergknut et al., 2011).



Figure 1 – Méthode d'ordination des cours d'eau selon Strahler. La hiérarchie fluviale selon la méthode d'ordination de Strahler (1957) se manifeste par l'importance croissante de ces éléments depuis l'amont avec les plus petits tributaires d'ordre 1 dont l'union forme un cours d'eau d'ordre 2 et ainsi de suite ; le numéro d'ordre croît avec la taille du bassin, le nombre de tributaires et la densité de drainage jusqu'à former les plus grands fleuves.

Au cours du XX^{ème} siècle, les recherches scientifiques ont progressivement mis en évidence l'importance de l'empreinte de l'homme sur les écosystèmes (Carson, 1962). Ceci induit aussi un changement dans la prise de conscience de nos sociétés, en ne considérant plus les eaux superficielles d'un point de vue hydraulique seulement (*i.e.* comme de simples « conduits » ou « puits ») mais comme un écosystème, support à la vie, ayant la capacité de s'autoréguler et fournir différents services à l'homme (Leopold et al., 1964). En effet, d'un point de vue anthropocentré, les écosystèmes lotiques apportent à l'humanité un grand nombre de services indispensables, dits services écosystémiques, regroupés en 5 catégories par le rapport de l'Evaluation de l'Ecosystème du Millénaire (MEA 2005, Fig. 2). Les services écosystémiques se définissent comme les conditions et les processus par lesquels les écosystèmes naturels et les espèces qui les composent soutiennent et accomplissent la vie humaine (Daily, 1997). La réalisation de ces services écosystémiques dépend de processus variés largement régulés par les organismes qui sous-tendent le fonctionnement et maintiennent les structures des écosystèmes lotiques (Palmer & Febria, 2012).

Au début des années 1970 aux Etats-Unis, un nouvel objectif politique apparaît en terme de gestion des milieux aquatiques, celui de disposer d'écosystèmes *en bonne santé* en restaurant et maintenant l'intégrité biologique des eaux (CWA, 1972) qui induisit un véritable essor des recherches en limnologie et écologie appliquée à la bio-surveillance afin de préserver la ressource en eau. Pour preuve de l'importance de la problématique de l'eau au sein de nos sociétés, le budget annuel mondial alloué à la gestion de la ressource en eau dépassait les 100 milliards de dollars à la fin du XX^{ème} siècle (Statzner et al., 1997) avec, en

Europe, 80 % du budget pour l'environnement dédiés aux domaines associés à l'eau (Commission Européenne, 1998).

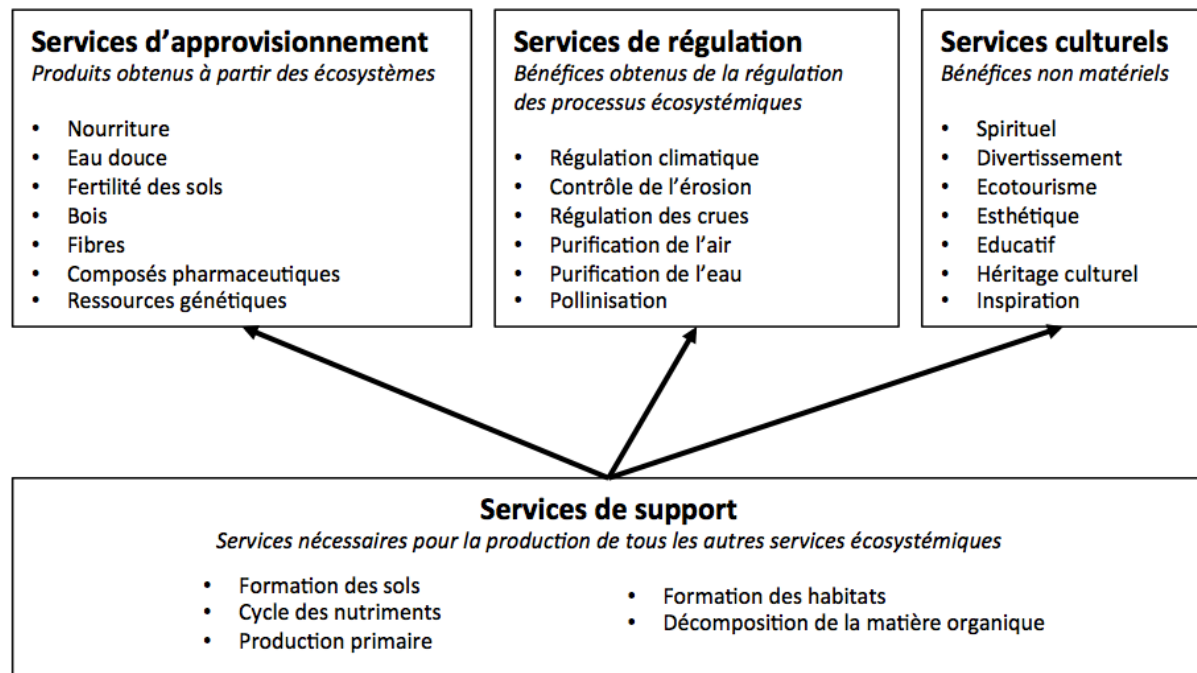


Figure 2 –. Catégories et exemples de services écosystémiques selon le cadre de l'Evaluation de l'Ecosystème du Millénaire (MEA, 2005, d'après Truchy et al., 2015).

La bio-surveillance consiste à utiliser des variables biologiques (des bio-indicateurs) pour mesurer des altérations de l'écosystème. L'avantage de la réponse biologique face aux stressseurs est de fournir une réponse directe de l'état écologique par rapport à l'information que l'on déduit des variables chimiques. Un bio-indicateur peut être à un niveau d'organisation allant de l'organisme (gène, cellule, tissus) à la population (ex : natalité, fécondité, mortalité, migration), la communauté (ex : richesse taxonomique, présence/absence de taxons polluo-sensibles) et même l'écosystème (statut trophique de l'écosystème) (Niemi et al., 2004). Les bio-indicateurs intègrent leur réponse dans l'espace et le temps, ce qui potentiellement réduit la fréquence d'échantillonnage par rapport aux paramètres chimiques pour détecter certaines perturbations de très courte durée (Friberg et al., 2011). L'usage d'indicateurs est lié au postulat qu'un certain nombre de mesures peuvent exprimer la situation écologique d'une rivière et ainsi être prises en compte à la fois pour la compréhension scientifique, les décisions de gestion et la communication du statut environnemental à une audience non spécialisée (Norris & Hawkins 2000). Un autre argument en faveur de l'étude des réponses biologiques par rapport aux données physico-chimiques est que les indicateurs biologiques intègrent leur réponse dans le temps et l'espace, ce qui permet de détecter une altération de l'écosystème tout en diminuant la pression d'échantillonnage comparée à la mise en évidence d'une altération avec les seuls paramètres physico-chimiques.

La bio-surveillance sous-tend donc les politiques de gestion et de conservation des eaux douces, dans le but de protéger les biens et services apportés par ces écosystèmes, tels qu'une eau de qualité, la production de nourriture, la régulation du climat et l'épuration des déchets (Dudgeon et al., 2006; Statzner et al., 1997; Tranvik et al., 2009; Williamson et al., 2009). Au niveau européen, la Directive européenne Cadre sur l'Eau (DCE, 2000) a permis de créer une structure législative à même de gérer, protéger et restaurer les eaux douces de surface et souterraines et les eaux transitoires. Cette approche novatrice place les écosystèmes au centre de la législation, contrairement aux précédentes directives européennes davantage focalisées sur la seule régulation des matières polluantes (p. ex. Directive 91/676/CEE, concernant la protection des eaux contre la pollution par les nitrates à partir des sources agricoles, Directive 91/271/CEE, relative au traitement des eaux urbaines résiduaires).

Evaluation de l'état écologique des eaux courantes au sein de l'Union Européenne

Le contexte réglementaire

La Directive européenne Cadre sur l'Eau du 23 octobre 2000 (DCE) donne un cadre législatif visant à prévenir, préserver et restaurer les écosystèmes aquatiques continentaux et, en ce qui concerne leurs besoins en eau, des écosystèmes terrestres et des zones humides qui en dépendent directement, afin de garantir une utilisation durable de l'eau, l'objectif étant d'atteindre le bon état écologique de tous les milieux aquatiques dans les états membres de l'Union Européenne et qu'il n'y ait aucune détérioration de l'état écologique existant.

La DCE requiert que chaque état membre identifie une typologie par masse d'eau basée sur des facteurs environnementaux fondamentaux tels que l'altitude, la géologie ou le climat, responsables de la variabilité naturelle des écosystèmes lotiques. L'état écologique par masse d'eau est ensuite comparé aux conditions de référence type pour la masse d'eau considérée. Différents « éléments de qualité » biologiques, hydromorphologiques et physico-chimiques sont pris en compte selon le type de masse d'eau étudié pour évaluer le statut écologique en les comparant aux valeurs de références en utilisant le Ratio de Qualité Ecologique (RQE ou EQR en anglais pour « Ecological Quality Ratio »). L'EQR est calculé en divisant la métrique observée par la valeur de référence pour cette métrique. Pour chaque catégorie de qualité (biologique, physicochimique et hydromorphologique), est attribuée une classe de qualité sur le principe suivant. Si une métrique est déclassée, alors c'est la catégorie de qualité dans son ensemble qui est déclassée. Enfin, les résultats pour chaque catégorie de qualité sont agrégés, en tenant compte prioritairement de la qualité biologique (Fig. 3). Le classement résultant comprend 5 classes allant d'un état écologique élevé à

mauvais (Fig. 3) dont les définitions normatives se trouvent dans l'Annexe V de la DCE (2000, Tab. 1).

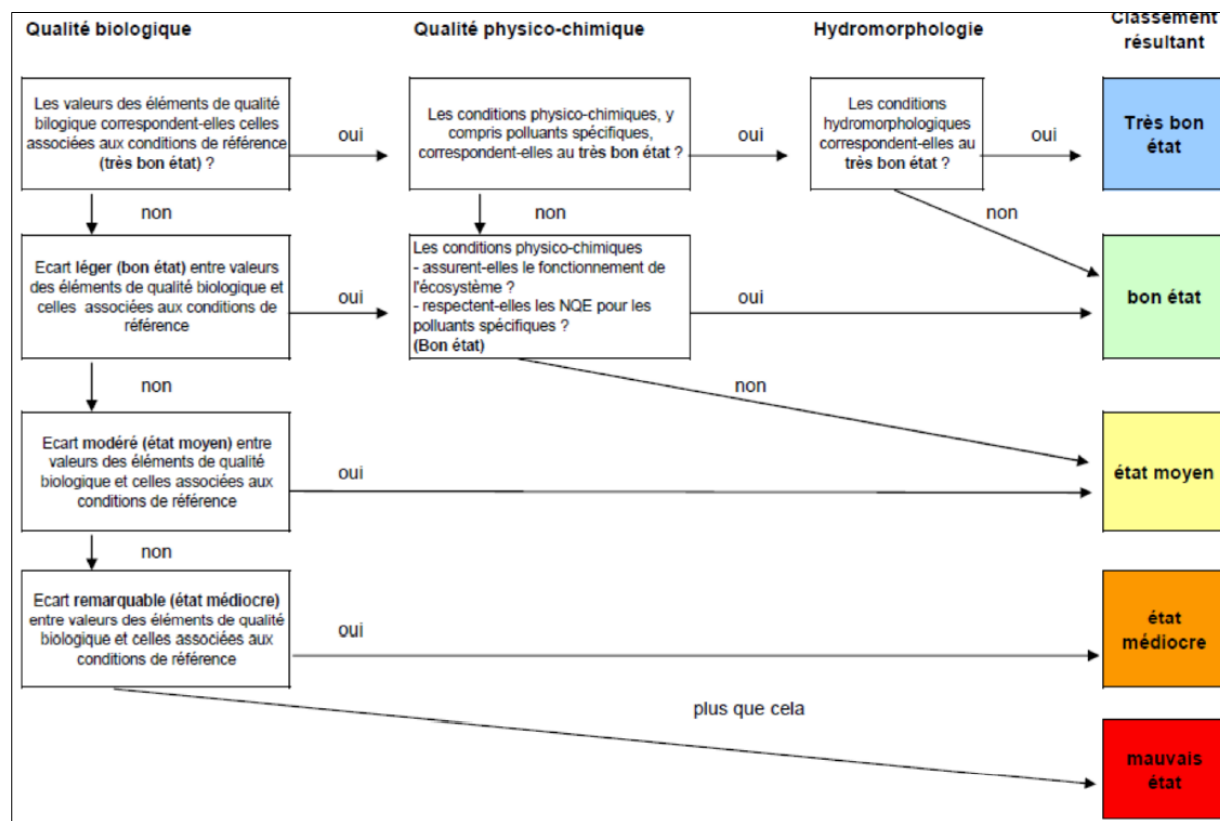
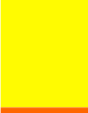


Figure 3 – Règle d'agrégation des éléments de qualité dans la classification de l'état écologique pour le type de masse d'eau considéré. Ce schéma est inspiré du document guide européen « Approche générale de la classification de l'état écologique et du potentiel écologique » (GIS WG, 2004).

Les méthodes d'évaluation développées par les états membre doivent répondre à plusieurs exigences. Les conditions de référence doivent être définies en tenant compte des variabilités naturelles. Pour ce faire la DCE propose deux systèmes de classification des masses d'eau : le système A à typologie fixe ou le système B qui permet d'adapter la typologie aux réalités du terrain et aux informations biologiques (Directive 2000/60/CEE, annexe II). Le système A propose des écorégions établies à partir de l'altitude, de la dimension du bassin versant et de la géologie (Ecorégions indiquées sur la carte A de l'annexe IX de la DCE 2000/60/CEE) établies à partir des travaux d'Illies (1978) portant sur la distribution des taxons d'invertébrés en Europe. La France a choisi le système B avec la classification des masses d'eaux en hydro-écorégions (HER), délimitées par des déterminants primaires – la géologie, le relief et le climat – et les cours d'eaux d'une même HER se caractérisent par des valeurs physico-chimiques et biologiques similaires. Ainsi pour la France métropolitaine, 22 hydro-écorégions ont été définies en cohérence avec les assemblages et la structure des communautés d'invertébrés (Wasson et al., 2002, Fig. 4). Les deux systèmes ont une approche descendante qui consiste à classer les facteurs de contrôle globaux plutôt que les facteurs influents au niveau local (caractéristiques de l'habitat physique à l'échelle de la station, hydrologie).

Tableau 1 – Définition générale des classes d'état écologique des cours d'eau en fonction des éléments de qualité d'après l'Arrêté du 27 juillet 2015.

Etat écologique	Code couleur	Définition générale
Très bon état		"Les valeurs des éléments de qualité biologique pour la masse d'eau de surface correspondent à celles normalement associées à ce type dans des conditions non perturbées et n'indiquent pas ou très peu de distorsions. Il s'agit des conditions et communautés caractéristiques. Pas ou très peu d'altérations anthropogéniques des valeurs des éléments de qualités physico-chimiques et hydromorpho applicables au type de masse d'eau de surface par rapport aux valeurs normalement associées à ce type dans des conditions non perturbées."
Bon état		"Les valeurs des éléments de qualité biologique applicables au type de masse d'eau de surface montrent de faibles niveaux de distorsion résultant de l'activité humaine, mais ne s'écartent que légèrement de celles normalement associées à ce type de masse d'eau de surface dans des conditions non perturbées"
Etat moyen		"Les valeurs des éléments de qualité biologique applicables au type de masse d'eau de surface s'écartent modérément de celles normalement associées à ce type de masse d'eau de surface dans des conditions non perturbées. Les valeurs montrent des signes modérés de distorsion résultant de l'activité humaine et sont sensiblement plus perturbées que dans des conditions de bonne qualité"
Etat médiocre		"Les eaux montrent des signes d'altérations importantes des valeurs des éléments de qualité biologique applicables au type de masse d'eau de surface et dans lesquelles les communautés biologiques pertinentes s'écartent sensiblement de celles normalement associées au type de masse d'eau de surface dans des conditions non perturbées sont classées comme médiocre"
Etat mauvais		"Les eaux montrent des signes d'altérations graves des valeurs des éléments de qualité biologique applicables au type de masse d'eau de surface et dans lesquelles font défaut des parties importantes des communautés biologiques pertinentes, normalement associées au type de masse d'eau de surface dans des conditions non perturbées sont classées comme mauvaises"

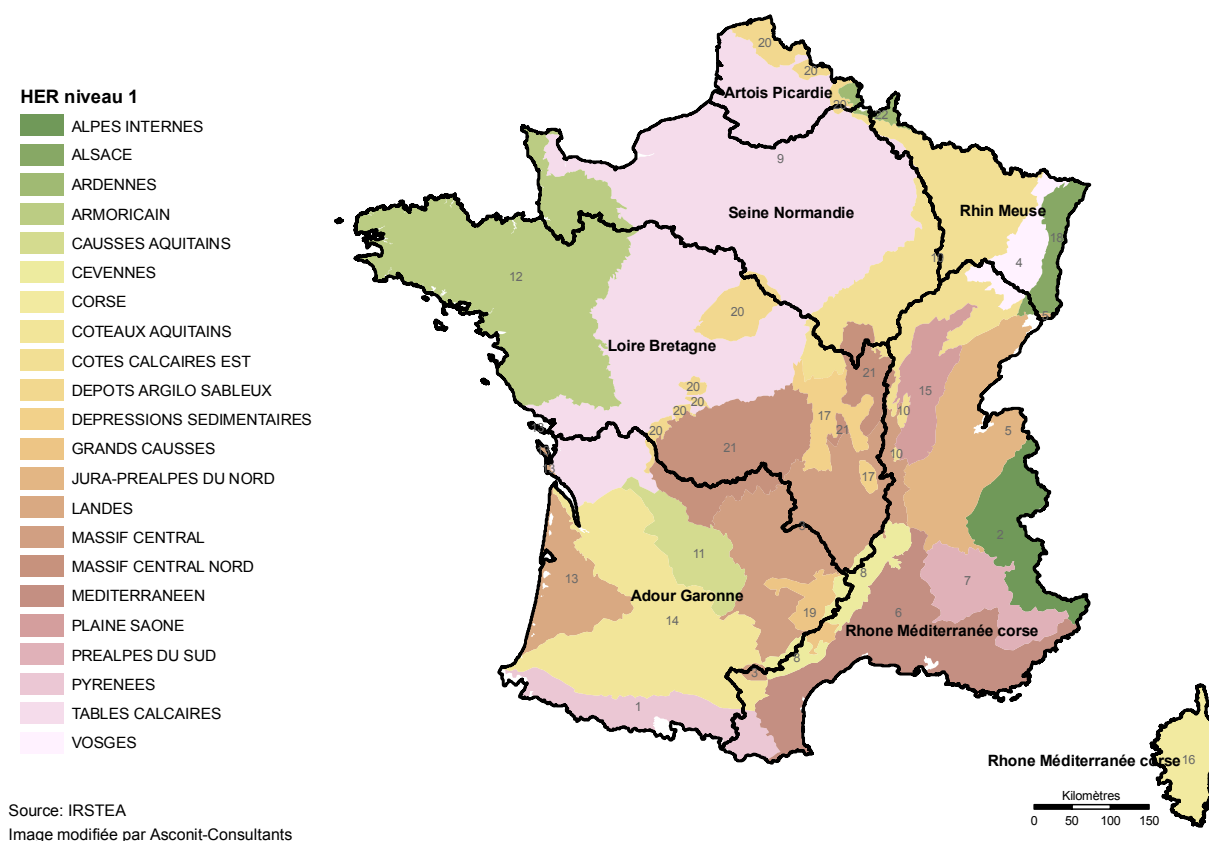


Figure 4 – Hydroécorégions de France métropolitaine distribuées par district hydrographique. Les rivières étudiées dans les chapitres 2 à 4 font partie des différentes hydroécorégions du district hydrographique Adour Garonne (exceptées les hydroécorégions n° 19, 20 et 21).

L'évaluation de l'état écologique des cours d'eau en ayant recours à un « écosystème étalon » non perturbé fait consensus auprès des gestionnaires. Toutefois il est impossible de se référer à des masses d'eau indemnes de toute perturbation anthropique en Europe, où même les zones non occupées par l'homme sont sujettes indirectement aux perturbations par le changement climatique global, les dépôts azotés ou les polluants organiques qui influencent les communautés aquatiques. Du choix de l'« écosystème étalon » dépendent l'exactitude et la précision de l'évaluation écologique (Hawkins et al., 2010), permettant la comparaison avec les écosystèmes observés. Il y a deux approches pour sélectionner les conditions de référence : (i) choisir des sites de référence (correspondant typiquement aux situations les moins impactées) ou (ii) prédire ces conditions de référence à partir des données environnementales et de la modélisation (Wright et al., 2000). Dans la première approche, les sites de référence doivent être choisis pour chaque écorégion ou hydro-écorégion afin de partager, avec les sites perturbés, les mêmes conditions environnementales naturelles (Wasson et al., 2002). La seconde approche sous-tend l'idée que les sites de référence sont fortement variables entre eux ce qui pourrait masquer des perturbations humaines. Au lieu d'utiliser des sites de référence, c'est plutôt les relations entre variables environnementales et les communautés aquatiques de l'ensemble de ces sites de référence qui sont utilisées pour évaluer les conditions écologiques de référence (Wright et al., 2000).

La DCE préconise l'utilisation des éléments de qualité biologique (EQB) – correspondant aux communautés de diatomées benthiques, macrophytes, invertébrés benthiques et poissons – utilisés séparément ou ensemble pour évaluer l'intégrité écologique des écosystèmes lotiques. Ces différents organismes ont montré qu'ils sont sensibles à une variété de perturbations anthropiques (Hering et al., 2006b). Les critères d'un indicateur pertinent sont d'être utilisable sur une zone géographique la plus grande possible et de présenter une certaine robustesse face aux facteurs de variabilité naturels et locaux. Les métriques devant être prises en compte par ces indicateurs sont la composition taxonomique, l'abondance, la proportion de taxons sensibles aux perturbations anthropiques et la diversité.

L'évaluation biologique

La DCE place les variables biologiques au centre de l'évaluation de l'état écologique, étant donné que ce sont de bons intégrateurs de perturbation des milieux aquatiques difficiles à mesurer directement (Verneaux 1973, Blandin, 1986). Les indicateurs biologiques ou bio-indicateurs sont définis comme les espèces vivantes délivrant une information du niveau d'altération d'un écosystème par une modification de leurs caractéristiques physiologiques et éthologiques (Blandin, 1986). D'un point de vue historique, l'évaluation biologique des écosystèmes lotiques est apparue à la fin du XIX^{ème} siècle alors que la démographie de nombreux pays d'Europe augmente à la suite du développement industriel, causant un accroissement des déchets produits et l'apparition de nombreuses catastrophes sanitaires (ex : choléra, dysentérie, fièvre typhoïde), tel le triste exemple de la Tamise, véritable égout à ciel ouvert causant la mort par le choléra de milliers de londoniens (Metcalf, 1989). Ainsi

les premiers indicateurs biologiques se sont basés sur le système saprobien (de saprobie qui signifie la dépendance d'un organisme aux substances organiques comme source alimentaire, Persoone & De Pauw, 1979) initié par les travaux de Kolkwitz & Marsson (1902, 1909). Les indices saprobie se construisent sur la présence d'espèces indicatrices (bactéries, algues, protozoaires, rotifères, macroinvertébrés benthiques et poissons) auxquelles a été assignée une valeur saprobique basée sur leur tolérance à la pollution organique. Pour chaque espèce indicatrice, la valeur saprobique est déterminée par observation à partir d'une courbe de réponse de sa tolérance physiologique au manque d'oxygène et représente la valeur pour laquelle la fréquence d'occurrence de l'espèce considérée est la plus élevée. L'une des listes des valeurs saprobie les plus complètes est celle de Sladeczek (1973). A partir de cette approche, la qualité de l'eau est classée en 10 catégories (de ultrasaprobe à katharobique).

Toutefois, l'approche saprobique n'a pas été retenue par la DCE car elle présente de nombreuses faiblesses pour une utilisation en routine dans l'ensemble des états membres (Tab. 3). En effet, les protocoles d'échantillonnages sont complexes (Hering et al., 2004, le niveau d'identification est élevé (à l'espèce ou au genre) et le même système saprobien n'est pas applicable au-delà de l'écorégion. Enfin, en ne reposant que sur une seule dimension de la niche des taxons indicateurs (l'oxygène), les autres dimensions (telles que la température ou les variations de débits) peuvent interférer avec la capacité de l'outil à indiquer la pollution organique, ne permettant pas une indication fiable dues aux pressions spécifiques ou à l'altération globale de l'écosystème (Bonada et al., 2006).

Trois types d'indicateurs ont été développés à partir des Eléments de Qualité Biologique : les indices biotiques, les indices basés sur les modèles prédictifs et les indices multimétriques.

L'approche biotique est l'approche qui combine la diversité sur la base de certains groupes taxonomiques avec l'indication de sensibilité d'espèces individuelles par rapport à certaines pollutions (Tolkamp, 1985). De nombreux indices biotiques ont été proposés dans chaque pays et mis en application dès la fin des années 1960 notamment en utilisant les communautés d'invertébrés benthiques, des diatomées, des poissons et des macrophytes, avec l'England's Trent Biotic Index (1964) comme méthode de référence (Metcalf, 1989).

Les deux autres approches apparaissent dans les années 1980.

L'approche prédictive se base sur des modèles statistiques prédictifs de présence d'espèces à partir de données environnementales observées sur le terrain. Le premier modèle, RIVPACS ou « River Invertebrate Prediction and Classification System » a été développé au Royaume-Uni (Wright et al., 1984, Moss et al., 1987). Le principe des modèles prédictifs est de modéliser les communautés et les caractéristiques environnementales des rivières indemnes de perturbation. Quand un site doit être évalué, ses caractéristiques environnementales sont utilisées pour prédire l'assemblage d'espèces attendu, puis sont comparés l'assemblage d'espèces observées (O) à celui attendu (A). En principe, ces modèles prédictifs requièrent un nombre substantiel de rivières indemnes de toute

perturbation anthropique pour être utilisées comme site de référence. Toutefois, dans de nombreuses régions, il est de nos jours impossible de trouver de telles conditions de référence. Les développeurs de ces modèles ont ainsi été amenés à considérer l'usage des sites « les moins perturbés » ou caractérisés par le « meilleur état disponible » pour réaliser les scores O/A (Stoddard et al., 2006), ce qui est utile pour des comparaisons de sites régionaux, mais qui complique la comparaison des scores entre régions.

La troisième approche concerne les indices multimétriques dont l'objectif est d'apporter une analyse intégrée de l'écosystème en combinant différentes catégories de métriques. Cette approche développée aux Etats-Unis avec l'Indice d'Intégrité Biologique (IBI, Karr, 1981) mesure les changements de l'état de santé des rivières à partir des métriques de 5 compartiments essentiels des rivières : la morphologie de la rivière, la chimie de l'eau, les conditions d'écoulement dans le bassin versant, les sources d'énergie et les interactions biologiques (Karr & Chu, 2000). Il a dans un premier temps été conçu pour inclure les attributs des peuplements piscicoles en 12 mesures réparties en 3 catégories : composition spécifique, composition trophique et conditions environnementales. Les données sont évaluées par rapport à ce qui est attendu sur un site peu ou pas perturbé, localisé dans une région géographique similaire et dans une portion de cours d'eau de taille comparable. Une note est attribuée à chaque métrique selon l'amplitude de l'écart aux valeurs attendues. La somme des 12 notes représente le score global pour le site d'étude. La force de cet indice est d'intégrer des informations à différents niveaux d'interprétation : individu, population, communauté et écosystème. L'indice IBI a démontré sa capacité à identifier une variété de perturbations (ex : le drainage de mines et les effluents de stations d'épuration). L'IBI a ensuite été adapté pour une utilisation avec les macroinvertébrés (Kerans & Karr, 1994) et le périphyton (Hill et al., 1999).

Les limites de l'évaluation actuelle

La pollution organique et l'eutrophisation ont longtemps été les deux principales perturbations ciblées par les programmes de bio-surveillance (Friberg et al., 2011) et de nombreux indices biotiques dérivent de l'approche saprobienne, tel que l'IBGN (Indice Biologique Global Normalisé portant sur l'étude des macroinvertébrés benthiques) en France. Pourtant la pollution organique a fortement diminué dans les pays européens grâce aux investissements dans le traitement des eaux usées. De ce fait, les pollutions secondaires sont les nouveaux objectifs de bio-surveillance et de gestion des masses d'eau (Friberg et al., 2011). Ces perturbations émergentes sont d'autant plus importantes qu'elles empêchent les masses d'eau d'atteindre un bon état écologique, malgré un progrès déjà significatif de leur qualité. Il est donc nécessaire de développer des indices qui ciblent ces perturbations et de les inclure dans les programmes de bio-surveillance, telles que les méthodologies suivantes développées récemment pour mettre en évidence l'impact de perturbations particulières à partir des communautés en place : L'AWIC (Acid Waters Indicator Community) pour l'acidification, LIFE (Lotic Invertebrate Index for Flow Evaluation)

pour l'altération des débits, PSI (Proportion of Sediment-sensitive Invertebrates) pour la dégradation physique des habitats et SPEAR_{pesticides} (SPECies At Risk) pour les pesticides.

Les indicateurs utilisés dans l'évaluation de l'état écologique des systèmes lotiques se basent sur les attributs associés aux communautés aquatiques. Toutefois leur capacité à mettre en évidence des modifications dans le fonctionnement de l'écosystème et des processus écosystémiques reste encore à démontrer (Sandin & Solimini, 2009). Le lien entre la structure des communautés et les processus écosystémiques a surtout été développé avec l'étude des traits fonctionnels (p. ex. stratégies de reproduction, régime alimentaire, Doledec et al., 1999).

L'approche des traits biologiques multiples consiste à définir par « traits » les composants du phénotype qui régulent la réponse aux facteurs environnementaux (ex : température, disponibilité de la ressource). Cette approche concerne principalement les macroinvertébrés benthiques, pour lesquels ont été caractérisés 22 traits relatifs à la biologie, à la physiologie ou aux exigences écologiques de chaque taxon à partir de données issues d'observations scientifiques (Tachet et al., 2010). Chacun des traits est subdivisé en sous-traits auxquels on attribue un codage flou en fonction de l'affinité du taxon pour le sous-trait en question, cette méthode étant également utilisée avec les diatomées où chaque taxon peut être défini par son affinité pour différents critères environnementaux (Coste et al., 2009).

Par ailleurs, le retard pris dans l'évaluation du fonctionnement des cours d'eau vient du fait que le terme fonctionnement n'a pas été défini dans la Directive, retardant l'application de ce concept en modalités opérationnelles. En 2014, l'Interface Scientifique et Politique (SPI) en charge de mettre en relation les gestionnaires et les scientifiques a reconnu l'importance de conduire une évaluation du fonctionnement écosystémique des eaux courantes (Reyjol et al., 2014).

Développement d'une évaluation des fonctions écosystémiques

Processus écosystémiques vs. structure de l'écosystème

La structure des écosystèmes se réfère aux attributs qui peuvent être évalués par des mesures ponctuelles et qui sont considérées comme reflétant le statut et les conditions existantes d'un écosystème. Toutefois, ces attributs ne permettent pas de saisir les propriétés dynamiques d'un écosystème qui représentent ses performances à un temps donné (Palmer & Febria, 2012). Le fonctionnement d'un écosystème se définit comme les effets conjugués de tous les processus qui soutiennent un écosystème (Reiss et al., 2009). Il correspond aux propriétés dynamiques de l'écosystème (Palmer & Febria, 2012). Les

fonctions de l'écosystème impliquent des interactions entre les espèces et leur environnement, permettant la transformation de la matière et de l'énergie (ex : cycle du carbone et la production primaire), la génération d'habitat (p. ex : la construction de récifs), ou le maintien des populations (p. ex : la pollinisation) (Smith et al., 2013). Odum (1962, in Matthews et al., 1982), définit les fonctions de l'écosystème comme 1) le flux d'énergie qui parcourt l'écosystème (p. ex : la productivité et la respiration des communautés), 2) le taux de transformation de la matière (p. ex : via la quantification des cycles biogéochimiques) et 3) les régulations de l'environnement sur les organismes (p. ex : le photopériodisme) et vice versa (p. ex. : la fixation de l'azote par les microorganismes) (Tab.2).

Tableau 2 – Définitions, catégories et exemples de l'analyse des composantes structurelles des écosystèmes aquatiques, d'après Matthews et al. (1982).

Structure	définition - mesure des caractéristiques biotiques et abiotiques à un temps donné	
	taxonomique	définition - analyse au niveau de l'individu ou de la communauté exemples - composition taxonomiques des communautés, indices de diversité, densité, sensibilité des organismes
	non taxonomique	définition - analyses chimiques, physiques, biochimiques ou biologiques ne requérant pas l'identification des organismes de la communauté exemples - biomasse, chlorophylle, caroténoïdes, adénosine triphosphate, acide ribonucléique
Fonction	définition - mesure du taux de quelques processus de l'écosystème	
	taxonomique	définition - analyses au niveau de l'individu ou de la communauté exemples - taux de colonisation, taux de récupération, nombre d'espèce après la perturbation
	non taxonomique	définition - taux des processus chimiques, physiques, biochimiques et biologiques exemples - production primaire, respiration, taux d'assimilation des nitrates

En appliquant ces concepts aux écosystèmes lotiques, Palmer & Febria (2012) ont proposé une liste de fonctions (non exhaustive) associées aux composantes structurelles qui contribuent ensemble à définir le statut écologique des écosystèmes lotiques (Fig. 5). Chaque fonction intègre différents niveaux spatio-temporels et donc différents stressors environnementaux (Elosegi & Sabater, 2013), permettant potentiellement de sélectionner le ou les processus d'intérêts selon les enjeux de gestion. La seule métrique fonctionnelle utilisée dans l'évaluation actuelle est la Demande Biochimie en Oxygène (DBO) qui mesure la consommation en oxygène potentielle de la colonne d'eau afin d'évaluer l'influence des rejets des stations d'épuration dans le milieu aquatique. Cependant, la mesure de la DBO quantifie le degré de pollution organique dans la colonne d'eau sans apporter aucune information sur les processus en cours dans l'écosystème pris dans sa globalité (Young et al., 2008).

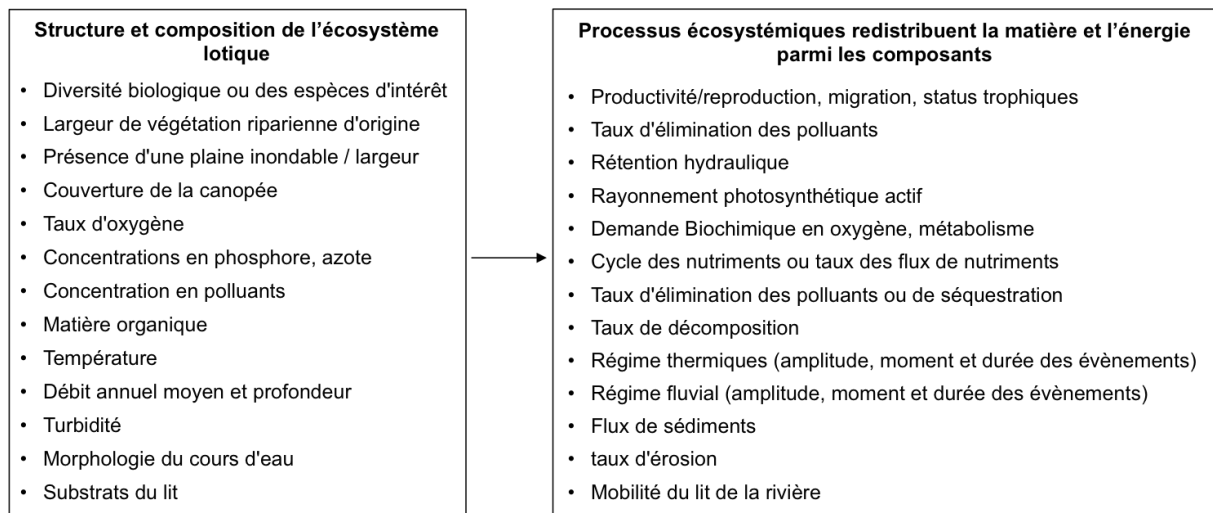


Figure 5 – Mise en relation entre les éléments qui composent l'écosystème lotique et les processus écosystémiques associés (Palmer & Febria, 2012).

Face à une perturbation de l'écosystème, on s'attend à l'un des trois types de réponses suivants (Matthews et al., 1982) :

- Un changement structurel non accompagné de modification du fonctionnement. Par exemple, certaines espèces disparaissent mais celles qui survivent sont capables de réaliser le processus. En effet, au sein d'un groupe fonctionnel, plus la diversité spécifique est importante, plus la perte d'espèces caractéristiques peut être compensée par la présence d'autres espèces aux fonctions similaires : on parle de redondance fonctionnelle. Cette notion traduit le fait que la perte d'espèces (diminution de la diversité spécifique) n'a pas forcément d'effet immédiat sur la réalisation des fonctions écologiques, car certaines espèces peuvent se substituer entre-elles.
- Une altération du fonctionnement sans qu'il n'y ait un effet sur la structure. Cela peut se produire lorsque les modifications environnementales ont des effets toxiques sublétaux, modifiant l'efficacité de réalisation du processus mais pas la structure de la communauté.
- Une modification à la fois structurelle et fonctionnelle signifiant que ces deux composantes sont intimement liées, la réduction de la complexité structurelle (par exemple, la réduction du nombre d'espèces) se traduisant en une co-réduction de la complexité fonctionnelle (ex : réduction du nombre de nœuds trophiques pour le passage de l'énergie ou des nutriments). Par exemple sur le long terme, la perte d'espèce peut tendre à fragiliser le fonctionnement des écosystèmes tant dans leur capacité à fournir des services écosystémiques que dans leur capacité à faire face aux perturbations. Si le nombre d'espèce diminue de façon trop importante, la compensation de la perte des espèces est compromise et la capacité à produire des fonctions écologiques peut être perdue.

L'évaluation actuelle du statut écologique des rivières se base sur ce dernier scénario même si, comme nous venons de le voir, l'existence d'un lien indéfectible entre métriques structurelles et fonctionnelles reste à démontrer (Covich et al., 2004). Remarquons que le débat mobilisant les écologistes depuis les 15 dernières années autour du thème intitulé B-EF (Biodiversity-Ecosystem Functioning, Naeem et al., 2010) repose largement sur l'étude (et l'existence avérée) de redondances fonctionnelles entre espèces, venant en appui du premier scénario ci-dessus et justifiant par là-même la nécessité d'une évaluation de l'intégrité fonctionnelle de l'écosystème.

Evaluation fonctionnelle idéale et maturité d'utilisation des différents processus écosystémiques

Les critères d'un indicateur fonctionnel idéal pour l'évaluation en routine de l'état écologique pourrait se baser notamment sur les critères définis par Bonada et al. (2006): (i) fondés sur des bases scientifiques solides, (ii) avec une mise en œuvre simplifiée et (iii) donnant des résultats performants.

- i. Un indicateur fonctionnel devrait dériver de concepts théoriques robustes dont on pourrait prédire la réponse *a priori* selon certains paramètres environnementaux. Cet indicateur devrait discriminer différents types d'impacts dus aux activités humaines avec le potentiel de mesurer l'impact anthropique global.
- ii. Sa mise en œuvre sur le terrain ne devrait pas coûter trop cher, avec un protocole relativement simple à mettre en place qui réduirait les coûts dus aux recours à des spécialistes.
- iii. Les résultats devraient être applicables à large échelle entre les hydroécorégions, délivrant une information pertinente sur l'impact anthropique global et les différentes pressions en particulier, sans interférence avec la variabilité naturelle spatiale et temporelle. Enfin, l'indicateur fonctionnel idéal devrait permettre de mesurer la pression anthropique sur une échelle linéaire.

Les taux de décomposition de la matière organique (Gessner & Chauvet, 2002) et le métabolisme (Bunn & Davies, 2000) sont deux fonctions qui d'après Young et al. (2008) présentent les atouts de fonctions pouvant être utilisées en routine dans les procédures d'évaluation de l'état écologique : à la fois sensibles à de nombreuses perturbations (voir les tableaux de synthèse de Young et al., 2008), simples de mise œuvre, et relativement peu chers. En effet, tous les écosystèmes lotiques sont alimentés en énergie trophique par une combinaison de matières organiques d'origine terrestre (y compris les litières de feuilles) et produites *in situ* (Vannote et al., 1980). Ainsi, les mesures du taux de décomposition des feuilles et du métabolisme de l'écosystème fournissent une indication de la base alimentaire de l'écosystème et contribuent ainsi à déterminer sa capacité à soutenir la vie. Le métabolisme est la combinaison de la production primaire (par photosynthèse) réalisée par les algues et autres plantes aquatiques et de la respiration de l'écosystème qui correspond au taux de respiration de l'ensemble du biote, y compris les poissons, les invertébrés, les

algues, les plantes aquatiques et les microorganismes. L'équilibre entre la production et la consommation de carbone organique informe de l'importance relative des deux principales sources d'énergie qui alimentent les écosystèmes des rivières, les algues ou la matière organique terrestre. Si la production de carbone organique équivaut ou dépasse le carbone consommé, alors c'est la matière organique produite *in situ* qui soutient probablement la chaîne alimentaire ; si la consommation de carbone dépasse largement la production de carbone, c'est la matière organique de l'amont ou du bassin versant adjacent qui est utilisée pour maintenir le système. Par conséquent, le métabolisme de l'écosystème fournit une mesure directe de la base trophique des écosystèmes lotiques et aide ainsi à déterminer leur capacité de survie. La définition du processus de décomposition et les arguments en faveur de sa prise en compte dans l'évaluation fonctionnelle sont décrits en détail dans la partie suivante de l'introduction.

Si ces deux fonctions sont de bons candidats pour une application en routine, la décomposition des litières bénéficie d'une littérature plus abondante en terme d'évaluation des impacts anthropiques (Tank et al., 2010, Fig. 6), ce qui représente un atout considérable quant à sa mise en application comme indicateur fonctionnel.

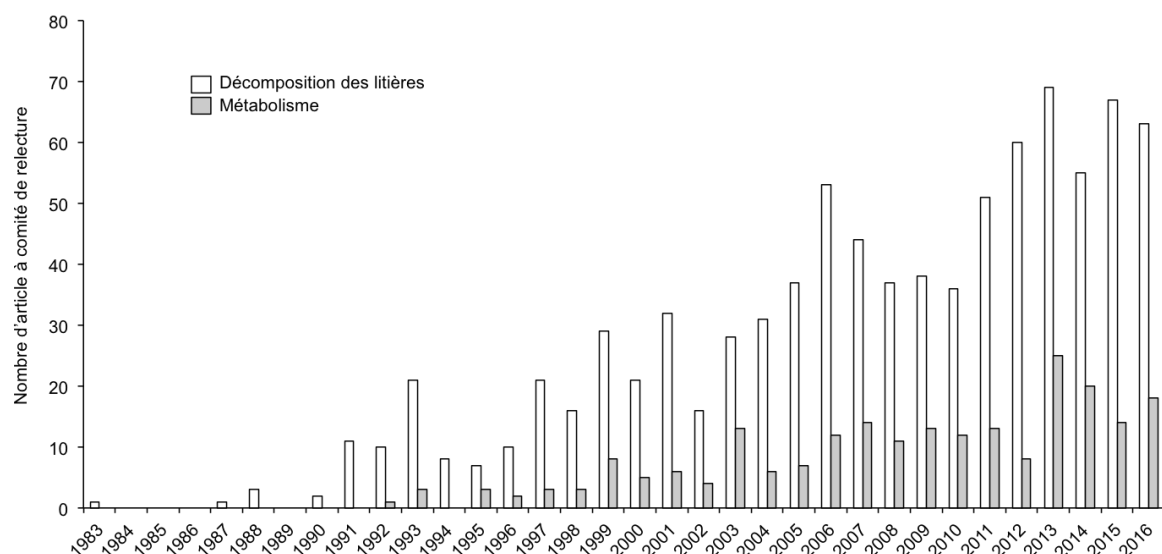


Figure 6 – Histogramme quantifiant le nombre d'études à comité de relecture relevant de l'évaluation de l'état fonctionnel des rivières à partir de la décomposition des litières et du métabolisme à partir d'une recherche dans Isi Web of Knowledge (à l'aide des mots clés suivants : (*leaf* OR *litter*) AND (*river*) AND (*breakdown* OR *decomposition*) AND (*assessment* OR *monitoring*) ; (*metabolism* OR (*primary production* AND *respiration*)) AND (*river*) AND AND (*assessment* OR *monitoring*) ; réalisé en juin 2016).

Développement d'un indicateur de l'intégrité fonctionnelle basé sur le processus de décomposition des litières

Description du processus de décomposition

La décomposition des litières végétales est un processus qui fait intervenir des facteurs chimiques et physiques et divers organismes (Petersen et Cummins, 1974 ; Webster et Benfield, 1986). Les modèles conceptuels de dynamique de la matière organique décrivent le processus de décomposition comme la dégradation de la matière organique particulaire (CPOM, > 1mm ; mais plus spécifiquement LPOM (*Large Particulate Organic Matter*), > 16 mm), qui conduit à la production de fines particules de matière organique (FPOM, <1 mm), de matière organique dissoute DOM (<0,45 µm), de composés minéraux et de dioxyde de carbone (CO₂, Gessner et al., 1999). Les décomposeurs invertébrés fragmentent la matière particulaire avec leurs pièces buccales adaptées et transforment la matière organique ingérée en biomasse, en matière particulaire fine, en matière dissoute, en minéraux et en CO₂ (Webster et Benfield, 1986). La fragmentation physique peut également se produire à la suite de l'abrasion exercée par l'écoulement de l'eau, mais son importance pour la perte de masse globale est difficile à quantifier (Gessner et al., 1999). Les expériences dans des rivières artificielles de laboratoire ont montré que, contre intuitivement, une telle fragmentation abiotique n'est pas nécessairement importante, même lorsque la vitesse du courant est élevée (Ferreira et al., 2006a).

Les litières qui entrent dans le cours d'eau sont immédiatement colonisées et rapidement décomposées par les microorganismes (surtout certains champignons aquatiques, les hyphomycètes aquatiques) et les macroinvertébrés décomposeurs. Les hyphomycètes aquatiques jouent deux rôles importants : 1) ils métabolisent une fraction importante de la litière et 2) ils « conditionnent » ces litières pour les décomposeurs invertébrés (Bärlocher & Kendrick, 1976; Bärlocher, 1985) en améliorant leur qualité nutritionnelle par l'incorporation de nutriments dans la biomasse mycélienne depuis la colonne d'eau et par la dégradation enzymatique des composés récalcitrants de la litière. Les hyphomycètes aquatiques colonisent les feuilles à partir de spores asexuées qui germent sur les surfaces végétales et développent progressivement un mycélium dans le parenchyme des feuilles. Ce mycélium sécrète des enzymes extracellulaires pour décomposer la matière organique en brisant les polymères de cellulose permettant d'accéder à des monomères carbonés beaucoup plus simples qu'il peut ensuite assimiler. Dans le même temps, le mycélium absorbe les nutriments (azote et phosphore inorganiques dissous) de la colonne d'eau qu'il concentre dans ses hyphes, rendant la litière qu'il colonise plus riche en composés azotés et phosphorés qu'au moment où la litière arrive dans le cours d'eau (Cornut et al., 2015). Cette étape est appelée « conditionnement », dans le sens où cette litière, enrichie de la matière organique constituée par les mycéliums, est préférentiellement consommée par les décomposeurs invertébrés comme nourriture plus nutritive et aussi parce que les enzymes

fongiques continuent de dégrader les polymères carbonés dans l'appareil digestif des invertébrés (Gessner et al., 1999). Par ailleurs, les hyphomycètes aquatiques sont des décomposeurs des litières à part entière, conduisant à leur transformation en matière organique particulaire et dissoute en CO₂. Ainsi ces champignons jouent un rôle fondamental dans le cycle du carbone des cours d'eau et du flux énergétique dans les réseaux trophiques (Bärlocher & Kendrick 1976). Les macroinvertébrés benthiques sont des acteurs clés des processus écosystémiques (Covich et al., 1999) et les déchetiqueurs, définis selon leur type de nourriture et leur mode d'alimentation, contribuent à la conversion de la litière de feuilles en particules plus fines et en biomasse (Cuffney et al., 1990; Gessner et al., 1999; Graça, 2001). De nombreuses études ont documenté la contribution des déchetiqueurs au processus, montrant par exemple que leur consommation peut représenter plus de 64 % de la perte de masse foliaire (Hieber & Gessner, 2002; Graça et al., 2015).

La matière organique qui se décompose dans les eaux courantes a une triple origine 1) autochtone à partir des organismes aquatiques photosynthétiques morts, 2) allochtone par transfert du matériel végétal depuis l'environnement terrestre à proximité du cours d'eau (feuilles, brindilles, fruits, bois, etc.) et 3) composite, c'est à dire constituée de la matière organique dérivant depuis l'amont. Le processus de décomposition porte principalement sur les apports allochtones (Webster & Benfield, 1986). Ces apports allochtones peuvent s'élever à plusieurs centaines de g par m² de lit de rivière sous climat tempéré (Abehlo, 2001), avec un pic automnal intervenant après la sénescence du matériel végétal. L'apport relatif de litière (c'est à dire rapporté à la largeur du cours d'eau) décroît à mesure que la taille de ce cours d'eau augmente, avec à titre d'exemple les ruisseaux du Québec d'ordre 1 ayant un apport de 761 g.m⁻².an⁻¹ contre 3 g.m⁻².an⁻¹ pour des grandes rivières d'ordre 5 (Benfield, 1997). Sont principalement concernées les rivières de tête de bassin comprises entre les ordres 1 à 3, où la canopée de la forêt rivulaire exerce un contrôle maximal sur les processus écologiques (Cummins, 1974), d'une part par l'ombrage de la canopée qui maintient au frais l'eau en été et joue un rôle tampon dans les variations nycthémérales et saisonnières de la température (Moore et al., 2005), d'autre part par l'interception des rayons lumineux qui limite la production primaire par les plantes et les algues, et enfin par l'apport de litières qui constituent de 80 à près de 100% de la ressource en carbone organique pour le réseau trophique aquatique (Vannote et al., 1980). Par conséquent, les communautés aquatiques des rivières de tête de bassin se caractérisent par une forte dépendance de ces apports allochtones. Toutefois, les apports de litière peuvent rester très substantiels dans les grandes rivières et les fleuves. A titre d'exemple, l'apport direct de litière représente 4 t par an et km de rivière sur un tronçon d'ordre 6 de la Garonne, à l'amont de Toulouse (Chauvet & Jean-Louis 1988).

Potentialités de la décomposition des litières comme indicateur fonctionnel

Selon les critères d'un indicateur fonctionnel idéal pour l'évaluation en routine de l'état écologique des écosystèmes lotiques à partir des critères de Bonada et al. (2006), la mesure des taux de décomposition dispose de :

- i. *Fondements scientifiques robustes* : Ce processus est à la base des réseaux trophiques hétérotrophe en incluant la transformation de la matière organique par différentes communautés, depuis les microorganismes jusqu'aux invertébrés ; l'intensification des pressions anthropiques induit une réduction de la complexité du réseau trophique diminuant l'efficacité de la décomposition des litières organiques (Friberg et al., 2011) qui à long terme peut altérer les flux élémentaires comme ceux du carbone et des nutriments (Rosemond et al., 2015). De plus, un grand nombre d'études ont examiné les facteurs contrôlant la décomposition permettant d'établir *a priori* la réponse à la variabilité naturelle et à la plupart des perturbations (Young et al., 2008).
- ii. *Protocoles faciles à mettre en œuvre* : Avec un potentiel de standardisation du protocole élevé, son coût économique est moindre, en raison d'un gain de temps par la préparation d'un nombre élevé d'unités expérimentales (p. ex. Tab. 12) et l'absence d'espèces à identifier (Gessner & Chauvet, 2002). On obtient une réponse simple et claire en utilisant les taux de décomposition comme variable réponse (Chauvet et al., 2016).
- iii. *Réponses performantes en terme de gestion* : La décomposition des litières est un processus applicable à l'échelle de l'Europe avec une comparaison possible entre les hydroécorégions (Woodward et al., 2012, Chauvet et al., 2016) et même entre les biomes à l'échelle du globe (Boyero et al., 2015), pouvant être mesuré dans tous les milieux aquatiques, des cours d'eau de tête de bassin aux grandes rivières et dans les lacs et estuaires, dont la réponse est sensible à de nombreuses perturbations anthropiques (Gessner & Chauvet 2002, Young et al., 2008, Chauvet et al., 2016), permettant ainsi d'évaluer l'état écologique des rivières (p. ex. Pascoal et al., 2003, Lecerf & Chauvet 2008b). Toutefois, l'évaluation de l'effet de la variabilité naturelle due aux facteurs environnementaux (variabilité extrinsèque) et de celle due au protocole lui-même (variabilité intrinsèque) n'est pas encore maîtrisée (Hagen et al., 2006, Chauvet et al., 2016).

En résumé, la décomposition répond au moins partiellement à l'ensemble des critères définis par Bonada et al. (2006, Tab. 3). Les paragraphes suivants s'attachent à décrire les protocoles de suivi de la décomposition.

L'étude de la décomposition des litières végétales par la méthode de perte de masse à l'aide de sacs à litière est actuellement utilisée par la majorité de la communauté scientifique. Le protocole résumé ici est décrit par Bärlocher (2005). Une quantité connue de litières végétales (feuilles ou bois) est conditionnée soit dans des sacs à fines mailles afin d'en limiter l'accès uniquement aux microorganismes (décomposition microbienne) soit dans des sacs à grosses mailles pour permettre l'accès à la totalité des acteurs (macroinvertébrés et microorganismes). La litière est pesée avant et après incubation dans le cours d'eau de manière à obtenir la perte de masse due au processus de décomposition. La capacité de cette méthode à détecter les perturbations de l'écosystème a été plusieurs fois vérifiée, et elle a été inventoriée par Gessner et Chauvet (2002) et Young et al. (2008).

Tableau 3 – Résumé des résultats de l'analyse comparative des approches de biosurveillance traditionnelles (associées à la structure des communautés des invertébrés) et celles en cours de développement (traits fonctionnels et processus écosystémiques), d'après Bonada et al. (2006).

	Structure des communautés			Traits fonctionnels	Processus écosystémiques
	Approches saprobiques	Approches multimétriques	Approches prédictives	Approche multi-traits	Décomposition des litières
Raisonnement					
1) Dérivé de concepts d'écologie solides	✓	±	✓	✓	✓
2) A priori prédictif	X	±	±	✓	±
3) Potentiel d'évaluer le fonctionnement écologique	X	±	?	✓	✓
4) Potentiel de discriminer la pression anthropique globale	X	✓	✓	✓	✓
5) Potentiel de discriminer différents types d'impacts humains	X	✓	±	✓	±
Mise en œuvre					
6) Faible coût pour l'échantillonnage (approches de terrain) ou pour les expérimentations (approches en laboratoire)	X	±	✓	✓	✓
7) Protocole d'échantillonnage simple	X	±	✓	✓	X
8) Faible coût d'identification (pas de spécialistes en taxonomie nécessaires)	X	±	±	✓	✓
Performance					
9) Applicable à large échelle (au travers d'écorégions et de provinces biogéographiques)	X	X	X	✓	✓
10) Indication fiable de l'évolution de l'impact humain global	X	±	±	✓	±
11) Indication fiable de l'évolution des différents types d'impact humain	X	✓	?	?	±
12) Indication d'impact humain à l'échelle linéaire	X	X	±	?	✓

Les métriques qui expriment la vitesse à laquelle la matière organique se décompose sont les plus faciles à mettre en œuvre. La méthode la plus simple est le calcul de la proportion de la masse sèche restante par rapport à la masse sèche initiale après un certain temps d'exposition. Toutefois, cette méthode nécessite de connaître la forme de la relation entre la perte de masse et le temps ; ainsi celle-ci peut être linéaire, lorsqu'une quantité constante de matériel est décomposée par unité de temps. De fait, il a été démontré que la dynamique de la décomposition suivait généralement un modèle exponentiel négatif. Le principe est qu'une proportion constante de matériel est décomposée pour chaque unité de temps (Petersen & Cummins 1974). Les taux de décomposition peuvent être corrigés en tenant compte de certains facteurs de variation naturelle. Si une différence de température est attendue entre des sites d'étude et que la température de l'eau est mesurée en continu, alors l'effet de la température sur le taux de décomposition peut être corrigé en utilisant les degrés-jours¹ comme expression du temps à la place du nombre de jours (Minshall et al., 1983). Par ailleurs, il est possible d'exprimer la masse restante comme la masse sèche sans cendre pour limiter le biais dû à l'addition de sédiments fins, de nature essentiellement minérale, aux litières composées pour l'essentiel (90-95%) de matière organique.

¹ Le degré jour est utilisé pour évaluer le temps de croissance des plantes et des animaux aquatiques poïkilothermes (c.à.d. les animaux ayant une température interne qui varie avec celle du milieu).

Objectif de la thèse et organisation du mémoire

Contexte

La présente étude a été réalisée dans le sud-ouest de la France et plus précisément dans l'un des 110 districts hydrographiques que compte l'Union Européenne, le district Adour-Garonne qui est l'un des six districts français sur lequel l'Agence de l'eau Adour-Garonne exerce ses missions de lutte contre la pollution et de protection des milieux aquatiques. Avec une surface de drainage d'environ 116 000 km², il comprend 120 000 km de cours d'eau et 420 km de littoral, répartis sur les bassins versants de l'Adour, de la Charente, de la Garonne et les cours d'eaux côtiers charentais et aquitains. Concernant les activités anthropiques sur le territoire, il s'agit d'un district à dominante agricole avec des cultures céréalières et maraichères, de la polyculture et de l'élevage (bovins, ovins, caprins, palmipèdes). Ces d'activités sont liées à la ressource en eau tant au niveau de leur besoins que de leurs impacts, notamment les pesticides avec plus de 14 000 tonnes par an utilisées sur les bassins de la Garonne de l'Adour et de la Charente (rapport de l'Agence de l'Eau Adour-Garonne, 2015).

L'objectif spécifique de la thèse est d'appliquer un protocole de routine de suivi de la décomposition des litières à une échelle régionale, depuis les bassins versants de l'Adour, de la Garonne, de la Charente aux petits fleuves côtiers landais. Quatre acteurs de la gestion environnementale ont financé ce projet : (1) l'Agence de l'Eau Adour-Garonne, (2) un bureau d'étude spécialisé dans le diagnostic environnemental, Asconit-Consultants, (3) les établissements supports de l'unité mixte de recherche EcoLab, ainsi que (4) l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie puisqu'il s'agit d'une thèse CIFRE. L'intérêt d'un tel partenariat a été de bénéficier des connaissances portant sur les caractéristiques du bassin Adour-Garonne, de la mise à disposition des données d'évaluation structurelles existantes (physiques, chimiques et biologiques) et d'envisager un transfert des connaissances de la recherche fondamentale vers les services publics en charge du suivi de la qualité de l'eau, ainsi que du secteur privé.

Objectifs de la thèse et organisation du mémoire

L'objectif de la thèse est de documenter, à l'échelle du sud-ouest de la France, l'utilisation de la décomposition des litières et des métriques associées comme indicateur de l'intégrité fonctionnelle des écosystèmes de rivière. Le choix s'est porté sur le développement d'un indicateur fonctionnel à la fois simple, standardisé et économique, autant d'arguments indispensables pour une potentielle transposition vers une application en routine par les gestionnaires. Ainsi, le protocole d'étude sur l'ensemble de la thèse a porté sur une seule litière végétale (l'aulne glutineux) caractéristique de la végétation rivulaire, incluse dans deux types de sacs pour distinguer l'activité des décomposeurs microbiens et invertébrés,

prélevée après un temps unique d'incubation dans les rivières correspondant à une perte de masse approximative de 50 % dans les sacs à grosses mailles.

Nous supposons qu'un tel protocole est suffisamment sensible pour dégager l'influence de perturbations dans les cours d'eaux multi-impactés, caractéristiques d'une région avec de nombreuses terres agricoles comme le sud-ouest de la France. C'est l'objet du **second chapitre** qui traite de la capacité du processus à discriminer la pollution par les pesticides dans les rivières agricoles. La pertinence d'utiliser un indicateur fonctionnel est qu'il apporte une information « orthogonale » et donc complémentaire par rapport à l'information qui est mise en évidence par l'évaluation structurelle à partir des éléments de qualité biologique, et de ce fait qu'il enrichit et précise l'évaluation de l'intégrité des écosystèmes. Comme le processus de décomposition est essentiellement réalisé par les communautés aquatiques, il est envisageable que les réponses des évaluations fonctionnelles et structurelles soient, en partie du moins, redondantes. Le **troisième chapitre** apporte des éléments de réponse, en comparant l'évaluation biologique, réalisée en routine à partir des indicateurs biotiques basés sur les invertébrés (IBGN et I₂M₂) et les diatomées (BDI), à l'évaluation fonctionnelle à partir du processus de décomposition. Enfin, dans l'optique d'une proposition d'un indicateur fonctionnel basé sur le processus de décomposition, il s'agit d'avoir recours à des métriques simples, synthétiques et exploitables par des personnes non spécialistes. En se basant sur les travaux de Gessner & Chauvet (2002), qui proposèrent à la fois des métriques et seuils, l'objet du **quatrième chapitre** est de traiter les patrons de distribution des paramètres de la décomposition sur l'ensemble de nos sites et des sites de référence issus de littérature et de proposer une grille d'évaluation de l'intégrité fonctionnelle pertinente pour le sud-ouest de la France. Dans la discussion générale, les principaux résultats sont placés dans un même contexte et les perspectives sont ouvertes, notamment sur la question cruciale de l'évaluation de la variabilité due au protocole lui-même ainsi que du recours à des valeurs de référence.

Chapitre 2 : Evaluation de l'intégrité fonctionnelle des cours d'eau impactés par les pesticides

Litter breakdown for ecosystem integrity assessment also applies to streams affected by pesticides

Ce chapitre présente un article publié dans *Hydrobiologia* (cf. Annexe) et d'une communication affichée à une conférence internationale ²

Résumé du chapitre

Dans ce chapitre, je me suis intéressée à l'impact des pesticides sur les taux de décomposition et des communautés de décomposeurs invertébrés et fongiques associées. Des études antérieures ont montré que le processus de décomposition était plus sensible que d'autres fonctions écosystémiques (ex : production primaire, respiration) vis à vis de la contamination par les pesticides. Cependant, les précédentes études menées sur le terrain mesurent une baisse du taux de décomposition qui s'explique soit par une baisse d'activité due à l'activité des décomposeurs invertébrés soit due à l'activité des décomposeurs microbiens. D'autre part, les indicateurs structurels classiques ne se sont pas montrés pertinents pour discriminer la contamination par les pesticides, tandis qu'un indicateur structurel basé sur les traits de vie de certains taxa d'invertébrés, SPEAR_{pesticide}, s'est révélé pertinent à large échelle (France, Allemagne, Australie). Aussi notre objectif a été d'évaluer l'effet des pesticides sur le processus de décomposition dans des sites de suivi de l'Agence de l'Eau Adour-Garonne pour vérifier les hypothèses suivantes : 1) la réponse du taux de décomposition à la contamination par les pesticides est monotone et décroissante, 2) la décomposition réalisée par les invertébrés est plus affectée que celle réalisée par les microorganismes puisque très peu de fongicides ont été détectés, 3) les métriques associées aux décomposeurs invertébrés et fongiques (densité des détritivores, taux de

² Brosted M., Lamothe S. & Chauvet E. « Litter decomposition in farmland streams : is the influence of pesticides measurable ? » au Detrital Dynamics meeting du groupe d'Ecologie Aquatique de la Société Britannique d'Ecologie du 21 au 25 juillet 2014 à Londres (Royaume-Unis).

sporulation et biomasse fongique) répondent de la même façon similaire au gradient de contamination par les pesticides que les taux de décomposition respectifs. L'objectif secondaire a été de déterminer la complémentarité de l'évaluation structurelle à partir de l'indice SPEAR_{pesticide} et de l'évaluation fonctionnelle à partir du processus de décomposition.

L'étude s'est basée sur une approche corrélative de l'évaluation de la toxicité des pesticides, à partir des taux de décomposition et des métriques associées aux décomposeurs (richesse taxonomique, densité des détritivores, taux de sporulation et biomasse fongique) et SPEAR_{pesticide}. A partir de la base de données de l'Agence de l'Eau du bassin Adour-Garonne, 12 sites ont été sélectionnés le long d'un gradient de contamination par les pesticides avec par ailleurs des caractéristiques physicochimiques proches. La contamination par les pesticides est exprimée à partir soit de l'unité toxique maximale (mTU), soit de la somme des unités toxiques (sTU) pour les espèces modèles *Daphnia magna* pour les invertébrés et diverses algues vertes pour les microorganismes. Sur chacun des sites, les taux de décomposition moyens ont été calculés à partir de six répliques constituées d'un sac fine maille (vide de maille de 0,5 mm) et d'un sac grosse maille (9 mm) contenant chacun $4 \pm 0,4$ g de feuilles d'aulne récoltées après abscission. Chaque réplique est placée en zone de courant et retirée après 21 jours d'exposition. La biomasse fongique, le taux de sporulation et la richesse taxonomique en conidies ont été mesurés à partir de la litière restante des sacs fines mailles, tandis que la richesse taxonomique, la densité des détritivores et l'indice SPEAR_{pesticides} ont été calculés à partir de la macrofaune (> 0,5 mm) retrouvée dans les sacs grosses mailles.

Le taux de décomposition est divisé par deux entre le site le moins et le plus contaminé par les pesticides (gradient mTU_{*Daphnia magna*} compris entre -5,60 et -1,81) et la diminution du taux de décomposition est monotone le long du gradient de contamination. Seule l'activité des décomposeurs invertébrés est affectée par la contamination, induisant une décomposition des litières végétale co-assurée par les compartiments invertébré et microbien dans les sites les moins contaminés à un processus réalisé seulement par le compartiment microbien dans les sites les plus contaminés. La richesse taxonomique, la densité des décomposeurs invertébrés et l'indice SPEAR_{pesticides} suivent la même tendance que le taux de décomposition réalisé par les décomposeurs invertébrés, tandis que la biomasse fongique, le taux de sporulation et la richesse taxonomique des conidies ne sont pas affectés par la toxicité des pesticides. Par conséquent, le fait que la décomposition microbienne ne compense pas le déclin de la décomposition réalisée par les invertébrés compromet la décomposition des litières végétales dans les cours d'eau les plus contaminés. De plus, cette perturbation dans le processus de décomposition est observée - même dans le site le plus contaminé - à des concentrations en pesticides inférieures aux seuils limites fixés par l'Union Européenne. Cette étude met ainsi en évidence que le processus de décomposition et plus particulièrement le rapport de l'activité des invertébrés par rapport à l'activité microbienne sont pertinents pour évaluer l'intégrité fonctionnelle dans les cours d'eaux impactés par les pesticides.

Introduction

Due to modifications directly or indirectly caused by human activities, the evaluation of ecosystem functions in streams and rivers has become an important objective to reach, in complement to current bioassessment tools mainly based on fish, macrobenthos, diatom and macrophyte communities (Reyjol et al., 2014). Ecosystem functions correspond to the flow of matter and energy regulated by biotic and abiotic factors occurring in the ecosystem itself and its adjacent environments. Assessing stream functions thus responds to a holistic approach of ecosystem health evaluation. It relies on a variety of biological processes, by focussing on the quantification of fluxes and rates and integrating both a temporal dimension and the activities of organisms at different levels of organization (Bunn & Davies, 2000; Palmer & Febria, 2012). A number of ecosystem-level processes have been proposed for stream bioassessment, encompassing ecosystem metabolism (gross primary production and community respiration), leaf litter breakdown, and nutrient cycling (Gessner & Chauvet, 2002). Among these, leaf litter breakdown has generated many studies focused on a variety of functional impairments, for instance regarding stream water quality, channel hydromorphology and riparian vegetation (e.g., Lecerf & Chauvet, 2008b; Kominoski et al., 2011; Woodward et al., 2012; Elosegi & Sabater, 2013). Leaf litter breakdown is a key process for stream ecosystem sustainability as a driver of matter and energy for the aquatic food web derived from terrestrial sources. By implying both macroinvertebrates and microorganisms, this process results from the activity of a wide variety of organisms with diverse traits and biological requirements and potentially exhibiting differential sensitivity to the functional impairments. Gessner & Chauvet (2002) have proposed to discriminate invertebrate-driven and microbial-driven breakdown to improve robustness and sensitivity of litter breakdown assays.

Detection of pesticides and their transformed products in aquatic ecosystems is difficult, not only due to the diffuse character of this contamination of agricultural origin and their widespread occurrence, particularly that of herbicides, but also to the very low concentrations found in natural waters (most often $< 1 \mu\text{g L}^{-1}$). In addition, field studies may fail to determine specific effects of pesticides, simply because they are mixed with confounding factors (e.g., heavy metals; Cheng et al., 1997; Piscart et al., 2011). Therefore, sampling and analysing all ecotoxicologically relevant substances entering a water body is challenging. The assessment is further complicated by the scarcity of data on potential effects of individual (and mixed) compounds on species in the target system. Finally, confounding effects on aquatic communities from other anthropogenic stressors may also co-occur in agricultural areas (e.g., riparian forest clearcutting, stream channelization, nutrient enrichment). On one hand, conventional bioassessment indices for water quality fail to attribute any observed changes in biological communities to pesticide contamination (e.g., Beketov et al., 2009). On the other hand, a specific indicator based on functional traits of invertebrates, the SPECies At Risk indicator for pesticides (SPEAR_{pesticide}), has proven its efficiency to detect the effects of

pesticide contamination on aquatic taxa (Liess & Von der Ohe, 2005; Schäfer et al., 2007). This indicator uses both physiological and biological traits (sensitivity to toxicants; generation time, dispersal capacity and length of life stages outside the aquatic habitat; respectively) to determine the fraction of the abundance of sensitive taxa in communities. $SPEAR_{\text{pesticide}}$ has been shown to be relatively constant over reference sites from different ecoregions and to respond to pesticide stress (Liess & Von der Ohe, 2005; Liess et al., 2008; Von der Ohe & Goedkoop, 2013) while the effects detected by this metric have been shown to translate into losses of regional biodiversity (Beketov et al., 2013). In addition, macroinvertebrates may be influenced by pesticides in their physiological and behavioural activity, not only through exposure to the water phase but also via food uptake. As an illustration, insecticide exposure at field relevant concentrations has been shown to cause feeding inhibition of mayflies and oligochaetes (Alexander et al., 2007). Feeding inhibition in *Gammarus* subjected to short-term pulse exposure of a pesticide mixture may be strongly detrimental to the energy transfer along the food chain in the aquatic ecosystem (Bundschuh et al., 2013).

In contrast to individual or community scales, no metrics have been applied to assess the impact of pesticides on ecosystem-level processes. Meta-analyses revealed that leaf breakdown tends to be more sensitive to pesticide contamination than other functional endpoints, such as gross primary production and ecosystem respiration (Schäfer et al., 2012a; Peters et al., 2013). Individual studies that have examined litter breakdown reported contrasting results about the origin of loss in process rate, depending on whether it was mostly related to a decrease in the activity of macroinvertebrate (Schäfer et al., 2007, 2012b) or microbial (Rasmussen et al., 2012a) decomposers. A recent meta-analysis has shown that streams with very low nutrient concentrations were more sensitive to nutrient enrichment than streams exhibiting medium to high concentrations (Ferreira et al., 2015). While nutrients may be limiting in oligotrophic waters where even low nutrient increments may stimulate leaf decomposers, particularly aquatic fungi, nutrient saturation occurs in eutrophic rivers, often in interference with compounds with detrimental effects such as pesticides and heavy metals, resulting either in the absence of positive influence of nutrients or in a substantial abatement of breakdown rates (Woodward et al., 2012). A similar saturation pattern is not expected with pesticides as their concentrations in natural waters, even when considering additive effects of various compounds, generally lie by several orders of magnitude below the acute lethal concentrations determined for aquatic organisms such as *Daphnia magna* Straus or green algae (Brock et al., 2006; Schwarzenbach et al., 2006). A unimodal negative relationship between pesticides toxicity and leaf breakdown rate is thus predictable.

Our study was based on a correlative approach where we investigated the relationship of pesticide toxicity with leaf litter breakdown and leaf-associated decomposers in 12 agricultural streams of southwestern France, which were selected along a gradient of pesticide concentrations but otherwise exhibiting similar characteristics. Leaf breakdown was measured using leaf bags with large or fine mesh, allowing to discriminate the contribution of macroinvertebrates and microbial decomposers, respectively. This assessment was performed in late winter, at the end of a year of pesticide monitoring using grab water

sampling, with the objective to detect long-term pesticide effects on ecosystem functional endpoints. Concentrations in pesticides were expressed in terms of toxic unit (TU) to model organisms (Backhaus & Faust, 2012). We hypothesized that (1) total breakdown rate was depressed at the most contaminated sites, (2) invertebrate-driven breakdown was more affected than microbial-driven breakdown due to the higher sensitivity of leaf-shredding invertebrates compared to leaf-colonizing fungi in our streams where herbicides dominated, and (3) the abundance and activity of macro- and micro-decomposers were consistent with the response of breakdown rate, as their density and activity were assumed to be similarly impacted by pesticide toxicity. Our underlying motivation was to determine the extent to which the information drawn from leaf breakdown and associated parameters is complementary to the dedicated index $SPEAR_{pesticide}$, when the objective is to evaluate the functional status of stream ecosystems impaired by pesticides.

Methods

Study sites

Our sites were selected in the Côtéaux Aquitains (South West of France), a relatively homogeneous European hydroecoregion in terms of geologic substratum (detritic materials), topography (flatland) and climate (Mediterranean and oceanic influences) (Wasson et al., 2002). Agriculture is the dominant land use with small forest patches and some urban areas being embedded in the landscape. Our 12 surveyed sites corresponded to permanent, 2nd to 4th order streams regularly monitored by the Adour-Garonne Water Agency for water quality, including pesticides concentration. Except for pesticide load, they exhibited similar characteristics, rather typical of lowland agricultural streams (Table 4). None of them was subject to dredging or weed cutting during the study period. Our selection of streams covered a low-to-high range of pesticide toxicity (see below).

Table 4 - Location and physicochemical characteristics of stream water of the 12 sites ranked according to the increasing pesticide toxicity (mTUD.magna). S1: Boulouze, S2: Agros, S3: Gimone, S4: Tescou, S5: Orbe, S6: Touch, S7: Sausse, S8: Petit Midour, S9: Girou, S10: Bergon, S11: Ayroux, and S12: Rieu-Tort Dominant substrata consist in C: clay, Sa: sand, G: gravel, M: mud, P: pebble, Si: silt, and B: boulder. Water temperatures correspond to mean values over the 21 d of leaf litter exposure. For pH, conductivity, and concentrations in dissolved oxygen and inorganic nutrients, values refer to the mean and range (in parentheses) from March 2012 to March 2013. Maximum toxic unit and sum of toxicity unit maxima for *Daphnia magna* and algae together with SPEARpesticide at each site are indicated.

	Boulouze	Agros	Gimone	Tescou	Orbe	Touch	Sausse	Petit Midour	Girou	Bergon	Ayroux	Rieu-Tort
Longitude	43°34'29	43°46'19	43°17'32	43°54'52	43°47'34	43°23'02	43°38'48	43°41'53	43°33'57	43°39'04	44°02'40	43°55'26
Latitude	01°02'18	02°00'02	00°37'51	01°45'59	00°49'03	01°10'25	01°29'02	00°02'40	01°52'55	-00°07'23	00°58'10	01°21'46
Stream order	3	3	2	3	3	4	4	4	4	4	3	4
Elevation (m)	149	157	283	185	159	213	137	108	192	133	105	89
Dominant substrata	C, Sa	G, M, P	C, G, P	Si	G	G, P, Sa	G, P, Si	C, G, Sa	B, C, P, Sa	P	G, P	C, P
Water Temperature (°C)	8.10	7.60	6.47	5.66	7.99	7.67	7.09	7.46	7.34	7.86	7.10	6.19
pH	8.2 (7.8-8.4)	8.1 (7.9-8.3)	7.9 (7.2-8.7)	7.8 (7.7-7.9)	8.3 (7.8-8.7)	8.0 (7.7-8.4)	7.8 (7.0-8.5)	8.1 (7.8-8.6)	7.8 (7.4-8.0)	7.9 (7.2-8.5)	7.93 (7.35-8.4)	7.9 (7.6-8.3)
Conductivity (µS.cm⁻¹)	523 (79-782)	681 (628-719)	175 (134-227)	577 (534-621)	799 (735-861)	439 (285-685)	609 (285-826)	573 (467-641)	632 (114-803)	485 (301-588)	697 (442-853)	926 (659-1126)
[O₂] (mg.l⁻¹)	8.6 (4.5-13.7)	11.4 (9.1-13.0)	10.4 (7.5-12.2)	9.0 (5.3-12.6)	8.2 (5.5-11.9)	9.9 (6.1-14.1)	7.8 (3.9-11.8)	6.7 (0.8-8.9)	8.9 (7.6-11.1)	8.8 (4.8-13.2)	8.9 (4.9-13.1)	8.8 (5.4-11.2)
[N-NO₃] (mg.l⁻¹)	1.05 (0.41-1.72)	9.70 (6.5-14.45)	0.81 (0.23-2.71)	1.47 (0.11-5.13)	8.76 (1.6-15.47)	1.72 (0.45-5.87)	2.53 (0.68-5.42)	2.47 (0.23-5.04)	3.63 (0.63-10.55)	5.42 (2.71-7.68)	2.61 (0.83-5.69)	2.76 (1.13-4.06)
[N-NO₂] (mg.l⁻¹)	0.02 (0.02-0.04)	0.03 (0.02-0.05)	<0.0 (<0.01-0.01)	<0.01 (<0.01-0.02)	0.02 (0.02-0.03)	0.02 (<0.01-0.03)	0.14 (0.05-0.22)	0.07 (0.02-0.17)	0.05 (<0.01-0.12)	0.03 (0.01-0.06)	0.02 (<0.01-0.06)	0.02 (<0.01-0.04)
[N-NH₄] (mg.l⁻¹)	0.07 (0.04-0.12)	0.03 (0.02-0.04)	0.04 (0.04-0.04)	0.03 (<0.01-0.05)	0.03 (<0.01-0.04)	0.10 (0.04-0.32)	0.93 (0.20-3.27)	0.24 (0.04-1.09)	0.09 (<0.01-0.3)	0.07 (0.02-0.22)	0.04 (0.04-0.04)	0.10 (0.04-0.16)
[P-PO₄] (mg.l⁻¹)	0.03 (0.03-0.04)	0.02 (<0.01-0.04)	0.02 (0.02-0.02)	0.02 (<0.01-0.03)	0.03 (<0.01-0.04)	0.03 (0.02-0.05)	0.77 (0.05-1.27)	0.05 (0.03-0.08)	0.09 (<0.01-0.16)	0.05 (0.02-0.14)	0.05 (0.03-0.1)	0.27 (0.23-0.33)
smTU-D	-5.20	-4.83	-4.46	-4.44	-4.49	-3.72	-2.95	-3.19	-3.06	-2.50	-2.30	-1.74
mTU-D	-5.60	-5.05	-4.84	-4.77	-4.64	-3.92	-3.54	-3.33	-3.14	-2.80	-2.48	-1.81
smTU-A	-3.59	-4.82	-0.43	-2.14	-3.52	-0.51	-0.33	0.18	-1.32	0.65	0.81	-0.48
mTU-A	-3.66	-4.89	-0.43	-2.14	-3.68	-0.53	-0.76	0.15	-1.75	0.65	0.80	-0.66

Physical and chemical analyses of stream water

All stream water characteristics, including pesticide concentrations but excluding temperature, were obtained from the Adour-Garonne Water Agency database. Physical and chemical characterization was made at several occasions over one year (March 2012 to March 2013), including in spring when pesticide concentrations were the highest. Determinations comprised pH, conductivity, and concentrations of inorganic nutrients (nitrate, nitrite, ammonium and orthophosphate) and dissolved oxygen. Among the 139 pesticides monitored, 30 were detected in our streams including 16 herbicides, 12 fungicides and 2 insecticides. The sum of pesticide concentrations ranged from 0 to 31.11 µg L⁻¹, and the number of detected pesticides at each site and sampling occasion from 0 to 21 (Table S1). Pesticide toxicity at each site was determined as the maximum toxic unit (mTU) calculated according to the following formula:

$$mTU = \log \left(\max_{i=1}^n \left(\frac{c_i}{EC50_i} \right) \right)$$

where c_i is the concentration of pesticide i , $EC50_i$ is the corresponding 48 h to 96 h median effect concentration for a given standard test species and n is the number of pesticides detected in the site (Backhaus & Faust, 2012; cf. Table S1). Due to the logarithmic transformation, toxic units over different sites were within a relatively narrow range, e.g. from –5 or lower from the lowest contaminated site up to –1 or higher from the most contaminated site, with a TU of 1 meaning that the observed pesticide concentration is 10 times higher than the median effect concentration for that pesticide and the standard species considered. Alternatively, pesticide toxicity at each site was expressed as the sum of toxic units (sTU; Liess & Von der Ohe, 2005):

$$sTU = \log \left(\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{EC50_i} \right)$$

Standard test species were selected among the closest organisms to those involved in the ecosystem function investigated in this study, i.e. *Daphnia magna* ($TU_{D.magna}$) for invertebrate decomposers and diverse algae for microbial ones (TU_{algae} ; University of Hertfordshire, 2013).

Leaf litter breakdown

In autumn 2012, alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) leaves were collected just after abscission from a riparian zone within the same European hydroecoregion. Leaves were air-dried for 7 days, weighed in batches of approximately 4 g (3.96 – 4.04 g) and enclosed in coarse mesh (CM, 9 mm opening) and fine mesh (FM, 0.5 mm opening) bags (15 × 20 cm). Initial dry mass of leaf sample was determined by using a correction coefficient obtained from eight additional batches of 4 g dried at 105 °C for 48 h.

In each stream, six experimental units consisting of one CM bag and one FM bag were anchored in the streambed in mid-February 2013. This corresponded to a period where agricultural lands (mostly devoted to the production of cereals and oleaginous plants) were often free of cultures, with pesticides, especially herbicides, being mainly applied from early spring until late summer. Boulders were added to maintain the litterbags at the stream bottom. The six experimental units were placed at a distance of > 5 m from each other by selecting comparable conditions of exposure (e.g. depth, substratum) within stream riffles (= blocks) whenever possible. Riffles were perched to pools in order to optimize fungal colonization and avoid the risk of anoxia in leaf packs resulting from fine sediment deposition. Temperature was continuously monitored in each stream using temperature loggers (HOBO UA-001-64, Bourne, MA, USA). After 21 days of exposure, leaf bags were removed cautiously, e.g. in limiting the loss of leaf-associated invertebrates, and stored in a cool box during transport to the laboratory.

Leaf litter from FM bags was gently washed under tap water to remove sediments, and ten leaf discs per sample were cut from different leaves avoiding the central vein. Five out of the

ten discs were used immediately to induce sporulation of aquatic hyphomycetes and the other five discs were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for later fungal biomass estimation. The remaining leaves were dried at $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 48 h and weighed ($\pm 0.01\text{ g}$).

Leaf litter from CM bags was gently washed and leaf-associated macroinvertebrates were collected on a $500\text{ }\mu\text{m}$ sieve and stored in ethanol (70 % vol/vol). Leaves were dried to constant mass at $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 48 h and weighed ($\pm 0.01\text{ g}$). The ash free dry mass (AFDM) was extrapolated from aliquots of ground dry litter ($0.25 \pm 0.02\text{ g}$) burnt at $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 3 h and weighted to determine ash content.

Leaf-associated microorganisms and macroinvertebrates

Ergosterol concentration was used as a proxy of leaf-associated fungal biomass (Gessner & Chauvet, 1993). Lipids were extracted from sets of five leaf discs by heating ($80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min) in 0.8 % (mass/vol) KOH-methanol, purified by solid-phase extraction (Oasis HLB 3cc (60mg) Extraction Cartridge; Waters, Milford, MA, USA), and quantified at 282 nm and $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ using high-performance liquid chromatography on a C_{18} column with methanol as the mobile phase (Gessner, 2005). Ergosterol was converted to fungal biomass using a conversion factor of $5.5\text{ mg ergosterol g}^{-1}\text{ AFDM}$ (Gessner & Chauvet, 1993), and biomass expressed as mg per g leaf AFDM.

For each sample, sporulation was induced from the set of five leaf discs introduced into 100-mL Erlenmeyer flasks with 20 mL of filtered stream water (GF/C, $1.2\text{ }\mu\text{m}$ pore size, Whatman, Maidstone, UK) placed on an orbital shaker at $12\text{ }^{\circ}\text{C}$. After 48 h of incubation, the conidial suspensions together with rinsing water were adjusted to 40 mL in 50 mL polypropylene tubes and fixed with 5 mL of 37.5% formaldehyde. Aliquots of conidial suspensions were filtered (Millipore SMWP, $5\text{ }\mu\text{m}$ pore size, Billerica, MA, U.S.A) and stained with 0.05 % (mass/vol) Trypan blue in 60 % lactic acid, with at least 200 conidia per replicate being identified and counted under the microscope at $\times 100$ to $\times 400$ (Gessner et al., 2007) using identification keys of Chauvet (1990) and Gulis et al. (2005). Leaf discs were dried at $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ and weighted, and the sporulation rate was expressed as the number of conidia produced per $\mu\text{g}^{-1}\text{ leaf AFDM d}^{-1}$.

Invertebrates were identified to the family level and assigned to functional feeding groups according to Tachet et al. (2010). Taxa were considered as shredders when their diet was at least composed of 20% of coarse particulate organic matter. The relative abundance of shredder taxa and shredder taxa richness were calculated. Abundance was expressed as number of individuals per g leaf AFDM and taxa richness and number of taxa per sample. In addition, the abundance of SPECies At Risk of being impacted by chronically pesticide contamination ($\text{SPEAR}_{\text{pesticide}}$) was computed for each site using the freely available online SPEAR calculator (<http://www.systemecology.eu/spear>).

Data analysis

Exponential leaf breakdown rate (k) for each bag was derived from the decay model (Wieder & Lang, 1982) according to the formula: $k = -\ln(M_t / M_0) / t$, where M_0 is the initial AFDM, M_t the AFDM remaining, and t the exposure time (in days). Total (k_{total}) and microbial-driven (k_{microbe}) breakdown rates were calculated from CM and FM bags, respectively. Invertebrate-driven breakdown rate ($k_{\text{invertebrate}}$) was calculated from the difference between leaf AFDM remaining in CM and FM bags at each experimental unit. The $k_{\text{total}}/k_{\text{microbe}}$ ratio was used to evaluate shifts in the relative contribution of shredders and microorganisms to leaf breakdown (Gessner & Chauvet, 2002).

A Pearson correlation matrix taking into account leaf litter breakdown rates, abundance and richness of total invertebrates and shredders, fungal biomass, conidial production and taxa richness, SPEAR_{pesticide}, and the expressions of pesticides contamination (mTU and sTU for both *Daphnia magna* and algae) together with ammonia as a potentially deleterious compound (cf. Lecerf et al., 2006) was tested. Abundance of both total invertebrates and shredders were logarithmically transformed. Correlations were done using R (3.1.3 version). The significance threshold was set at $P < 0.05$.

Results

Pesticides

Our sites exhibited a wide gradient of pesticide concentrations as expressed in toxic units (Table 4). Boulouze (S1) and Agros (S2) were the less contaminated sites, and Rieu-Tort (S12) and Ayroux (S11) the most contaminated sites, depending on whether considering toxicity to *Daphnia magna* or algae, respectively. Over all sites, the range of pesticide contamination was wider considering algae (mTU_{algae}: -4.89 to 0.80) than *Daphnia magna* (mTU_{D.magna}: -5.60 to -1.81; Table S1). At each site, mTU_{algae} was higher than mTU_{D.magna}, with the Gimone (S3) site exhibiting the largest discrepancy (-0.43 and -4.84, respectively). Values of the sum of toxic units (sTU) and their patterns among sites were very similar to those of mTU for both algae and *Daphnia*.

The herbicides acetochlor (chloracetamide) and, to a lesser extent, oxadiazon (oxiadiazolone), isoproturon (urea) and diuron (phenylurea) were clearly the most important compounds, *i.e.* resulting in the highest values of mTU_{algae} (Table S1). The highest mTU_{D.magna} values were due to the carbamate insecticide carbaryl, followed by the herbicide isoproturon.

Leaf litter breakdown rates

Five out of the 144 leaf bags deployed at our 12 stream sites (Boulouze (S1): one FM bag; Touch (S7) and Rieu-tort (S12): one FM and one CM bag) could not be retrieved after 21 days. In CM bags, 43.3 to 66.1 % of the initial leaf litter mass was retrieved after 21 days. This translated into total breakdown rates (k_{total}) ranging from $0.0198 \pm 0.0014 \text{ d}^{-1}$ (mean $\pm$ SE; Rieu-Tort, S12) to $0.0413 \pm 0.0058 \text{ d}^{-1}$ (Boulouze, S1, Fig. 7A). In FM bags, remaining leaf litter ranged from 59.9 to 71.0 % corresponding to microbial-driven breakdown rates (k_{microbe}) of $0.0247 \pm 0.0023 \text{ d}^{-1}$ (Girou, S9) and $0.0163 \pm 0.00005 \text{ d}^{-1}$ (Agros, S2), respectively. As a result, invertebrate-driven breakdown rates ($k_{\text{invertebrate}}$) ranged from $0.0009 \pm 0.0004 \text{ d}^{-1}$ (Rieu-Tort, S12) to $0.0144 \pm 0.0023 \text{ d}^{-1}$ (Agros, S2), corresponding to 98 to 74 % of initial litter mass remaining after 21 days, which underlined the almost null breakdown driven by invertebrates at the former site. Both k_{total} and $k_{\text{invertebrate}}$ exhibited a decrease along the gradient of pesticide toxicity ($\text{mTU}_{D.magna}$) with linear relationships being significant ($r^2 \geq 0.25$, $P < 0.0001$), whereas k_{microbe} showed no clear trend (Fig. 7A). The increase in pesticide toxicity thus coincided with a sharp decrease of the total to microbial-driven breakdown rate ratio, with the linear relationship being highly significant ($r^2 = 0.30$, $P < 0.0001$; Fig. 7B). Similarly significant patterns were also found for breakdown rates expressed in degree-day (data not shown).

Leaf-associated decomposers

The fungal biomass associated with the remaining leaf litter at day 21 ranged from 54.5 ± 7.1 (Tescou, S4) to $164.0 \pm 9.6 \text{ mg g}^{-1}$ leaf AFDM (Gimone, S3) (mean $\pm$ SE), and conidial production of aquatic hyphomycetes from 0.32 ± 0.04 (Agros, S2) to $2.99 \pm 2.08 \text{ conidia } \mu\text{g}^{-1}$ leaf AFDM d^{-1} (Sausse, S7) (mean $\pm$ SE) (Table S2). While the fungal taxa richness was around 12 species per stream (range: 9–16), four of them occurred in all sites, i.e. *Alatospora acuminata* Ingold, *Flagellospora curvula* Ingold, *Tetracladium marchalianum* De Wild. and *Lemonnieria aquatica* De Wild. (Table S2). Three of these species dominated the conidial production, with an average contribution of 35.8 % (± 6.4 , SE) for *A. acuminata*, 27.4 % (± 6.5) for *F. curvula* and 18.6 % (± 3.9) for *T. marchalianum*.

The mean ($\pm$ SE) abundance of invertebrates from CM bags was 59.3 ± 11.1 individuals g^{-1} leaf AFDM, with the minimum occurring at both Ayroux (S11; 18.4 ± 3.4) and Girou (S9; 18.4 ± 4.4) and the maximum being 135.9 ± 77.7 at Boulouze (S1), i.e. the second and fourth most contaminated sites and the less contaminated site regarding toxicity to *Daphnia*, respectively (Table S3). The mean invertebrate taxa richness per site was 15 with values ranging between 8 (Rieu-Tort, S12, the most contaminated site) and 26 (Gimone, S3, the third less contaminated site). Taxa belonged to five classes (Arachnida, Clitellata, Insecta, Gastropoda and Malacostraca), with insect larvae being largely dominant. Asellidae was the only family for Malacostraca as Hydrachnidae was for Arachnida. Gastropoda were represented by Hydrobiidae and Physidae, and Clitellata by Glossiphonidae, Oligochaeta

and Planorbidae. Chironomidae was the most abundant family, contributing in average ($\pm$ SE) to 69.7 ± 6.8 % of the total invertebrates (from 20.7 ± 6.4 % at Gimone (S3) to 96.2 ± 13.2 % at Rieu-Tort (S12)). Baetidae was the only other taxa present in all sites, even though it only contributed to 3.2 ± 1.3 % of the total on average.

The mean ($\pm$ SE) abundance of shredders was 9.3 ± 6.1 individuals g^{-1} leaf AFDM, ranging from 0.4 ± 0.2 to 75.2 ± 49.7 at Rieu-Tort (S12) and Boulouze (S1), i.e. the most and less contaminated sites, respectively. In average ($\pm$ SE), shredders accounted for 10.7 ± 4.5 % of the total invertebrates (3.2 ± 2.4 % at Rieu-Tort (S12) to 46.2 ± 5.1 % at Boulouze (S1)). Shredders were only dominant at Boulouze (S1), with Nemouridae individuals accounting for 51.1 ± 34.3 % of the total invertebrates (see Table S3 for more information). Consistently, the mean individual abundance from invertebrate families at risk for pesticide (SPEAR_{pesticide}) ranged from 56.2 (Boulouze, S1) to 7.5 (Rieu-Tort, S12).

Among-parameters correlations

Both k_{total} and $k_{invertebrate}$ were significantly and negatively correlated with $mTU_{D.magna}$ (Fig. 7A) and mTU_{algae} ($r \leq -0.77$, $P \leq 0.003$; Table 5). The ratios $k_{total}/k_{microbe}$ (Fig. 7B) and $k_{invertebrate}/k_{microbe}$ (data not shown) significantly decreased along the $mTU_{D.magna}$ contamination. Both k_{total} and $k_{invertebrate}$ were positively correlated with shredder abundance ($r \geq 0.71$, $P \leq 0.010$). Shredder taxa richness was significantly related to $k_{invertebrate}$ ($r = 0.72$, $P = 0.009$), and the relationship was close to be significant with k_{total} ($r = 0.54$, $P = 0.068$). Invertebrate and shredder abundances were also negatively affected by toxic units for *D. magna* ($mTU_{D.magna}$ and $sTU_{D.magna}$; $r \leq -0.75$, $P \leq 0.005$) and shredder taxa richness and abundance were negatively correlated to toxic units for algae (mTU_{algae} and sTU_{algae} ; $r \leq -0.60$, $P \leq 0.040$). No significant correlation was observed between mTUs and $k_{microbe}$, neither with other variables related with aquatic hyphomycetes, i.e. fungal biomass and conidial production rate (3S3). However positive correlations between toxic units for algae and conidial production rate occurred (mTU_{algae} and sTU_{algae} ; $r \geq 0.53$, $P \leq 0.077$, Table 5), the non-significance being explained by the high conidia production rate at Orbe, a poorly contaminated site.

Table 5 – Correlation matrix between response variables (means of the 6 experimental units for each stream), toxicity parameters and ammonium concentration, with Pearson correlation coefficient (bottom left) and P-values being displayed. Bold cases indicate significant correlations. * denotes logarithmic transformation

	k_{total}	$k_{\text{microbial}}$	$k_{\text{invertebrate}}$	Mycelial biomass	Conidial production rate	Fungal taxa richness	Invertebrate taxa richness	Shredder taxa richness	Invertebrate abundance *	Shredders abundance *	SPEAR _{pesticide}	STU _{D.magna}	STU _{algae}	mTU _{D.magna}	mTU _{algae}	[N-NH ₄]
k_{total}		0.557	<0.001	0.214	0.559	0.455	0.412	0.068	0.026	0.004	0.086	0.002	0.004	0.001	0.003	0.847
$k_{\text{microbial}}$	0.19		0.474	0.350	0.213	0.590	0.410	0.303	0.972	0.724	0.966	0.604	0.574	0.691	0.696	0.416
$k_{\text{invertebrate}}$	0.91	-0.23		0.500	0.247	0.702	0.223	0.009	0.043	0.010	0.088	0.001	0.001	0.001	0.001	0.783
Mycelial biomass	0.39	0.30	0.22		0.622	0.385	0.129	0.742	0.081	0.241	0.310	0.210	0.982	0.173	0.994	0.900
Conidial production rate	-0.19	0.39	-0.36	0.16		0.980	0.803	0.264	0.863	0.142	0.832	0.177	0.060	0.256	0.077	0.078
Fungal taxa richness	-0.24	-0.17	-0.12	-0.28	-0.01		0.829	0.690	0.089	0.227	0.462	0.520	0.429	0.415	0.406	0.916
Invertebrate taxa richness	0.26	-0.26	0.38	0.46	0.08	-0.07		0.009	0.026	0.370	0.017	0.041	0.411	0.042	0.496	0.309
Shredder taxa richness	0.54	-0.32	0.72	0.11	-0.35	-0.13	0.72		0.063	0.027	0.018	0.009	0.026	0.009	0.040	0.301
Invertebrate abundance *	0.64	0.01	0.59	0.52	0.06	-0.51	0.64	0.55		0.013	<0.001	0.003	0.081	0.001	0.100	0.804
Shredders abundance *	0.76	0.11	0.71	0.37	-0.45	-0.38	0.28	0.63	0.69		0.007	0.005	0.009	0.003	0.011	0.523
SPEAR _{pesticide}	0.52	-0.01	0.51	0.32	-0.07	-0.24	0.67	0.66	0.88	0.73		0.004	0.119	0.002	0.155	0.490
STU _{D.magna}	-0.80	0.17	-0.84	-0.39	0.42	0.21	-0.6	-0.72	-0.78	-0.75	-0.76		0.003	<0.001	0.005	0.445
STU _{algae}	-0.76	0.18	-0.84	-0.01	0.56	0.25	-0.26	-0.64	-0.52	-0.71	-0.47	0.78		0.005	<0.001	0.390
mTU _{D.magna}	-0.81	0.13	-0.84	-0.42	0.36	0.26	-0.59	-0.72	-0.82	-0.78	-0.79	0.99	0.75		0.008	0.629
mTU _{algae}	-0.77	0.13	-0.82	0.00	0.53	0.26	-0.22	-0.60	-0.50	-0.70	-0.44	0.76	1.00	0.72		0.491
[N-NH ₄]	0.06	0.26	-0.09	-0.04	0.53	-0.03	-0.32	-0.33	-0.08	-0.21	-0.22	0.24	0.27	0.16	0.22	

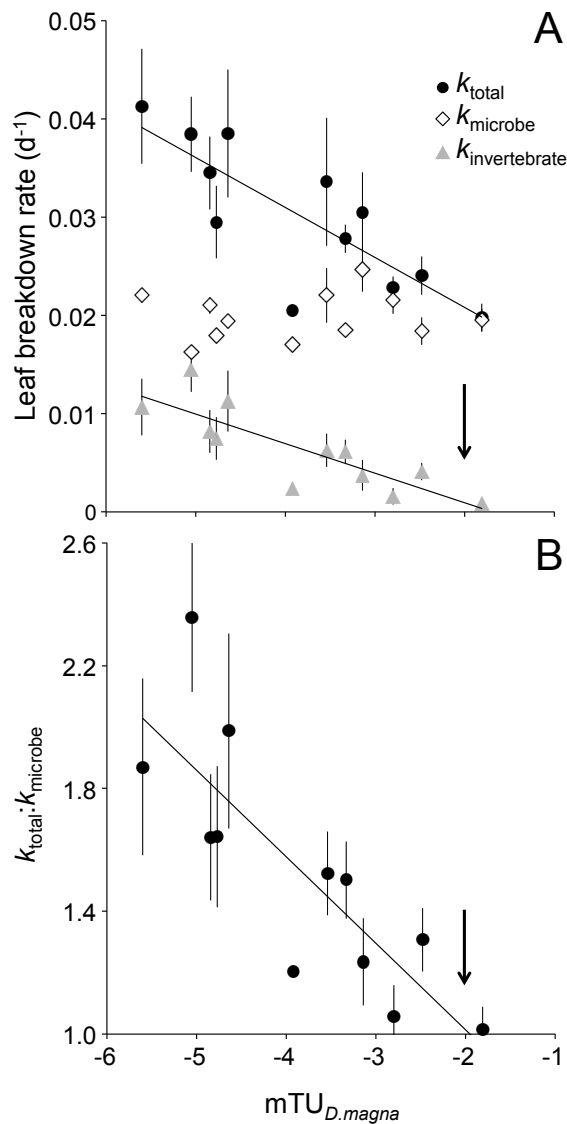


Figure 7 – A: Total, microbial-driven and invertebrate-driven leaf breakdown rates (mean $\pm$ SE, $n = 6$) along the gradient of maximum toxic units for *Daphnia magna* encountered in the 12 sites. **B:** Total to microbial-driven breakdown rate ratio (mean $\pm$ SE, $n = 6$) along the gradient of maximum toxic units for *Daphnia magna*. The linear regressions were based on all 6 experimental units per stream. Parameters of the linear regression for total breakdown rate are: $y = -0.0051 x + 0.0051$, $r^2 = 0.25$, $P < 0.0001$. Invertebrate-driven breakdown rate: $y = -0.0031 x - 0.0032$, $r^2 = 0.31$, $P < 0.0001$. Total to microbial-driven breakdown rate ratio: $y = -0.2709 x + 0.5204$, $r^2 = 0.30$, $P < 0.0001$. The linear regression for microbial-driven breakdown rate was not significant. The arrow indicates the threshold defined by the European Union as the EC50 of *Daphnia* divided by an assessment factor of 100 (EEC, 1991).

Discussion

The rate of alder leaf breakdown in our streams was strongly affected by pesticide contamination, supporting our main hypothesis. Not only the lowest and highest concentrations expressed as toxic units (for *Daphnia magna*) coincided with the highest and lowest breakdown rates, respectively, but this pattern was consistent along the wide gradient of pesticide concentrations found in our 12 streams. Overall, these findings were consistent with previous results by Schäfer et al. (2007), even though their 2.4-fold reduction in breakdown rate reported from farmland streams in Western France was higher than the 2.1-fold decrease observed in our streams. The higher reduction in Schäfer et al.'s study could however be explained by their slightly wider range in toxic units ($\text{mTU}_{D.magna}$: -5.0 to -0.42), and specifically by their higher extension towards higher toxicity (-0.42) compared to those occurring in our SW French streams ($\text{mTU}_{D.magna}$: -5.6 to -1.8). Interestingly, our total breakdown rates for alder leaf litter ($0.0198 - 0.0413 \text{ d}^{-1}$) also fit with the range reported by Schäfer et al. (2007) for the same leaf species in French streams ($0.008 - 0.067 \text{ d}^{-1}$) with our range again being narrower, illustrating the relative constancy of this endpoint when measured over comparable conditions, i.e. agricultural, lowland streams.

If a $\text{mTU}_{D.magna}$ threshold of -3.5 is used to discriminate streams affected by pesticide input from unaffected ones (Schäfer et al., 2007), then half of our streams were impacted, resulting in a total breakdown rate average reduction of 22 % in those streams. Nevertheless such a reduction, although close to the first threshold of 25% proposed in Gessner & Chauvet (2002), doesn't provide the highest evidence of pesticide impact on leaf breakdown. Applying the same $\text{mTU}_{D.magna}$ threshold to invertebrate-driven breakdown rate led to a 58 % reduction of the function rate, a high value identical to that reported in Schäfer et al. (2007), indicating a severe functional impairment of the ecosystem (Gessner & Chauvet, 2002). The loss of invertebrate diversity due to pesticide contamination was reported at regional scale in Germany and France both at species and family level (e.g., with a loss of up to 42 % of the recorded taxonomic pool) by Beketov et al. (2013). Here, by relying on leaf-associated invertebrates, we also show a strong depletion of both shredder taxa richness and abundance, which in our most contaminated stream represented 60 % and 0.5 % of the values from the less contaminated stream, respectively. The decrease in shredders contribution to the invertebrate community, directly translating into reduced leaf breakdown rate, was remarkably consistent along our contamination gradient (Table S3).

A major feature of our streams impaired by pesticides was the shift from leaf breakdown co-driven by microbial and invertebrate decomposers in non-impacted streams to the control by microbial decomposers only in impacted ones. Similarly, Piscart et al. (2011) reported unaltered rates of microbial-driven breakdown of alder leaf litter in benthic habitats of two streams affected by farming and vineyard and contaminated by pesticides and metals, in contrast with invertebrate-driven breakdown, which was severely impacted. Apart from the

case where one decomposer type is specifically targeted (e.g. invertebrates by insecticides), very few examples where one type of decomposer is affected by a stressor while the other remains unchanged are reported in the literature. In the most documented case, e.g., nutrient enrichment of stream water, the response of decomposers in leaf litter breakdown is not unimodal. Fungi tend to be stimulated and invertebrates unchanged under low to moderate nutrient enrichment (Ferreira et al., 2006) while high eutrophication leads to unaffected or decreased fungal activity and strongly depressed invertebrate contribution (Baldy et al., 2007; Woodward et al., 2012). Compensatory contributions of both decomposer types resulting in unaltered total breakdown rates have been reported for the clearance of woody riparian vegetation in European streams (Hladysz et al., 2010). In the present study, the response of both microbial and invertebrate decomposers over the whole pesticide gradient was remarkably unimodal. At least for invertebrates, this is supported by the constant decrease in both abundance and numbers of taxa with increasing pesticide toxicity, resulting in their gradually lower involvement in leaf breakdown. These effects were observed across various situations where pesticides were present in mixtures of compounds differing in identity, type, concentration and toxicity. Even though it is difficult to draw any conclusion from such naturally complex conditions, these patterns suggest a potentially high sensitivity of invertebrates to the three pesticide types (herbicide, insecticide and fungicide) prevailing in our streams. When considering effects on litter-associated insect taxa, like the midges Chironomidae, our records suggest that insecticides mixtures were even more toxic than determined on the standard species *Daphnia magna*. As an example, the EC50 of imidaclopride for *Chironomus tentans* Fabricius ($3.4 \mu\text{g L}^{-1}$, ECOTOX Database) was 27070 times lower than for *D. magna*, potentially resulting in higher toxic units than indicated for 4 of our streams (Sausse (S7), Bergon (S10), Ayroux (S11), and Rieu-Tort (S12), Table 4). Similarly, relying on the lowest reported EC50 of carbaryl, i.e. the pesticide that determined the highest toxic unit for *D. magna* in our study (-1.81 , Rieu-Tort (S12)), for *C. tentans* ($1.6 \mu\text{g L}^{-1}$, ECOTOX Database), would lead to an even higher maximum TU (-1.20) for invertebrates in this stream.

The higher sensitivity of invertebrates can be due to the conjunction of direct (i.e., exposure to toxicant) and indirect (i.e., feeding on contaminated mycelia and leaf matter) effects like documented in Flores et al. (2014). Actually, our experimental design did not allow to discriminate the consequences of shredder taxa loss and altered feeding activity, both of which potentially resulting in depressed leaf consumption. If the drastic decrease in shredder abundance at our contaminated sites could, per se, explain most of the reduction of litter fragmentation, an inhibition of the feeding activity of shredders that survived pesticide effects cannot be precluded. Bundschuh et al. (2013) reported that the amphipod *Gammarus fossarum* Koch when briefly exposed to pesticide mixture at field relevant concentrations, i.e. with the same order of magnitude as those occurring in our streams, exhibited a 35 % decreased feeding rate on alder leaf litter (low exposure scenario). A stonefly, *Pteronarcys comstocki* Smith, showed a feeding rate on alder leaves impaired by 27 % in outdoor streams, due to low-concentration pulses of the insecticide imidacloprid (Pestana et al., 2009). Similarly, although not related to pesticide but cadmium exposition, increasing

concentrations of this stressor resulted in decreased alder leaf mass loss and decreased feeding by a caddisfly shredder, *Sericostoma vittatum* Rambur, and a midge collector, *Chironomus riparius* Meigen (Campos et al., 2014). Importantly, *C. riparius* was reported to consume alder leaves in the absence of shredders, and thus to switch from collector to shredder feeding mode. Such sub-lethal effects with direct impact on leaf processing rate may have occurred in our study, where chironomids dominated invertebrate assemblages, especially in the most contaminated streams. The extent of which the depressed feeding activity of shredders in our contaminated sites contributed to the observed reduced breakdown rate however remains difficult to quantify, given the mixture of potentially inhibiting compounds complicated by the interactions among leaf-consumers. Such an inhibitory effect, synergistically combined with the altered feeding activity caused by a contaminated leaf resource (Bundschuh et al., 2013; Flores et al., 2014), is however susceptible to occur in the frequently encountered situations where pesticide toxicity do not compromise invertebrate survival.

In contrast, fungal decomposers appear to be tolerant to a wide range of molecule types and concentrations. In particular, leaf-associated fungi are poorly sensitive to insecticides (e.g., Dalton et al., 1970), at concentrations where invertebrate detritivores are strongly if not totally repressed (Suberkropp & Wallace, 1992; Kreutzweiser et al., 2009; Thompson et al., 2015). Based on the toxicity to the used standard test organisms, herbicides were the predominant pesticides in our streams. Mecoprop was found to negatively affect leaf-associated biomass of an aquatic hyphomycete species (Bermingham et al., 1998), but this effect occurred at concentrations at least > 1000 times higher than those occurring in our streams (Table S1). Two herbicides, paraquat and 2,4-DB, did not inhibit the growth of three aquatic hyphomycetes at concentrations below 10 mg L⁻¹ (Chandrashekar & Kaveriappa, 1989). Freshwater hyphomycetes appear to be relatively tolerant to glyphosate (the second most frequent pesticide in our streams). Fungicides generally produced effects on fungal activity and leaf breakdown at concentrations lower than the other pesticides, but these concentrations were again found to be higher than those in our agricultural streams (Chandrashekar & Kaveriappa, 1989). In contrast with our study, Rasmussen et al. (2012b) reported a 50 % reduction in microbial leaf breakdown rate in streams affected by a mixture of pesticides comprising fungicides at relatively high toxicity levels. However, this result relied on reference streams located in forested areas versus impacted streams in agricultural areas, thus differing from our study all based on agricultural streams. We cannot thus preclude that background levels of toxicants (as well as other stressors) occurred even in our less impacted streams, which are normally not present in forested streams. An additional factor of discrepancy in Rasmussen et al. (2012a) is the nature of leaf litter, beech, a refractory species compared to the labile alder. Refractory leaf species are often reported to exacerbate the response to stressors (e.g., Lecerf et al., 2005). Leaf-associated microorganisms in Rasmussen et al. (2012a) were limited in assimilable carbon resource, which could have made them more sensitive to pesticide contamination leading to lower k_{microbe} in contaminated streams. Moreover, due to their slower breakdown, the exposure of beech leaf litter in the contaminated stream was longer, further enhancing the response to

contamination. Artigas et al. (2012) reported impaired structure and functioning of leaf-associated microbial communities due to tebuconazole, a fungicide also found in our streams but at concentrations ca. 50 lower (Table S1). Our streams contained four compounds (azoxystrobin, carbendazim, epoxiconazole and tebuconazole), which, based on the same extrapolation as in Rasmussen et al. (2012a) for fungicide toxicity to aquatic fungi (Dijksterhuis et al., 2011), exhibited moderate toxicity to fungi within a relatively narrow range across our sites (mTU_{fungi} : -2.53 to -2.09). These intermediate values are consistent with the apparently unaltered fungal activity in our study, being further supported by a plausibly higher resistance of both structure and functioning of aquatic hyphomycete to fungicides compared to non-microbial communities (Maltby et al., 2009). In addition, the absence of effects on fungal decomposers may simply result from our study period, i.e. late winter, as fungicides are predominantly applied during spring and summer (e.g. Fernandez et al., 2015) most likely resulting in the strongest effects during that time, combined with a possible higher resilience of aquatic fungi due to their short life-cycle. Nevertheless, in the absence of extensive data on aquatic hyphomycete sensitivity to fungicides, it must be pointed out that, standard algae toxicity tests and even the existing fungal data in literature (Dijksterhuis et al., 2011; aquatic fungi, but not aquatic hyphomycetes) may not reflect fungicide toxicity to leaf-associated fungal decomposers and should be used with caution. As an illustration, a recent study showed microbial endpoints related to leaf litter breakdown to be drastically more sensitive towards fungicides than standard algae toxicity tests (Zubrod et al., 2015). Relying on total fungicide concentrations instead of mTU_{algae} did not however result in any significant correlation against microbial/fungal endpoints of our dataset (data not shown). In contrast to the apparently low fungal sensitivity, the invertebrates that ingest mycelia exposed to pesticides generally show much more depressed activity and survival. This phenomenon is exacerbated by compensatory mechanisms when shredders increase their consumption of leaves due to reduced nutritional quality caused by lower leaf-associated microbial biomass (Rasmussen et al., 2012c). In our streams, however, no depressed biomass of fungal decomposers was observed and a slight stimulation of fungal reproductive activity was even detected, which may indirectly result from depressed grazing by leaf-associated macroinvertebrates. In addition, an influence of modified fungal community structure, i.e. modified nutritional resource for shredders (Gonçalves et al., 2014), cannot be precluded. The higher abundance of *F. curvula*, a highly palatable species, together with the lower abundance of *L. aquatica* and *T. marchalianum*, two unpalatable species, in the most contaminated streams (Table S2) would tend to nutritionally compensate for the unfavourable environment. All this suggests that the deleterious effects on invertebrate decomposers were more related to their direct exposure to pesticides than affected by trophic cascades.

While microbial-driven breakdown was unaffected by our gradient of pesticides, this lack of sensitivity was apparently further supported by the absence of correlation between toxic units and both leaf-associated fungal biomass and conidial production rate. Correlation of conidial production rate with both mTU_{algae} and sTU_{algae} in our study was however close to be significant ($P = 0.077$ and 0.060 , respectively), with the positive relationships showing that

the reproductive activity of fungi tended to be stimulated by an increased pesticide toxicity to algae. The same stimulatory effect of various toxicants, sometimes at high concentrations, on conidial production rate has been reported in the literature, e.g. with copper (Roussel et al., 2008). This has generally been attributed to the lower competition for substrate and/or lower predation by invertebrates (Bärlocher, 1980). Both mechanisms may have been involved here. Some herbicides were present at high levels in our streams (e.g., acetochlor, $mTU_{\text{algae}}: 0.80$), most probably inducing a lower development of algae (Morin et al., 2010) and a decreased competition with fungi in their colonization of leaf blades. Besides, the strongly depressed abundance of shredders (together with other functional feeding groups such as scrapers) in our most contaminated streams may have led to a reduced pressure on the development of reproductive structures and conidial release from leaf surfaces. Consistently with this hypothesis, the dramatic reduction in invertebrate abundance led to an increased conidial production by aquatic hyphomycetes in the manipulated stream reaches that received the insecticide methoxychlor (Suberkropp & Wallace, 1992). In microcosm studies, aquatic hyphomycetes even show enhanced growth at low insecticide concentrations, i.e. values however exceeding by several orders of magnitude the concentrations found in the present study. The same stimulation has been reported with other pesticides (e.g., herbicide; Tsui et al., 2001) as well as other toxicants, suggesting that fungi may use them as sources for their metabolism. Nevertheless, it must be stressed that these stimulatory effects were unlikely on fungal biomass, whereas they probably affected reproductive activity, and they didn't translate into enhanced microbial-driven breakdown rate.

In their review, Peters et al. (2013) concluded that the reduction in leaf breakdown due to toxicants was generally more pronounced in studies when invertebrate occurred compared to those where microorganisms were the only decomposers. The imbalance between leaf litter decomposers was markedly evident in our streams where the abatement in invertebrates' involvement along the pesticide gradient was not paralleled by a drop in microbial contribution. The loss of invertebrates' contribution was not compensated by an increased activity of microorganisms. It must be emphasised that leaf-associated bacterial activity was not assessed in our study and differential responses of bacteria and fungi, which may eventually result in stable microbial-driven breakdown, cannot be ruled out. Bacterial leaf-decomposers are generally reported to occur at late decomposition stages (Baldy et al., 2007), and thus the interference of bacteria with fungi or other decomposers was unlikely and bacterial contribution to leaf processing probably marginal during our experimental period. As a consequence of the unbalanced decomposers response, $k_{\text{total}}/k_{\text{microbe}}$ and $k_{\text{invertebrate}}/k_{\text{microbe}}$ ratios were found to be particularly appropriate to describe the functional impairment. This was also supported by the very high correlation between these ratios and toxic units in our streams. Detecting changes in relative contribution of decomposers in ecosystem function even in cases of apparently unaltered rate (i.e. when the activities of decomposer types are compensated each other) strongly argue for the application of such metrics in stream health monitoring.

The effects of pesticides on leaf decomposers and breakdown rates were similarly pronounced when toxicity was expressed in cumulative (sTU) and peak (mTU) terms. Consistently with previous findings (e.g., Von der Ohe et al., 2009), this suggests that one pesticide drove most of the TUs even though the pre-eminently toxic pesticides differed among our streams (data not shown). Overall this may imply a simply additive effect of the various pesticides, as supported by results on fungicide/insecticide combined effect on leaf-associated fungi and shredder (Flores et al., 2014). Again, using proper tests involving leaf-associated fungal decomposers, especially when considering both direct and indirect effects to higher trophic level, i.e. shredders (Zubrod et al., 2015), may lead to a more realistic picture of fungicide toxicity. Interestingly, $\text{SPEAR}_{\text{pesticide}}$ was also strongly related to pesticide contamination (Liess & Von der Ohe, 2005) with the identification to family level being sufficient to detect impact (Beketov et al., 2013), which gives credit to insights into the functional structure of macroinvertebrate assemblages with regard to toxic effects. Breakdown rates and $\text{SPEAR}_{\text{pesticide}}$ were however not correlated as in (Schäfer et al., 2007). This lack of correlation was due to a single site, Bergon (S10), which exhibited diversified macroinvertebrate assemblages on leaf litter (Table S3) despite its heavy contamination resulting in the second highest value of $\text{SPEAR}_{\text{pesticide}}$ in our data set. Moreover, the consideration of invertebrates associated with decomposing leaves in our study, and not the whole invertebrate community presumably more representative of the exposure to pesticides (Schäfer et al., 2007), may explain the (slight) discrepancy between both studies. Indeed, while both breakdown rates and $\text{SPEAR}_{\text{pesticide}}$ calculated from litterbags responded to pesticide contamination measured in our sites, this finding should be taken with caution since both metrics can be influenced by confounding factors like morphological habitat degradation (Bunzel et al., 2013) or other anthropogenic disturbances (Hagen et al., 2006; Englert et al., 2015). It remains that the correlation of both metrics with pesticide contamination strongly suggests that pesticides were the main stressors in our agricultural streams. In particular, ammonium, which was potentially suspected to contribute to toxicity towards invertebrates in farmland streams wasn't correlated with decreased breakdown rates, although concentrations at some sites (e.g., Sausse (S8)) could have been deleterious to leaf-shredding invertebrate taxa (Lecerf et al., 2006). Unlike the $\text{SPEAR}_{\text{pesticide}}$ index, a stressor-specific metric that has been demonstrated to be invaluable in situations of pesticide contamination, leaf breakdown rates respond to a wide range of chemical stressors including pesticides and other contaminants, point and diffuse pollutions as well as hydromorphological, biological and other environmental disturbances (Webster & Benfield, 1986; Gessner & Chauvet, 2002). In contrast to isolated studies on single compounds on target organisms, which fail to reproduce realistic situations, such a functional approach based on litter breakdown, an integrative ecosystem-process involving a variety of non-target organisms at different trophic levels, is particularly appropriate to evaluate ecologically relevant impacts, i.e. immediate and long term effects of low concentrations of chemical mixtures usually present in the natural environment. In addition, we found that the impairment of the ecosystem functioning occurred along a range of pesticide concentrations all below the threshold defined by the European Union as the EC50 of *Daphnia* divided by an

assessment factor of 100 (EEC, 1991); cf. arrow in Fig 7), confirming that such an approach is not sufficiently sensitive to reveal ecosystem dysfunctioning (Peters et al., 2013). Our work has stressed the importance of disentangling microbial- and invertebrate-driven breakdown rates as ratios of total to microbial-driven breakdown rates were here the most pertinent metric to detect the ecosystem functioning impairment. Future research should evaluate whether this metric is similarly discriminant when using other leaf species and for other stressors, together with the relevance of other ecosystem-processes, possibly involving other non-target organisms, to assess the effect of pesticide contaminations.

Supplementary Material

Table S1 – List of pesticides detected at the 12 sites from March 2012 to March 2013 along with pesticide type (H: herbicide, F: fungicide, I: insecticide, M: metabolite), frequency of detection at all sites (% of sampling occasions), limit of quantification (LOQ), median effect concentration for *Daphnia magna* (EC50-D) and green algae (EC50-A) together with their corresponding maximum toxic unit (mTU_{D.magna} and mTU_{algae}) as determined from University of Hertfordshire (2013). When no EC50 was found for metabolites, the displayed value (*) is the EC50 of their parent active compound. Maximum pesticide concentration is reported for each site. S1: Boulouze, S2: Agros, S3: Gimone, S4: Tescou, S5: Orbe, S6: Touch, S7: Sausse, S8: Petit Midour, S9: Girou, S10: Bergon, S11: Ayroux and S12: Rieu-Tort. «-» denotes a pesticide concentration below the detection limit.

Compound (Type)	Frequency (%)	LOQ	EC50-D	EC50-A	mTU _{D.magna}	mTU _{algae}	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
			(µg.l ⁻¹)															
							(µg.l ⁻¹)											
2,4-D (H)	6	0.02	134000.0	24200.0	-5.12	-4.38	-	-	-	-	-	-	1.010	0.073	-	0.082	0.160	0.710
2,4-MCPA (H)	4	0.02	>190000.0	79800.0	-6.05	-5.67	-	-	-	-	-	0.059	-	0.170	-	-	0.038	0.074
AMPA (M)	41	0.05	*40000.0	*4400.0	-3.14	-2.18	0.070	-	-	0.190	0.130	0.110	8.700	0.260	1.830	0.310	1.390	0.990
Acetochlor (H)	9	0.02	8600.0	0.27	-3.70	0.80	-	-	0.100	-	-	0.079	0.030	0.380	-	1.200	1.700	0.059
Acifluorfen (H)	1	0.02	1200.0	470.0	-3.47	-3.06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.410	-
Aminotriazol (H)	3	0.05	6100.0	2300.0	-4.53	-4.11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.180
Atrazine (H)	4	0.02	85000.0	59.0	-5.99	-2.84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.086	-
Atrazine desethyl (M)	10	0.02	*85000.0	100.0	-5.99	-3.19	0.022	-	-	-	0.021	-	0.020	-	0.027	0.041	0.065	-
Azoxystrobin (F)	3	0.02	230.0	360.0	-3.08	-3.28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.190	0.033	-
Bentazone (H)	7	0.02	64000.0	10100.0	-5.86	-5.05	-	-	-	-	-	-	-	0.089	-	0.069	0.022	-
Carbaryl (I)	1	0.02	6.4	600.0	-1.81	-3.78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.100
Carbendazim (F)	4	0.02	150.0	>7700.0	-3.36	-5.07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.025	0.065
Chlortoluron (H)	7	0.02	67000.0	24.0	-5.10	-1.66	-	-	-	-	-	-	0.530	-	-	-	0.050	-
Cyproconazole (F)	1	0.02	>22000.0	99.0	-5.74	-3.39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.040	-
Cyprodinil (F)	1	0.02	220.0	2600.0	-4.04	-5.11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.020
Dichlorprop (H)	4	0.02	*5400.0	1100000.0	-4.15	-6.46	-	-	-	-	-	-	0.380	-	-	-	-	0.041
Dimethenamid (H)	7	0.02	16000.0	62.0	-3.33	-0.92	-	-	0.120	-	-	-	0.024	7.500	-	1.300	0.026	0.038
Dimethomorph (F)	1	0.02	>10600.0	29200.0	-5.56	-6.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.029
Dinoterbe (H)	2	0.02	470.2	*2000.0	-4.24	-4.87	-	-	-	-	-	-	-	-	0.021	-	0.027	-
Diuron (H)	9	0.02	5700.0	2.7	-4.29	-0.97	-	-	-	-	-	-	0.290	-	0.024	-	-	0.040
Epoxiconazole (F)	1	0.02	8690.0	1190.0	-5.00	-4.14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.086	-
Fludioxonil (F)	1	0.02	400.0	24.0	-3.75	-2.53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.071
Flusilazole (F)	1	0.02	3400.0	6400.0	-4.91	-5.18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.042	-
Glyphosate (H)	25	0.05	40000.0	4400.0	-3.14	-2.18	0.100	-	-	0.110	0.120	0.190	3.600	0.150	9.000	1.510	0.850	1.040
Hydroxyterbutylazine (M)	4	0.05	>2800.0	>3800.0	-4.15	-4.28	-	-	-	-	-	-	0.180	-	-	0.060	0.060	0.200
Imidaclopride (I)	10	0.02	85000.0	>10000.0	-5.89	-4.96	-	-	-	-	-	-	0.110	-	-	0.031	0.039	0.100
Isoproturon (H)	2	0.02	580.2	13.0	-2.48	-0.84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.110	1.900	-
Mecoprop (H)	5	0.02	>200000.0	237000.0	-6.00	-6.07	-	-	-	-	-	0.100	0.062	0.200	-	-	-	-
Metalaxyl (F)	6	0.02	28000.0	33000.0	-5.56	-5.63	-	-	-	-	-	0.022	0.036	-	-	0.034	0.078	0.020
Metazachlore (H)	5	0.02	33000.0	16.2	-4.63	-1.32	-	-	-	-	-	-	0.780	-	0.290	-	0.059	-
Metolachlore (H)	43	0.02	23500.0	57100.0	-3.37	-3.76	0.043	0.140	0.340	0.400	0.069	0.460	4.300	2.680	0.590	3.200	10.000	2.800
Nicosulfuron (H)	13	0.02	90000.0	7800.0	-5.34	-4.28	-	-	0.100	-	-	-	0.031	0.044	0.190	0.092	0.410	0.200
Oxadiazon (H)	11	0.01	>2400.0	4.0	-3.54	-0.76	-	-	-	0.029	-	0.040	0.700	-	0.054	-	0.076	0.370
Pendimethaline (H)	1	0.02	280.0	6.0	-3.92	-2.25	-	-	-	-	-	0.034	-	-	-	-	-	-
Propyzamide (H)	4	0.02	>5600.0	2800.0	-4.47	-4.17	-	-	-	-	-	-	0.022	-	-	-	-	0.190
Pyrimethanil (F)	1	0.02	2900.0	1200.0	-4.75	-4.37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.051
Rimsulfuron (H)	1	0.02	>360000.0	1200.0	-6.33	-3.85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.170	-	-
Simazine (H)	1	0.02	1100.0	40.0	-4.61	-3.17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.027
Sulfosate (H)	3	0.05	1600.0	4400.0	-4.12	-2.18	-	-	-	-	-	-	0.120	-	-	0.080	-	0.090
Tebuconazole (F)	13	0.02	2790.0	1960.0	-3.60	-3.45	-	0.025	-	-	0.064	0.043	0.095	-	-	0.190	0.700	0.031
Terbutylazine (H)	2	0.02	19.0	12.0	-2.80	-2.60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.030	-	0.026
Tetraconazole (F)	6	0.02	3000.0	2400.0	-5.18	-5.08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.020	-
Triclopyr (H)	8	0.02	>131000.0	75800.0	-6.27	-6.03	-	-	-	-	-	0.029	0.028	-	-	0.070	0.028	0.042

Table S2 – Relative abundance (%) and total conidial production rate of leaf-associated aquatic hyphomycete species after 21 days of exposure at the 12 sites. Values are means (SE) of the 6 experimental units per stream. S1: Boulouze, S2: Agros, S3: Gimone, S4: Tescou, S5: Orbe, S6: Touch, S7: Sausse, S8: Petit Midour, S9: Girou, S10: Bergon, S11: Ayroux and S12: Rieu-Tort. ‘?’ denotes uncertain genus/species identification.

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
<i>Alatospora acuminata</i>	49.1	26.6	63.0	33.8	82.3	43.0	36.6	43.8	18.4	16.5	7.5	9.5
Ingold	(6.1)	(10.5)	(7.4)	(10.9)	(1.9)	(4.1)	(8.6)	(4.7)	(3)	(3.8)	(1.4)	(2.0)
<i>Anguillospora crassa</i>	0.0	0.0	0.1	0.0	1.8	1.2	0.0	7.7	0.2	0.7	0.0	0.1
Ingold	(0.0)	(0.0)	(0.1)	(0.0)	(1.0)	(0.9)	(0.0)	(2.6)	(0.2)	(0.3)	(0.0)	(0.1)
<i>Anguillospora filiformis</i>	0.7	0.4	0.0	0.0	0.3	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.2	1.0
Greathead	(0.3)	(0.2)	(0.0)	(0.0)	(0.2)	(0.0)	(0.4)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.7)	(1.0)
<i>Anguillospora furtiva</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	1.9
Webster & Descals	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.2)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(1.1)
<i>Anguillospora longissima</i>	1.1	0.5	2.4	0.1	0.0	0.8	0.5	1.8	1.6	0.7	4.7	12.3
(Sacc. & Syd.) Ingold	(0.6)	(0.2)	(1.3)	(0.1)	(0.0)	(0.3)	(0.3)	(0.7)	(0.8)	(0.3)	(0.9)	(2.5)
<i>Articulospora tetracladia</i>	1.6	3.3	0.0	7.4	0.2	1.1	0.6	0.6	0.0	0.3	3.4	0.0
Ingold	(0.6)	(0.8)	(0.0)	(4.5)	(0.1)	(0.5)	(0.2)	(0.4)	(0.0)	(0.2)	(0.9)	(0.0)
<i>Campylospora parvula</i>	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Kuzuha	(0.0)	(0.2)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)
<i>Clavariopsis aquatica</i>	0.0	0.8	1.3	8.0	0.9	4.1	3.9	12.3	8.2	2.0	3.7	0.0
De Wild.	(0.0)	(0.5)	(0.1)	(2.8)	(0.4)	(0.2)	(1.5)	(4.5)	(3.3)	(1.1)	(0.8)	(0.0)
<i>Clavatospora longibrachiata</i>	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
(Ingold) Marvanová & Nilsson	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.1)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)
<i>Crucella subtilis</i>	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Marvanová & Suberkropp	(0.1)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)
<i>Flagellospora curvula</i>	8.9	2.5	17.1	24.1	0.7	27.5	25.5	12.0	23.9	63.3	60.6	62.0
Ingold	(2.7)	(1.3)	(5.3)	(5.4)	(0.4)	(4.2)	(7.4)	(4.2)	(3.2)	(10)	(2.9)	(5.1)
<i>Heliscus lugdunensis</i>	0.5	3.5	0.0	0.6	0.7	0.8	0.1	3.8	2.1	0.3	0.8	0.0
Sacc. & Théry	(0.3)	(0.8)	(0.0)	(0.3)	(0.2)	(0.4)	(0.1)	(2.2)	(0.8)	(0.2)	(0.5)	(0.0)
<i>Lemonniera aquatica</i>	10.2	10.8	2.1	0.5	3.2	5.2	0.1	4.4	3.2	2.6	6.1	0.3
De Wild.	(2.9)	(2.9)	(0.4)	(0.2)	(0.9)	(2.2)	(0.1)	(1.7)	(1.5)	(0.7)	(1.8)	(0.2)
<i>Lemmoniera pseudofloscula</i>	0.0	0.0	0.0	0.1	0.2	0.0	5.4	0.5	0.6	0.0	0.0	0.3
Dyko	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.1)	(0.2)	(0.0)	(1.9)	(0.2)	(0.6)	(0.0)	(0.0)	(0.2)
<i>Lemonniera terrestris</i>	6.6	1.6	0.2	1.4	0.1	0.0	0.0	0.2	0.6	0.0	2.2	0.0
Tubaki	(2.6)	(0.9)	(0.2)	(0.9)	(0.1)	(0.0)	(0.0)	(0.1)	(0.5)	(0.0)	(0.6)	(0.0)
<i>Mycocentrospora sp.</i>	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.1)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)
<i>Stenocladia neglecta</i>	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Marvanová & Descals	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.2)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)
<i>Tetrachaetum elegans</i>	0.0	0.4	12.5	0.1	0.0	0.0	0.1	1.3	1.3	2.2	0.1	0.0
Ingold	(0.0)	(0.2)	(2.8)	(0.1)	(0.0)	(0.0)	(0.1)	(0.8)	(0.7)	(0.8)	(0.1)	(0.0)
<i>Tetracladium marchalianum</i>	21.1	49.1	1.3	22.8	9.2	16.4	26.2	8.0	37.3	10.5	9.4	12.3
De Wild.	(3.9)	(10.3)	(0.9)	(5.7)	(1.4)	(5.6)	(13.7)	(2.1)	(5.3)	(4.7)	(2.1)	(1.8)
<i>Tetracladium setigerum</i>	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
(Grove) Ingold	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.4)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)
<i>Tricladium angulatum</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	3.3	2.8	0.5	0.0	0.3
Ingold	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.2)	(0.0)	(0.0)	(1.3)	(1.1)	(0.3)	(0.0)	(0.2)
<i>Tripospermum camelopardus</i>	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0
Ingold, Dann & P.J. McDougall	(0.2)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.1)	(0.0)
<i>Triscelophorus acuminatus</i>	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Nawawi	(0.0)	(0.2)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)
<i>Triscelophorus monosporus</i>	0.0	0.1	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0
Ingold	(0.0)	(0.1)	(0.0)	(0.3)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.3)	(0.0)	(0.0)
Sporulation rate	0.37	0.32	2.41	0.63	2.08	1.16	2.99	1.48	1.21	2.79	0.97	1.63
(μg^{-1} leaf AFDM day ⁻¹)	(0.33)	(0.10)	(0.73)	(0.44)	(0.89)	(0.51)	(2.08)	(0.80)	(1.23)	(1.91)	(0.62)	(0.94)

Table S3 – Relative abundance (%) of leaf-associated invertebrate taxa (including strict to occasional shredder*) and total invertebrate and shredder abundances after 21 days of exposure at the 12 sites. Values are means (SE) of the 6 experimental units per stream. S1: Boulouze, S2: Agros, S3: Gimone, S4: Tescou, S5: Orbe, S6: Touch, S7: Sausse, S8: Petit Midour, S9: Girou, S10: Bergon, S11: Ayroux and S12: Rieu-Tort.

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
<i>Aeshnidae</i>	-	-	-	-	0.1 (0.1)	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aphelocheiridae</i>	-	-	-	-	-	0.2 (0.2)	-	-	-	-	-	-
<i>Asellidae</i> *	0.1 (0.1)	0.5 (0.3)	-	-	-	-	3 (2)	0.6 (0.6)	-	0.4 (0.2)	-	-
<i>Athericidae</i>	-	-	0.1 (0.1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Baetidae</i>	1.4 (1.3)	14.8 (6.3)	0.5 (0.2)	9.4 (6.5)	2.7 (1.9)	5.5 (0.6)	0.9 (0.5)	0.6 (0.6)	0.7 (0.7)	0.6 (0.5)	0.5 (0.5)	0.5 (0.5)
<i>Brachycentridae</i>	-	-	0.3 (0.2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Caenidae</i> *	-	-	0.1 (0.1)	-	-	0.7 (0.5)	-	-	-	3.7 (1.7)	-	-
<i>Calopterygidae</i>	-	-	-	0.1 (0.1)	0.3 (0.2)	0.4 (0.2)	0.2 (0.2)	0.6 (0.6)	-	0.6 (0.3)	-	-
<i>Capniidae</i> *	-	-	0.2 (0.2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ceratopogonidae</i>	0.6 (0.3)	7.4 (2.7)	0.1 (0.1)	-	0.8 (0.3)	0.6 (0.2)	-	1.8 (1.8)	0.4 (0.4)	1.5 (0.3)	0.4 (0.4)	1.2 (0.5)
<i>Chironomidae</i>	40.4 (18.6)	46.7 (13.5)	20.7 (6.4)	80.9 (12.2)	87.9 (30.1)	63.1 (12.8)	92.8 (25.8)	79.8 (66.3)	61.8 (18.3)	79.5 (17.4)	86.6 (14.8)	96.2 (13.2)
<i>Corixidae</i>	-	-	-	-	-	-	0.2 (0.2)	-	-	-	-	-
<i>Dytiscidae</i>	-	0.7 (0.3)	-	-	0.1 (0.1)	-	-	-	0.7 (0.7)	-	-	-
<i>Elmidae</i>	-	1.1 (0.5)	7.5 (3.2)	-	0.3 (0.2)	3.2 (0.7)	-	0.6 (0.6)	-	0.5 (0.5)	-	-
<i>Empididae</i>	-	-	0.3 (0.3)	-	-	-	-	0.6 (0.6)	-	-	-	-
<i>Ephemerellidae</i>	-	0.5 (0.3)	0.3 (0.3)	-	0.1 (0.1)	0.2 (0.2)	0.2 (0.2)	-	-	8.9 (2.6)	-	-
<i>Ephemeridae</i> *	-	-	-	0.4 (0.4)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Glossiphoniidae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.9 (0.5)	0.4 (0.4)
<i>Gyrinidae</i>	-	-	0.7 (0.4)	-	-	0.2 (0.2)	-	-	-	-	-	-
<i>Heptageniidae</i>	-	-	0.8 (0.3)	0.8 (0.4)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hydrachnidae</i>	-	0.5 (0.3)	2.9 (1.4)	0.3 (0.2)	0.4 (0.3)	10.4 (2.4)	-	1.8 (1.8)	-	0.4 (0.2)	-	-
<i>Hydraenidae</i>	-	-	0.4 (0.2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hydrobiidae</i> *	-	6.9 (3.0)	0.1 (0.1)	-	0.1 (0.1)	0.2 (0.2)	0.2 (0.2)	-	3.0 (2.1)	0.1 (0.1)	8.9 (3.9)	-
<i>Hydropsychidae</i>	-	-	15.8 (6.9)	0.1 (0.1)	1.7 (1.0)	4.1 (1.4)	-	0.6 (0.6)	-	-	1.3 (0.6)	-
<i>Hydroptilidae</i>	-	-	0.6 (0.5)	-	0.2 (0.1)	3.4 (2)	-	0.6 (0.6)	-	0.5 (0.3)	-	-
<i>Leptoceridae</i>	-	-	0.2 (0.2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leptophlebiidae</i> *	-	0.5 (0.3)	0.4 (0.4)	1.6 (0.9)	0.1 (0.1)	-	-	-	-	0.1 (0.1)	-	-
<i>Limnephilidae</i> *	3.8 (2.3)	5.4 (2.1)	0.8 (0.5)	2.9 (1.1)	2.4 (1.3)	0.6 (0.2)	0.3 (0.2)	0.6 (0.6)	1.1 (0.7)	0.1 (0.1)	-	-
<i>Limoniidae</i> *	0.1 (0.1)	0.1 (0.1)	-	0.1 (0.1)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lymnaeidae</i> *	-	0.7 (0.5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nemouridae</i> *	51.1 (34.3)	9.5 (2.4)	1.0 (0.6)	2.2 (0.7)	0.9 (0.8)	0.4 (0.2)	0.3 (0.3)	-	2.2 (1.5)	0.1 (0.1)	0.9 (0.9)	-
<i>Oligochaeta</i>	0.1 (0.1)	-	-	0.2 (0.2)	-	-	-	1.3 (1.3)	-	-	-	-
<i>Perlodidae</i>	-	2.4 (1.1)	0.1 (0.1)	-	-	-	-	-	-	0.2 (0.2)	-	-
<i>Physidae</i> *	0.1 (0.1)	1.2 (0.8)	-	-	-	-	0.2 (0.2)	-	3.5 (3.5)	-	-	0.8 (0.5)
<i>Piscicolidae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1 (0.1)	-	-
<i>Planorbidae</i> *	-	0.3 (0.3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4 (0.4)
<i>Psychodidae</i> *	-	0.1 (0.1)	-	-	-	-	-	0.6 (0.6)	-	-	-	-
<i>Polycentropodidae</i>	0.1 (0.1)	-	-	-	0.1 (0.1)	-	-	-	-	0.4 (0.2)	-	-
<i>Rhyacophilidae</i>	0.3 (0.1)	0.3 (0.3)	0.2 (0.2)	-	0.2 (0.2)	-	-	-	0.4 (0.4)	0.5 (0.5)	-	-
<i>Simuliidae</i>	1.8 (1.2)	-	11.1 (2.6)	0.9 (0.9)	1.4 (0.9)	6.9 (3.6)	1.8 (0.7)	8.6 (8.6)	26.2 (6.3)	1.3 (1.0)	-	-
<i>Stratiomyidae</i> *	-	0.4 (0.4)	-	-	0.1 (0.1)	-	-	-	-	-	-	-
<i>Taeniopterygidae</i>	-	-	34.7 (7.9)	-	0.2 (0.2)	-	-	1.2 (0.7)	-	0.3 (0.3)	-	-
<i>Tipulidae</i> *	-	0.1 (0.1)	0.1 (0.1)	-	-	-	-	-	-	-	0.4 (0.4)	0.4 (0.4)
Total invertebrates (g ⁻¹ leaf AFDM)	135.9 (77.7)	54.2 (15.0)	106.1 (30.0)	70.3 (11.2)	103.1 (34.2)	50.2 (10.1)	54.6 (15.4)	22.0 (18.1)	18.4 (4.4)	56 (11.7)	18.4 (3.4)	22.0 (2.8)
Total shredders (g ⁻¹ leaf AFDM)	75.2 (49.7)	14.0 (3.2)	2.8 (1.2)	5.1 (1.9)	3.7 (1.4)	0.9 (0.1)	2.2 (1.4)	0.4 (0.4)	1.8 (1.2)	2.6 (1.0)	1.9 (0.8)	0.4 (0.2)

Chapitre 3 : Comparaison des indicateurs biotiques et des métriques liées au processus de décomposition à l'échelle régionale : enjeux pour l'évaluation du statut écologique des rivières

Regional scale comparison of current structural indicators and litter decomposition-based functional metrics: implications for stream health assessment

Ce chapitre présente un article en préparation pour une prochaine soumission à une revue d'écologie appliquée ou de sciences de l'environnement. Il a aussi donné lieu à une communication orale à une conférence internationale³.

Résumé du chapitre

La Directive Cadre sur l'Eau (DCE, 2000) définit le statut écologique des rivières comme « une expression de la qualité de la structure et du fonctionnement des écosystèmes aquatiques », la structure se référant aux paramètres physicochimiques et à la structure des communautés biologiques et le fonctionnement comme l'ensemble des activités et des processus réalisés par les communautés biologiques. Toutefois la DCE n'a développé aucune évaluation directe du fonctionnement des eaux courantes contrairement au développement de nombreux indicateurs structurels basés sur les éléments de la qualité biologique (EQBs). Il devient donc urgent d'évaluer la complémentarité entre les approches fonctionnelles et structurelles pour justifier de l'intérêt d'un développement d'une évaluation du statut écologique des eaux courantes basée à la fois sur la structure et le fonctionnement.

³ Brosed M. & Chauvet E. (2015) « Monitoring of freshwater ecosystems: contribution of leaf litter decomposition » 9th Symposium for European Freshwater Sciences (SEFS 9), 6-10 juillet 2015, Genève (Suisse).

L'objectif de ce chapitre est de comparer l'évaluation du statut écologique à partir des indicateurs structurels basés sur les invertébrés et les diatomées à l'évaluation fonctionnelle, à partir du processus de décomposition. Des altérations de la diversité, de la polluosensibilité et des activités peuvent-être simultanément évaluées par les indicateurs structurels et le processus de décomposition, si l'on suppose une certaine consistance dans la réponse structurelle et fonctionnelle. Toutefois des divergences de sensibilité des indicateurs structurels et fonctionnels et dans le type de réponse ont été mises en évidence, tel que la réponse non monotone associée au gradient d'eutrophisation (Palmer & Febria, 2012, Woodward et al., 2012).

Les taux de décomposition et des métriques associées ont été mesurés sur 58 sites des réseaux de surveillance du SO de la France, sélectionnés pour avoir un large panel de sites ayant un statut écologique de mauvais à très bon défini à partir des indicateurs structurels développés en France à partir des invertébrés benthiques (IBGN et I₂M₂) et des diatomées (BDI). Les taux de décomposition ont été mesurés en hiver en chacun des sites à partir de six répliques par sites composés chacun d'un sac à fines mailles (vide de maille de 0,5 mm) et d'un sac à grosses mailles (9 mm) contenant chacun $4 \pm 0,04$ g de feuilles d'aulne récoltées après abscision. Chaque réplique est placée en zone de courant et retirée après 21 jours d'exposition. La biomasse fongique, le taux de sporulation et la richesse taxonomique en conidies ont été mesurés à partir de la litière restante des sacs fines mailles, tandis que la densité des détritivores et des indices de diversité (richesse taxonomique, indice de Shannon et indice d'équitabilité de Piélou) ont été calculés à partir de la macrofaune (> 0,5 mm) retrouvée dans les sacs grosses mailles. En plus de la comparaison des indicateurs invertébrés avec les taux de décomposition et des métriques associées, ont été calculé l'abondance et les mêmes indices de diversité en rapportant aux détritivores des listes faunistiques fournies par l'Agence de l'Eau Adour-Garonne.

Les indicateurs structurels sont corrélés entre eux mais aucune tendance n'est observée avec les taux de décomposition. Des correspondances indirectes sont observées, associant 1) les taux de décomposition et les métriques qui composent les indicateurs structurels : corrélation négative entre k_{total} et l'abondance de taxon ovovivipares, corrélation positive entre $k_{\text{microbien}}$ et la richesse taxonomique en invertébré de l'IBGN ; 2) les taux de décomposition et les détritivores identifiés avec les indicateurs structurels : corrélation positive entre $k_{\text{microbien}}$ et l'abondance de détritivores dans les listes faunistiques de l'IBGN et de l'I₂M₂.

Les indicateurs structurels invertébrés et diatomées sont stimulés par les mêmes gradients environnementaux associés à l'altitude et aux substrats grossiers et inhibés dans les sites ayant une DBO₅ élevée. Un découplage des taux de décomposition a été mis en évidence le long des gradients environnementaux avec des taux de décomposition total et invertébré faibles dans les bassins versants de grande taille et les sites ayant des surfaces cultivées dans le corridor rivulaire, tandis que le taux de décomposition microbien est stimulé par les sites aux eaux bien oxygénées et fraîches.

Introduction

Since the adoption of the WFD in 2000, the assessment route in Europe has been considerable by putting ecosystem integrity at the basis of management decisions (European Commission, 2000), developing WFD-compliant methods e.g. based on biological parameters related to reference conditions, supporting a large number of European (i.e. WISER, MIRAGE, RESH, MARS) and national research projects on the ecological assessment (e.g. Hering et al., 2013), and achieving intercalibration of the member states methodologies (i.e. 230 methods from 28 countries; European Commission, 2013). The aquatic biota has been designated as the pertinent compartment to assess ecosystem status. Indeed, freshwater communities integrate ecosystem modifications both in time and space and realize a number of ecological processes. The WFD specifically prescribes which types of organism (i.e. benthic macroinvertebrate, diatom, fish, macrophyte and phytoplankton) and response variables (i.e. biological indicators based on taxonomic composition, specific abundance and diversity, abundance of disturbance-sensitive taxa and insensitive taxa) should be used (European Commission, 2000). Despite such advances, ten priority issues related to the ecological status have been highlighted, with one of them being the development of tools to assess ecosystem functions (8th Top-10 issue, Reyjol et al., 2014).

Benthic macroinvertebrates have been widely used in bioassessment (Martinez-Haro et al., 2016, Birk et al., 2012, Hering et al., 2006b) as they are abundant, easy to collect and identify and sensitive enough to many environmental impacts. They play a pivotal role in ecological fluxes (e.g. organic matter processing and nutrient cycling) and in trophic networks as both consumer and prey (Graça 2001; Vanni 2002). They are present along the entire river continuum at all latitudes, and they integrate environmental changes during their life cycle (i.e. from months to years, depending on species). They provide important information to detect anthropogenic alterations as many species have different ranges of tolerance and sensitivity to stressor (Metcalf 1989; Bonada et al., 2006). Macroinvertebrates are primarily used for assessing fermentable organic pollution (Verneaux 1973; Armitage et al., 1983; Statzner et al., 2001; Friberg et al., 2010), hydromorphological degradation (Leps et al., 2015; Turunen et al., 2016), acidification and general stress (Heatherly et al., 2007; Matthaei, Piggott & Townsend 2010; Wagenhoff, Townsend & Matthaei 2012; Piggott, Townsend & Matthaei 2015). Diatoms are used in bioassessment in complement to macroinvertebrates due to several advantages as bioindicators. As primary producers, they occupy the trophic bottom position in aquatic food webs meaning that any disturbance of diatom populations is likely to affect other aquatic organisms consuming them directly or indirectly (Andrén and Jarlman 2008). Diatoms occur in rivers of the globe and constitute one of the most diverse groups of algae in freshwaters, spanning most ecological conditions of the aquatic environment (Soininen, 2007). With their short generation time (and high rate of reproduction) diatoms are particularly sensitive to the local changes in water quality, e.g.

acidification, increased mineralization (Van Dam et al., 1994, Hill et al., 2001, Torrisi et al., 2010), or organic and nutrient enrichment (Dere et al., 2006) and they respond quickly to water quality degradation via modified assemblage composition and diversity (Feio et al., 2009). Ecological information is available for many species, which often tolerate narrow ranges of several abiotic factors (Coste et al., 2009).

However the river ecosystem status is defined as “an expression of the quality of the structure and functioning of aquatic ecosystems”, where the term “structure” refers to the physical and chemical settings and to the biological structure of ecosystems (European Commission, 2000). The “function” of the ecosystem refers to multiple ecosystem aspects from species roles, and the “functioning of ecosystem” to the services provided by them (Jax & Setälä 2005). In other words, the ecosystem functioning could be defined as the activities, processes, or properties of ecosystems influenced or not by its biota (Palmer & Febria, 2012). However the ecological assessment of superficial waters within the WFD relies on biological structure only (e.g. biodiversity measures and community composition including indicators based on sensitive species) as from suggested functions (e.g. nutrient cycling and retention, productivity, decomposition and metabolism) have not been sufficiently studied on their response to environmental stressors (Sandin & Solimini, 2009). Linking structural with functional properties of freshwater ecosystem health thus becomes an important and urgent challenge in contemporary ecology and ecosystem health assessment (Palmer & Febria, 2012).

Decomposition of allochthonous organic matter, as a key ecosystem-level process driving most of energy in forested streams, provides integrative measures of stream ecosystem health along anthropogenic stress (Gessner & Chauvet, 2002; Pascoal et al., 2003; Young, Matthaei & Townsend, 2008; Tank et al., 2010). In temperate regions, plant litter decomposition is governed by the activities of microorganisms (mainly fungi) and macroinvertebrate detritivores (namely shredders), which, due to different biological and ecological traits, may respond differently to anthropogenic stressors (Gessner, Chauvet & Dobson, 1999; Hieber & Gessner, 2002). Depending on stressor nature and intensity, litter decomposition may be enhanced or reduced, in combination with shifts in dominance of microbial and invertebrate decomposer taxa (see Gessner & Chauvet, 2002; Pascoal et al., 2003; Young et al., 2008). Examining the sensitivity of aquatic communities to various perturbations, such as realized in biomonitoring across a large territory (e.g., a region) and confronting it to the parallel alteration of litter decomposition is thus highly relevant. Most studies comparing the responses of structural indicators and litter decomposition, as a proxy of ecosystem functioning, have focused on macroinvertebrates (Dangles & Malmqvist, 2004; Riipinen et al., 2009; Magbanua et al., 2010, Lecerf et al., 2006a). Studies comparing the responses of diatoms and litter decomposition are fairly recent, some of them pointed out a potentially positive priming effect of leaf-associated biofilms growing on decomposition rate (Danger et al., 2013; Kuehn et al., 2014).

Our goal in the present study was to compare litter-decomposition metrics to structural bioindicators routinely used in the assessment of river quality. Our study encompassed a wide range of ecological situations and stressors across a large region, South-West of France. We selected 58 sites regularly monitored by the Adour-Garonne Water Agency, for which records of French biotic indexes based on macroinvertebrates (IBGN, Indice Biotique Global Normalisé; I₂M₂, MultiMetric Invertebrate Index) and diatoms (BDI, Biological Diatom Index) revealed contrasted ecological impairments, with water quality ranging from poor to very good (Rimet et al., 2005; Mondy et al., 2012). We hypothesized some divergences to occur, e.g. due to differential sensitivity to some pressure types or to discrepancies in response form, such as documented with the non-monotonous pattern of decomposition rate along eutrophication gradients (Woodward et al., 2012). Such a result would mean complementarity between approaches and provide a strong justification for the implementation of a comprehensive assessment of freshwater ecosystems based on both structure and function, as the two sides of a same coin (Gessner & Chauvet, 2002).

Material and methods

Study sites

The 58 sites surveyed in winters 2013 and 2014 were selected from the database of the Adour-Garonne Water Agency (South West of France) along a gradient of ecological status determined from both invertebrate and diatom indicators. All streams were permanent, from 2nd to 4th order and regularly monitored by the agency for water chemistry, biological assessment and physical pressure identification.

Physical and chemical analyses of stream water

Substrate coarseness index

A substrate coarseness index was calculated using the mesohabitat description made during macroinvertebrate sampling (Friberg et al., 2010). The substratum classes included stones (>6 cm), coarse gravel (2–6 cm), gravel (2 mm–2 cm), sand (0.01 mm–2 mm), silt/clay (<0.01 mm) logs, roots and vegetation. Overlaying organic matter was classified as either mud (<1 mm) or coarse detritus (>1 mm). In addition, vegetation cover was quantified. Depending on coverage on the reach each substratum class was assigned a score (S) between 0 and 3: not present (0), sparsely present (1; coverage > 0–10%), moderately present (2; coverage 11–30%) and dominating (3; coverage > 30%). The substratum composition on the entire sampling reach was quantified using a substratum index. All substrata were assigned a coarseness index value (C); stones, coarse gravel and vegetation were given a value of 2, gravel was assigned a value of 1, sand and coarse detritus were

given a value of 0, silt, clay and filamentous green algae were given a value of -1 and mud a value of -2.

The substratum coarseness index was calculated as the sum of index values multiplied by the score for the individual substrata on the site with 12, the maximum number of substratum categories and i the individual substratum:

$$\text{Substrate coarseness} = \sum_{i=1}^{12} S_i \times C_i$$

Substrate suitability index

A substrate suitability index was calculated from the biogenic score (b_i) and the percentage of the substrate (p_i) at the reach scale from invertebrate sampling protocol. According to the Multi-Habitat Sampling method (described in IBGN section), following scores were attributed for each substrates: '11' for bryophytes, '10' for immersed macrophytes, '9' for leaf litter, '8' for roots and logs, '7' for pebbles, '6' for blocks, '5' for gravels, '4' for immersed macrophytes, '3' for fine sediments, fine organic material and mud, '2' for sand and silt, '1' for algae and '0' for uniform natural or artificial surfaces. The substratum suitability index was calculated as the sum of percentage of the considered substrate multiplied by its associated biogenic score with 11, the maximum number of substratum categories and i the individual substratum:

$$\text{Substrate suitability} = \sum_{i=0}^{11} b_i \times p_i$$

Land use in the riparian corridor

Land-use types in the riparian corridor (*i.e.* a 50 m wide buffer that extended 1500 m upstream from each sampling reach) were described by the surface's proportion of six land use categories: wood, tree plantation, grassland, agricultural area, artificial area and reservoir. Land covers were calculated using orthophotographs from 2010 to 2013 (BD ORTHO® 2.5 m of the French National Institute of Geographic Information) and the ESRI ArcGIS TM software.

Chemistry

All stream water characteristics were obtained from the Adour-Garonne Water Agency database for the year corresponding of the sampling. For structural indicators, (from June to September) were taken in account, while winter data were used for decomposition rate (from January to March) chemical characterization. Determinations comprised water temperature, pH, conductivity, and concentrations of inorganic nutrients (nitrate, nitrite, ammonium and orthophosphate), oxygen saturation, biochemical oxygen demand (BOD_5), the dissolved organic carbon (CO) and suspended material.

Physical and chemical parameters were summarized in Table 6.

Table 6 – Descriptive statistics of environmental parameters at the 58 studied sites.

	minimum	median	max	average	standard error
Elevation (m)	5	109	828	176	184
Catchment area (km ²)	3.8	25.7	178.8	41.1	40.5
Landuse types in the riparian corridor (%)					
Wood	0	45	100	47	26
Grassland	0	19	70	21	18
Plantation	0	0	27	2	5
Crop	0	10	75	24	27
Artificial reservoir	0	0	19	1	3
Riverbed substrate					
Substrate coarseness	-4	7	13	6	4
Substrate suitability	195	394	1076	415	153
Water chemistry during structural indicator sampling					
water temperature	13.4	19.0	26.0	19.0	2.6
pH	6.6	8.2	8.9	8.2	0.5
Conductivity (μS.cm ⁻¹)	45.0	588.0	2190.0	566.6	388.8
Oxygen saturation	8.6	77.2	100.0	73.8	20.2
N-NH ₄ (μg.L ⁻¹)	0.0	0.1	18.7	0.9	3.1
DIN (μg N.L ⁻¹)	0.4	4.8	28.6	6.7	6.4
P-PO ₄ (μg.L ⁻¹)	0.0	0.0	2.6	0.2	0.5
BOD ₅ (mg O ₂ .L ⁻¹)	1.1	3.0	31.0	4.0	4.0
DOC (mg C.L ⁻¹)	0.7	6.3	110.0	8.0	13.6
Suspended material (mg.L ⁻¹)	7.9	51.0	1360.0	121.9	226.4
Water chemistry during leaf litter decomposition experiment					
Water temperature	4.5	8.8	11.7	8.5	1.7
pH	6.2	8.0	8.5	7.8	0.6
Conductivity (μS.cm ⁻¹)	31.2	424.3	872.5	403.9	254.8
Oxygen saturation (%)	79.1	98.4	114.7	97.6	7.4
N-NH ₄ (μg.L ⁻¹)	0.0	0.0	0.7	0.1	0.1
DIN (μg N.L ⁻¹)	0.6	4.7	26.1	7.3	5.8
P-PO ₄ (μg.L ⁻¹)	0.0	0.0	0.4	0.0	0.1
BOD ₅ (mg O ₂ .L ⁻¹)	0.5	1.6	8.0	1.8	1.2
DOC (mg C.L ⁻¹)	0.4	3.7	28.5	4.3	4.0
Suspended material (mg.L ⁻¹)	2.0	12.4	87.0	16.9	16.7

Functional metrics

Decomposition rates

In autumns 2012 and 2013, alder (*Alnus glutinosa* Gaertn.) leaves were collected just after abscission from a riparian zone within the same European hydroecoregion. Leaves were air-dried for 7 days. Coarse mesh (CM, 9 mm mesh size) and fine mesh (FM, 0.5 mm mesh size) bags (15 × 20 cm) were filled with 4.00 ± 0.04 g of alder leaves. Initial dry mass of leaf

sample mass was determined by using a correction coefficient obtained from 8 samples of 4 g of alder leaves dried at 105 °C for 48 h.

In each stream, six experimental units consisting in one CM bag and one FM bag were anchored in the streambed in mid-February 2013, 2014 and 2015. Boulders were added to maintain the litterbags at the stream bottom. The six experimental units were placed at a distance of >5 m each other by selecting comparable conditions of exposition (e.g. depth, substratum) within stream riffles (blocks) whenever possible. Temperature was continuously monitored in each stream using temperature loggers (HOBO UA-001-64, Bourne, MA, USA). After 21 to 25 days of exposure, mesh bags were removed cautiously and stored in a cool box during transport to the laboratory.

Leaf litter from fine mesh bags was gently washed under tap water to remove sediments, and 10 leaf discs per sample were cut in different leaves avoiding the central vein. Five out of the ten discs (12 mm of diameter) were used immediately to induce sporulation of aquatic hyphomycetes and the other five discs were stored at -20° C for later fungal biomass estimation. The remaining parts of leaves were dried at 105° C for 48 h before being weighed (± 0.01 g).

Leaf litter from coarse mesh bags was gently washed, and associated macroinvertebrates were collected on a 500 μ m sieve and stored in ethanol (70 vol/vol). Leaves were dried to constant mass at 105° C for 48 h before being weighed (± 0.01 g). The ash free dry mass (AFDM) was extrapolated from aliquots of ground dry litter (0.25 ± 0.02 g) burnt at 550 °C for 3 h, and then weighted to determine ash content.

Exponential leaf breakdown rate (k) was calculated for each bag using the log-transformed exponential model (Webster & Benfield, 1986): $k = - \ln (M_t / M_0) / t$, with M_0 the initial AFDM, M_t is the AFDM remaining after exposure, and t is the exposure time (in days) during the exposure. Total (k_{total}) and microbial ($k_{microbial}$) breakdown rates were calculated from CM and FM bags, respectively. Invertebrate-driven breakdown rate ($k_{invertebrate}$) was calculated from the difference between the leaf AFDM remaining in CM and FM bag at each experimental unit. The $k_{total}/k_{microbial}$ and $k_{invertebrate}/k_{microbial}$ ratios were used to evaluate shifts in the relative contribution of shredders and microorganisms to leaf breakdown (Gessner & Chauvet, 2002).

Fungal biomass

Ergosterol concentration was used as a proxy of leaf-associated fungal biomass (Gessner & Chauvet, 1993). Lipids were extracted from sets of five leaf discs by heating (80 °C for 30 min) in 0.8 % (mass/vol) KOH-methanol, purified by solid-phase extraction (Oasis HLB 3cc (60mg) Extraction Cartridge; Waters, Milford, MA, USA), and quantified at 282 nm and 33 °C using high-performance liquid chromatography on a C₁₈ column with methanol as the mobile phase (Gessner 2005). Ergosterol was converted to fungal biomass using a conversion factor of 5.5 mg ergosterol g⁻¹ AFDM (Gessner & Chauvet, 1993), and biomass expressed as mg per g leaf AFDM.

Sporulation rates of aquatic fungi

For each sample, sporulation was induced from the set of five leaf discs introduced into 100-mL Erlenmeyer flasks with 20 mL of filtered stream water (GF/C, 1.2 μm pore size, Whatman, Maidstone, UK) placed on an orbital shaker at 12 °C. After 48 h of incubation, the conidial suspensions together with rinsing water were adjusted to 40 mL in 50 mL polypropylene tubes and fixed with 5 mL of 37.5% formaldehyde. Aliquots of conidial suspensions were filtered (Millipore SMWP, 5 μm pore size, Billerica, MA, U.S.A) and stained with 0.05 % (mass/vol) Trypan blue in 60 % lactic acid, with at least 200 conidia per replicate being identified and counted under the microscope at $\times 100$ to $\times 400$ (Gessner et al., 2007). Leaf discs were dried at 105 °C and weighted, and the sporulation rate was expressed as the number of conidia produced per μg^{-1} leaf AFDM d^{-1} .

Density of shredders

Invertebrates retrieved in litter bags were identified to the family level and assigned to functional feeding groups according to Tachet et al. (2010). Taxa were considered as shredders when their diet was at least composed of 20% of coarse particulate organic matter. The relative density of shredder taxa and shredder taxa richness were calculated. Density was expressed as number of individuals per gram of leaf AFDM.

Structural metrics

The indicators derived from the Biological Quality Elements (i.e. macroinvertebrates and benthic diatoms) obtained from the Adour-Garonne Water Agency database.

BDI

The diatom-based indicator norm (NFT 90-354, AFNOR 2007) consisted of sampling during stable flow usually in summer the biofilm developed on minimum 5 pebbles from riffle (sampling area of 100 cm^2 minimum). The sample was stored in ethanol (70 vol/vol) before treatment in the laboratory to remove the cellular content of diatoms to keep only their frustule, i.e. the silicified cell wall of diatoms consisting of two valves or overlapping halves, conserved in resin between slide and cover slip. After counting at least 400 diatom halves, the index is performed with OMNIDIA® 5 software to calculate the overall sensitivity of the sampled population, taking in account the abundance of each taxon among 209 indicator taxa having an ecological profile according to seven water quality parameters (temperature, velocity, pH, salinity, organic matter, nutrients and silica).

IBGN

Data were extracted from the Adour-Garonne Water Agency database from fieldwork performed between 2012 and 2014. Macroinvertebrates were sampled in summer during low

flow conditions on pre-defined mesohabitat types of each site with a normalized Surber net (mesh size of 500 μm , sampling area of 0.05 m^2) according to either the Normalised Global Biotic Index (IBGN, NF T90-350 AFNOR 1992, 2004) or the Multi-Habitat Sampling norm (XP T 90-333 in AFNOR 2009). The sampling with the IBGN protocol consisted of height samples units carried out on different mesohabitats in an order favouring the hosting capacity. Using the Multi-Habitat Sampling norm, four sample units from “marginal habitats” (i.e. covering below 5% of the sampling area) were selected according to their hosting capacity (“B1” group) and height sample units were collected from “major habitats” (i.e. covering at least 5% of the sampling area). Four of these mesohabitats were chosen according to their hosting capacity (“B2” group). The last four samples were taken according to their coverage dominance within the sampling area (“B3” group). Samples from each group were gathered and preserved in formalin (final concentration of 4%). In the laboratory, invertebrates were sorted, counted and identified at the normalized taxonomic level i.e. the family level for IBGN protocol (except Oligochaeta, Hydrachnidae, Nematelminthes, Hydrozoa, Porifera, Bryozoa and Nemertea) and the genus level for Multi-Habitat Sampling norm (except for Oligochaeta, Hydrachnidae, Nematelminthes, Hydrozoa, Porifera, Bryozoa and Nemertea, some Diptera (mainly family), Trichoptera Limnephilidae, Coleoptera Dytiscidae and Hydrophilidae (sub family); norm XP T 90-388 in AFNOR, 2010). The invertebrate-based score was calculated at the family level, taking into account the taxonomic variety (number of families counted) and the faunal indicator group (corresponding to the most sensitive family encountered) based on 8 samples of IBGN and samples B1 and B2 of the Multi Habitat Sampling.

I₂M₂

The I₂M₂ is based on the Multi-Habitat Sampling norm for the sampling method and the identification level. Five metrics are taken in account for the index calculation (Mondy et al., 2012). Three taxonomic metrics, the Shannon’s diversity Index (Shannon, 1948) on B1+B2 samples), the Average Score Per Taxon (ASPT, (Armitage et al., 1983), on B2+B3 samples) and the taxonomic richness (B1+B2+B3 samples). The two last metrics corresponded to biological traits regarding reproduction by calculating the relative frequency of potentially polyvoltinists (on B2+B3 samples) and ovoviviparous taxa (Tachet et al., 2010, (on B3 samples). All I₂M₂ indices have been computed using a R script version of June 2013. For each metric is calculated the ecological quality ratio according to the methodology of Hering et al. (2006a), with the best and worst values calculated for each stream hydroecoregion. Further, sub-i₂m₂ indices are calculated for each of the 17 anthropogenic stresses: 10 for water chemistry water and 7 for hydromorphology alterations (Mondy et al., 2012), as shown by this illustration with the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pressure:

$$i_2m_2^{PAH} = \frac{\sum_m (WE_m^{PAH} \times EQR_m)}{\sum_m DE_m^{PAH}}$$

with, $i_2m_2^{PAH}$, the sub-index for PAH pressure, WE_m^{PAH} , the weighted elemental metric m specific to the PAH pressure. This weighted metric is the measure of metric’s effectiveness

to discriminate disturbed conditions for the considered pressure. EQR_m is the EQR value for the considered metric.

The final I_2M_2 index is the arithmetical average of the 17 sub- i_2m_2 indices:

$$I_2M_2 = \frac{\sum_{p=1}^{17} i_2m_2^p}{17}$$

Metrics associated to structural indicators

From both IBGN and I_2M_2 were calculated taxa richness, Shannon Index, Pielou evenness and abundance metrics associated to the functional feeding group of shredders, taking into account macroinvertebrates having their diet at least composed of 20% of coarse particulate organic matter (Tachet et al., 2010).

Metrics associated to leaf litter decomposition

Conidia used to determined sporulation rates were identified under microscope at the species level using the detailed identification documentation on aquatic hyphomycetes of South Western France of Chauvet (1990) and the identification key focusing on aquatic hyphomycetes from temperate climates of Gulis et al. (2005). Shredders were identified to the family level and assigned to functional feeding groups according to Tachet et al. (2010), and considering macroinvertebrate as shredders when their diet was at least composed of 20% of coarse particulate organic matter. We calculated metrics relative to both fungi and shredders as the relative richness of conidia and shredders per g of leaf AFDM, the Shannon Index and the Pielou evenness.

Data analysis

Linear regressions were calculated among decomposition rates and structural indicators after log-transformation of k_{total} and $k_{invertebrate}$. In the case of non-linear relationship, a non-parametric smoothed curve was fitted through data using the local regression model “loess” from the library “stats” in R software. A Spearman Rank correlation was used to correlate the associated metrics of both structural indicators and decomposition rates. As ecosystem status ranged from bad to very good quality class, we tested the among-quality classes variation of decomposition rates (k_{total} , $k_{microbial}$ and $k_{invertebrate}$) for each structural indicator using ANOVAs and Tukey’s *post hoc* test to determine differences among groups. To describe the relationship between land use in riparian corridor, water chemistry, substratum indexes, Pearson correlation were calculated after log transformation when needed. For Spearman and Pearson correlations, the Type I error rate over group was controlled by applying the Bonferroni corrections (Rice, 1989). To interpret the relationship between

structural indicators, decomposition rates and environmental factors, two redundancy analyses (RDA) were carried out, the first focusing on structural indicators (n=54 stream sites) and the second focussing on decomposition rates (n=58 stream sites). The RDA consists in a constrained ordination based on linear (Euclidean distance) multiple regression between explanatory variables (i.e. environmental variables) and response variables (i.e. ecological indicators) variable (Borcard et al., 2011). The data were previously tested for normality (Kolmogorov-Smirnoff test) and were log-transformed to satisfy the assumptions of normality and homoscedasticity of residuals. Significances were assessed with ANOVA-like permutation tests (Monte Carlo permutation test, $p < 0.05$). Analyses were performed with the statistical software R version 3.1.3 and the package *vegan* (Oksanen et al., 2006) was used for RDA. The significance threshold was set at $p < 0.05$.

Results

Structural indices and decomposition rates

The IBGN scores in our 58 sites ranged from 0.2 to 1 with an average of 0.75 ± 0.24 (SD), and BDI ones from 0.5 to 1, except for a site with a low value of 0. When including the latter extreme value, the BDI score averaged 0.80 ± 0.18 (SD). The multiparametric invertebrate indicator I_2M_2 exhibited the widest range of scores, i.e. from 0 to 0.91, with an average of 0.41 ± 0.30 (SD). Among the 58 sites, the highest variability was reached by I_2M_2 ($CV_{I_2M_2} = 72\%$), followed by IBGN ($CV_{IBGN} = 32.5\%$) with BDI ($CV_{BDI} = 21.3\%$) exhibiting the most homogeneous scores among streams.

In the 58 streams, structural indicators from invertebrate and diatom sampling were positively intercorrelated (Fig. 9, $r > 0.68$, $p < 0.0001$). However the ecological status of these streams – from bad to very good quality classes – depended on the indicator used (Fig. 8). For IBGN, 49 % of streams reached at least a good status, contrasting with the 21 % streams reaching good status as assessed with I_2M_2 . The BDI score indicated that only one site had bad and one site had poor qualities, while 59% of sites showed at least a good ecological status. The most homogeneous quality class among structural indicators was the medium one encompassing between 25 % (I_2M_2) to 40 % (BDI) stream sites.

Total decomposition rate (k_{total}) exhibited a high variability at the regional scale (Fig. 9), from 0.0015 to 0.0284 °day⁻¹, with a mean of 0.0086 °day⁻¹ and a coefficient of variation ($CV_{k_{\text{total}}}$) of 76 %. Averaged decomposition rates due to invertebrates ($k_{\text{invertebrate}}$) and microorganisms ($k_{\text{microbial}}$) were similar, i.e. 0.0024 ± 0.0019 (SD) °day⁻¹ and 0.0023 ± 0.0009 (SD) °day⁻¹, respectively, with however a coefficient of variation in the invertebrate-driven decomposition ($CV_{k_{\text{invertebrate}}} = 79\%$) twice as high as in microbially-mediated decomposition ($CV_{k_{\text{microbial}}} = 38\%$).

No significant relationship was observed when we combine each structural index score with the averaged decomposition rates observed in the 58 sites (Fig. 9, Spearman correlation rank, $P > 0.13$), except between IBGN and k_{mic} , with a correlation close to be significant, with higher microbial decomposition rates when IBGN score increases (Spearman correlation rank, $P = 0.054$). Some patterns are however observable like a decreasing variability of k_{inv} along IBGN and I_2M_2 scores, and a higher variability of k_{tot} and k_{mic} at the highest score of IBGN and BDI due to the transposition of initial IBGN and BDI scores in EQR scores required by the WFD.

Decomposition rates were not significantly different among ecological quality classes based on the structural indicators (Fig. 10), except for IBGN, with k_{total} and $k_{\text{invertebrate}}$ exhibiting significantly lower values for the medium class (i.e., 3). Decomposition rate distributions were only tested on the three highest BDI quality classes, as the two lowest categories were only encountered at one site.

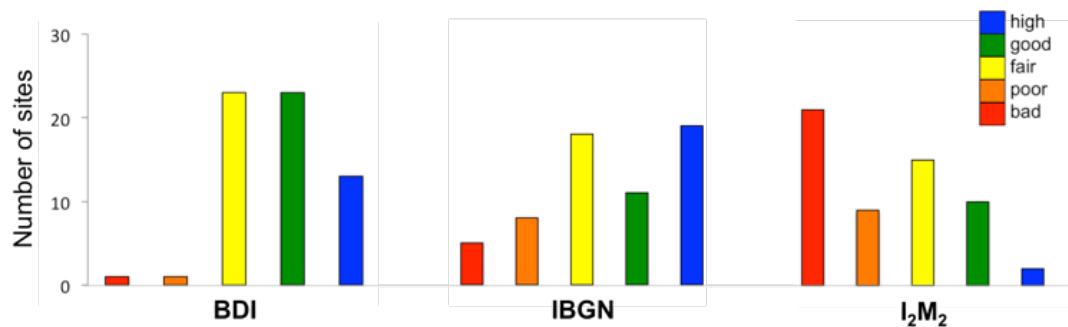


Figure 8 – Number of sites for each of the 5 classes of ecological status, from bad to high quality, for diatom-derived indicator (BDI) and invertebrate-derived indicators (IBGN and I_2M_2) and among our 6158 stream sites (only 57 stream sites for I_2M_2).

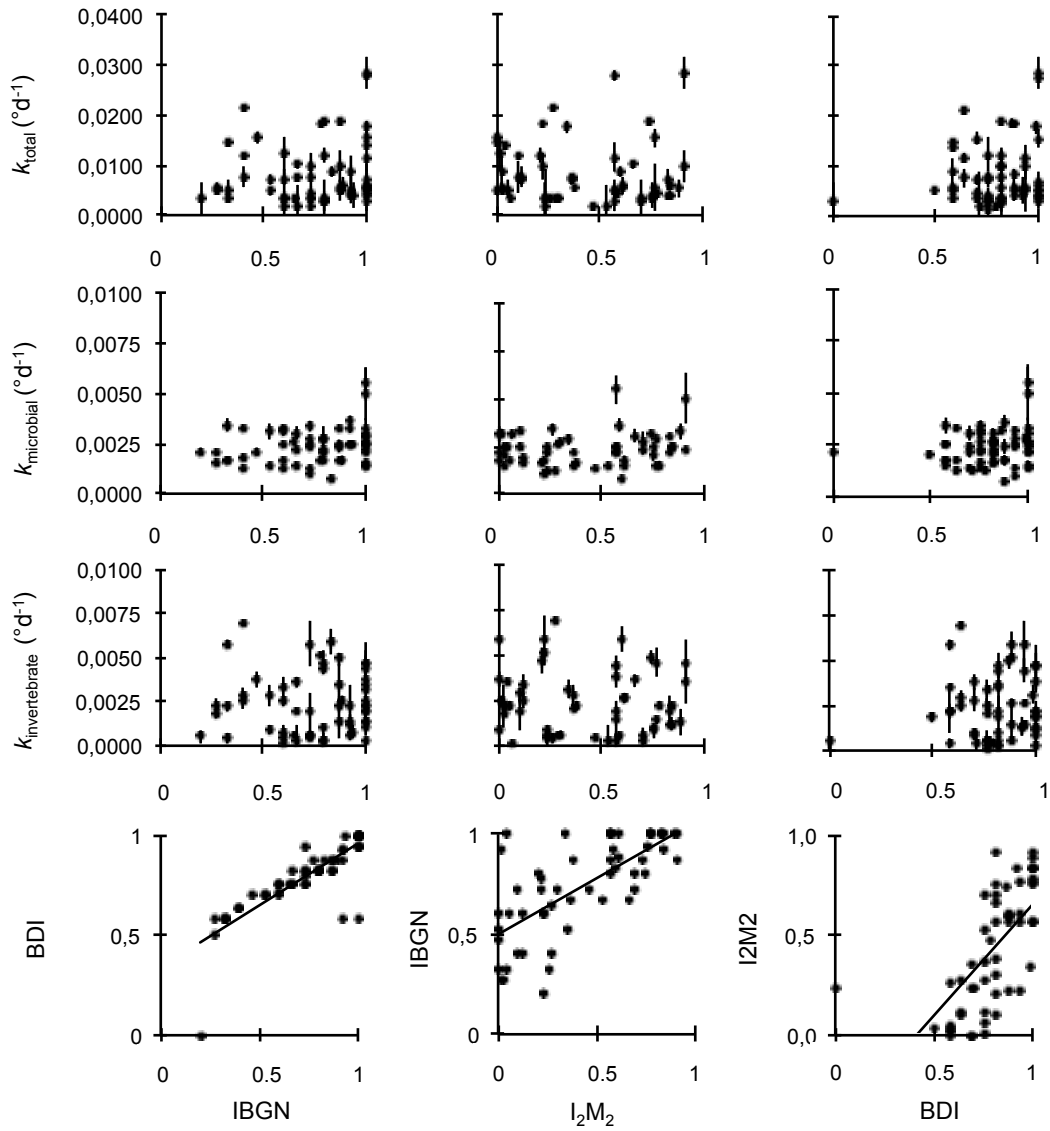


Figure 9 – Relationships between litter decomposition rates (mean $\pm$ SE) and French structural indicators for benthic macroinvertebrates (IBGN and I_2M_2) and diatoms (BDI) for 58 streams in SW France, and between structural indicators (bottom). Significant linear regressions are displayed.

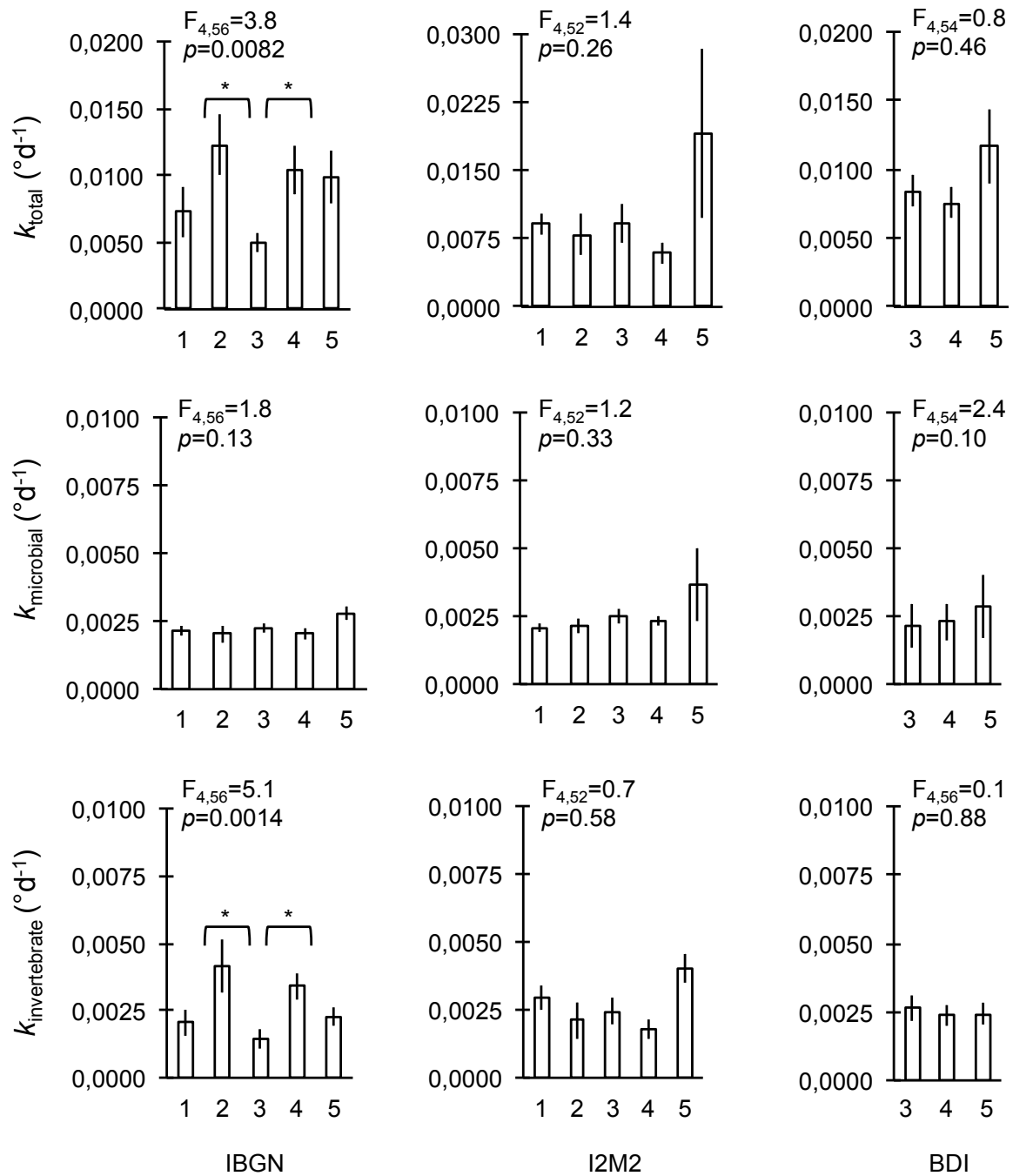


Figure 10 – Barplot of decomposition rates (mean $\pm$ SE) among quality categories – from bad (1) to very good (5) – based on invertebrate (IBGN and I₂M₂) and diatom (BDI) indicators. ANOVA F and *p-value* are given. Significant Post-hoc tests were conducted on quality categories with significant difference ($P < 0.05$) being displayed by *.

Associated metrics from structural indices and decomposition

The invertebrate structural indicators IBGN and I_2M_2 together with their associated metrics were strongly intercorrelated ($P > 0.003$; Table 5). For IBGN sampling, shredder taxa richness, abundance and Shannon Index were correlated to the IBGN score ($P < 0.0284$) but not shredder evenness ($P = 0.23$). For I_2M_2 sampling, shredder taxa richness, Shannon Index and evenness were correlated to the I_2M_2 score ($P < 0.0009$) but not shredder abundance ($r = -0.07, p = 0.6$). For decomposition rates, k_{total} was correlated to $k_{invertebrate}$ ($P < 0.0001$) but not to $k_{microbial}$ ($P = 0.63$). Considering correlations between decomposition rates and structural indicators-associated metrics (Table 7), k_{total} was negatively linked to the relative abundance of ovoviviparous taxa ($P = 0.018$), while $k_{microbial}$ was significantly correlated to the IBGN taxa richness and the abundance of shredders in the IBGN sampling ($P < 0.0488$). Considering correlations between structural indicators and decomposition-associated metrics (Table 7), IBGN score was related to shredder taxa richness in litterbags ($P = 0.0326$), while I_2M_2 score was positively correlated to shredder Shannon Index, fungal biomass and sporulation rates ($P < 0.0437$).

Table 7 – Spearman correlation rank among structural indicators, decomposition rates and their associated metrics. Significant correlation were in bold and ‘*’ denotes $P < 0.05$, ‘**’ denotes $P < 0.001$, ‘***’ denotes $P < 0.0001$ and ‘.’ denotes $P < 0.1$.

	Decomposition rates			Associated decomposition metrics								
	K_{total}	$K_{microbial}$	$K_{invertebrate}$	Shredder taxa richness	Shredder density	Shredder Shannon Index	Shredder evenness	Fungal biomass	Conidia richness	Sporulation rate	Conidia Shannon Index	Conidia evenness
<i>IBGN</i>	0.08	0.26	0.04	0.29 *	0.20	0.20	0.01	0.23 .	0.09	0.18	-0.06	-0.11
Taxa richness (B1+B2)	-0.03	0.27 *	-0.03	0.23 .	0.16	0.08	-0.05	0.33 *	0.12	0.22	-0.01	-0.03
Faunal Group Indicator (B1+B2)	-0.08	0.22	-0.06	0.42 **	0.14	0.36 **	0.10	0.28 *	0.03	0.26	-0.10	-0.09
<i>I2M2</i>	-0.21	0.15	-0.15	0.24 .	-0.09	0.30 *	0.22	0.33 *	-0.04	0.28 *	-0.14	-0.09
Taxa richness (B1+B2+B3)	-0.16	0.20	-0.12	0.41 **	0.10	0.29 *	0.05	0.36 **	0.01	0.29 *	-0.16	-0.18
ASPT (B2+B3)	-0.20	0.24 .	-0.19	0.22	-0.05	0.27 *	0.19	0.38 **	-0.02	0.27 *	-0.14	-0.07
Shannon Index (B2+B3)	-0.05	0.10	0.01	0.40 **	0.02	0.28 *	0.03	0.33 *	0.00	0.11	0.05	0.02
Polyvoltinism (B2+B3)	-0.04	0.10	0.02	0.24 .	0.00	0.29 *	0.15	0.37 **	0.08	0.21	-0.03	-0.01
Ovoviviparity (B3)	-0.32 *	0.08	-0.26	-0.03	-0.27 *	0.25 .	0.40 **	0.11	-0.14	0.36 **	-0.25	-0.15
<i>both</i>												
Shredder taxa richness (B1+B2)	0.07	0.18	0.09	0.38 **	0.18	0.26 .	0.03	0.24 .	0.17	0.11	0.10	0.04
Shredder taxa richness (B1+B2+B3)	0.05	0.27	0.04	0.44 **	0.13	0.33 *	0.08	0.32 *	0.14	0.19	0.00	-0.04
Shredder abundance (B1+B2)	0.20 .	0.31 *	0.10	0.27 .	0.30 *	-0.09	-0.32 *	0.33 *	0.18	0.24	-0.01	-0.16
Shredder abundance (B1+B2+B3)	0.26	0.20	0.19	0.19	0.37 **	-0.10	-0.29 *	0.22	0.23 .	0.14	0.12	-0.02
Shredder Shannon Index (B1+B2)	-0.08	0.03	-0.04	0.22	-0.04	0.27 .	0.21	0.01	-0.11	0.09	-0.08	0.00
Shredder Shannon Index (B1+B2+B3)	-0.02	0.05	0.03	0.22	0.00	0.25 .	0.17	0.03	-0.07	0.10	-0.06	-0.01
Shredder evenness (B1+B2)	-0.19	-0.09	-0.12	0.06	-0.14	0.17	0.25 .	-0.13	-0.23	0.15	-0.17	-0.07
Shredder evenness (B1+B2+B3)	-0.13	-0.10	-0.06	0.09	-0.09	0.19	0.23	-0.13	-0.17	0.14	-0.14	-0.06
<i>BDI</i>	0.05	0.05	0.03	0.01	0.00	-0.18	-0.16	0.07	0.16	0.06	0.10	0.13

Structural and functional responses to environmental factors

Environmental parameters for each site were intercorrelated and shown in Table 8. The elevation (5 to 828 m, Table 8) was correlated with other abiotic parameters, like water chemistry and substratum scores, while no correlation was observed with catchment area and percentages of riparian land use types (data not shown, $r > -0.17$ and $r < 0.08$, $P > 0.2$), except for tree plantations ($r = 0.24$ and $P = 0.057$), which was mainly found at low elevation. Catchment size was positively correlated to DIN in both summer and winter (for both season: $r = 0.34$, $P = 0.008$) and riparian grasslands were more present in streams with small catchment ($r = -0.27$, $P = 0.036$).

We tested the association of environmental attributes with structural indicators (RDA 1, Fig. 11) and decomposition rates (RDA 2, Fig. 12). Environmental parameters explained a significant proportion of variation in structural indicators ($F = 7.16$, $p < 0.001$) and decomposition rates ($F = 3.68$, $p < 0.001$). In RDA 1, the first two ecological gradients explained 78 % of the variation in structural indicators, mostly as a result of positive correlation with elevation, substratum coarseness and suitability indexes, and negative correlation to BOD₅ and water temperature. Axis 2 explained 8 % of structural indicators distribution, mostly as a stimulation of BDI score due to riparian grasslands. Overall, RDA 1 accounted for 80 % of structural indicators variation. In RDA 2 (Fig. 12), the first axis explained 46 % of the variation in decomposition rates with a negative correlation of both k_{total} and $k_{\text{invertebrate}}$ with catchment area and the proportion of crop in the riparian corridor, and a positive correlation with water temperature. The second environmental gradient explained 16 % of the decomposition rates, mainly due to $k_{\text{microbial}}$ being positively correlated with oxygen saturation and negatively to water temperature. Overall, RDA 2 accounted for 63 % of decomposition rate variation.

Table 8 – Pearson correlation coefficient among physical characteristics (elevation and catchment area), land uses, water chemistry and substratum scores for the 58 studied streams.

	Elevation	Catchment area	Land use in the riparian corridor				
			Wood	Grassland	Tree plantation	Field	Reservoir
<i>Summer chemistry</i>							
Temperature	-0.34 **	0.10	-0.33 **	-0.09	0.21	0.39 **	0.31 *
pH	0.20	0.08	-0.34 **	0.23	-0.16	0.32 *	-0.04
Conductivity	-0.49 ***	0.25	-0.45 ***	0.08	0.35 **	0.47 ***	0.01
Oxygen saturation	0.28 *	-0.24	0.39 **	-0.02	-0.18	-0.41 **	-0.23
N.NH ₄	-0.15	0.21	-0.08	-0.19	0.23	0.16	0.07
DIN	-0.12	0.34 **	-0.40 **	-0.13	0.26 *	0.47 ***	0.00
P.PO ₄	-0.15	0.19	-0.20	0.14	0.36 **	0.10	0.09
DBO ₅	-0.32 *	0.13	-0.07	-0.05	0.40 **	0.16	-0.02
DOC	-0.48 ***	0.10	-0.23	-0.09	0.34 **	0.31 *	0.24
MES	-0.06	-0.05	-0.43 ***	0.01	-0.02	0.53 ***	-0.01
<i>Winter chemistry</i>							
Temperature	-0.65 ***	-0.02	-0.03	-0.05	0.13	0.11	0.14
pH	0.12	0.10	-0.39 **	0.16	-0.11	0.44 ***	-0.19
Conductivity	-0.40 **	0.20	-0.36 **	0.08	0.08	0.46 ***	-0.01
Oxygen saturation	0.29 *	0.13	-0.05	0.19	-0.19	0.00	-0.08
N.NH ₄	-0.39 *	0.13	0.18	-0.27 *	0.27 *	-0.03	0.10
DIN	-0.04	0.34 **	-0.41 **	-0.07	0.19	0.48 ***	-0.11
P.PO ₄	-0.18	0.18	0.05	0.07	0.39 **	-0.07	0.00
DBO ₅	-0.45 ***	0.16	0.19	-0.14	0.15	-0.11	0.02
DOC	-0.67 ***	0.17	-0.16	0.02	0.43 ***	0.17	0.16
Suspended material	-0.46 ***	-0.03	-0.43 ***	0.00	0.14	0.46 ***	0.13
<i>Substrate</i>							
coarsness index	0.55 ***	-0.02	-0.09	0.27 *	-0.09	-0.17	-0.05
suitability index	0.42 ***	0.01	-0.23	0.15	-0.22	0.15	0.05

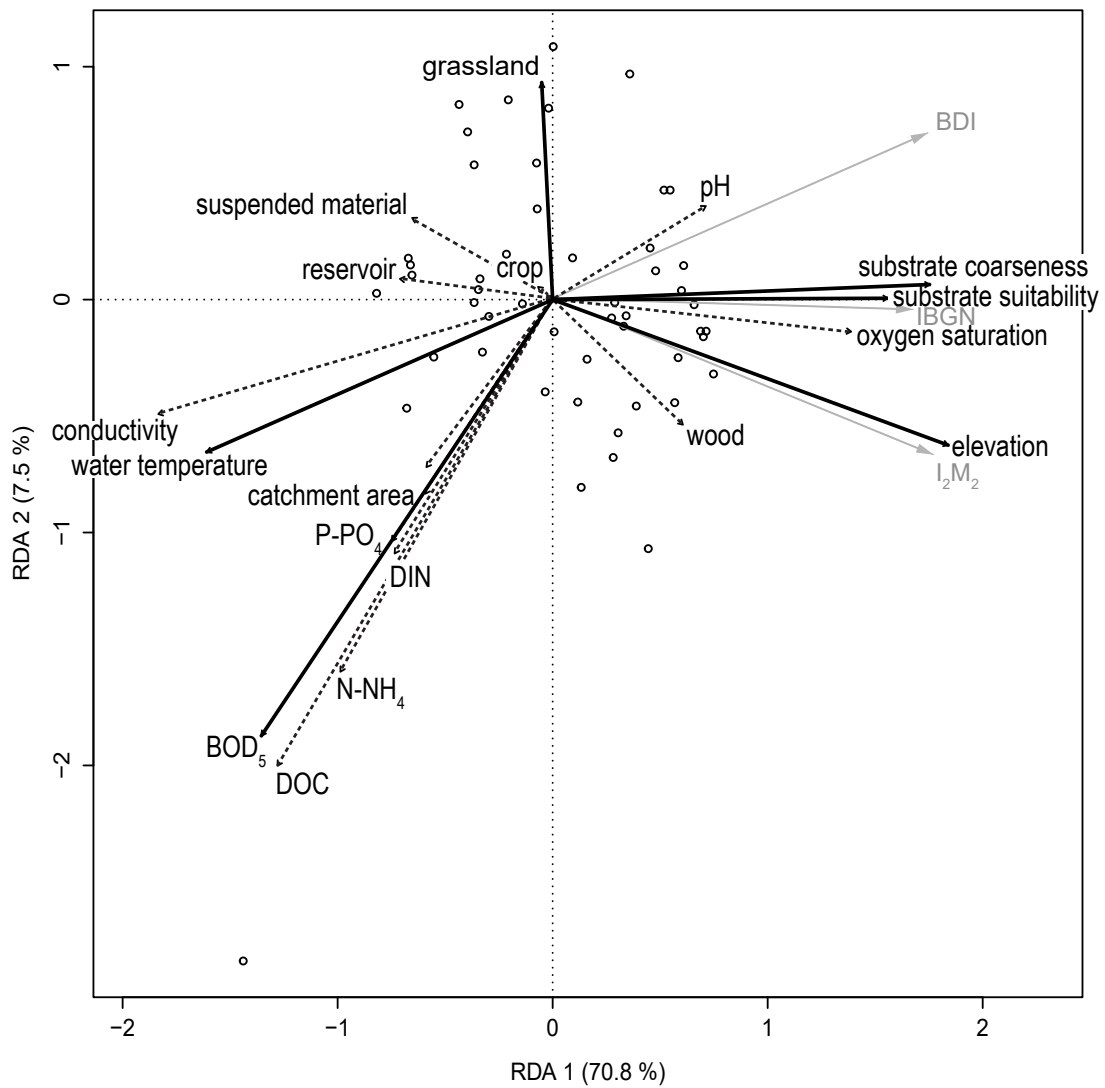


Figure 11 – Redundancy analysis (RDA 1) biplot showing the distribution of structural indicators under the influence of environmental variables. Bold arrows represent statistically significant factors. Black dotted arrows represent non-significant factors.

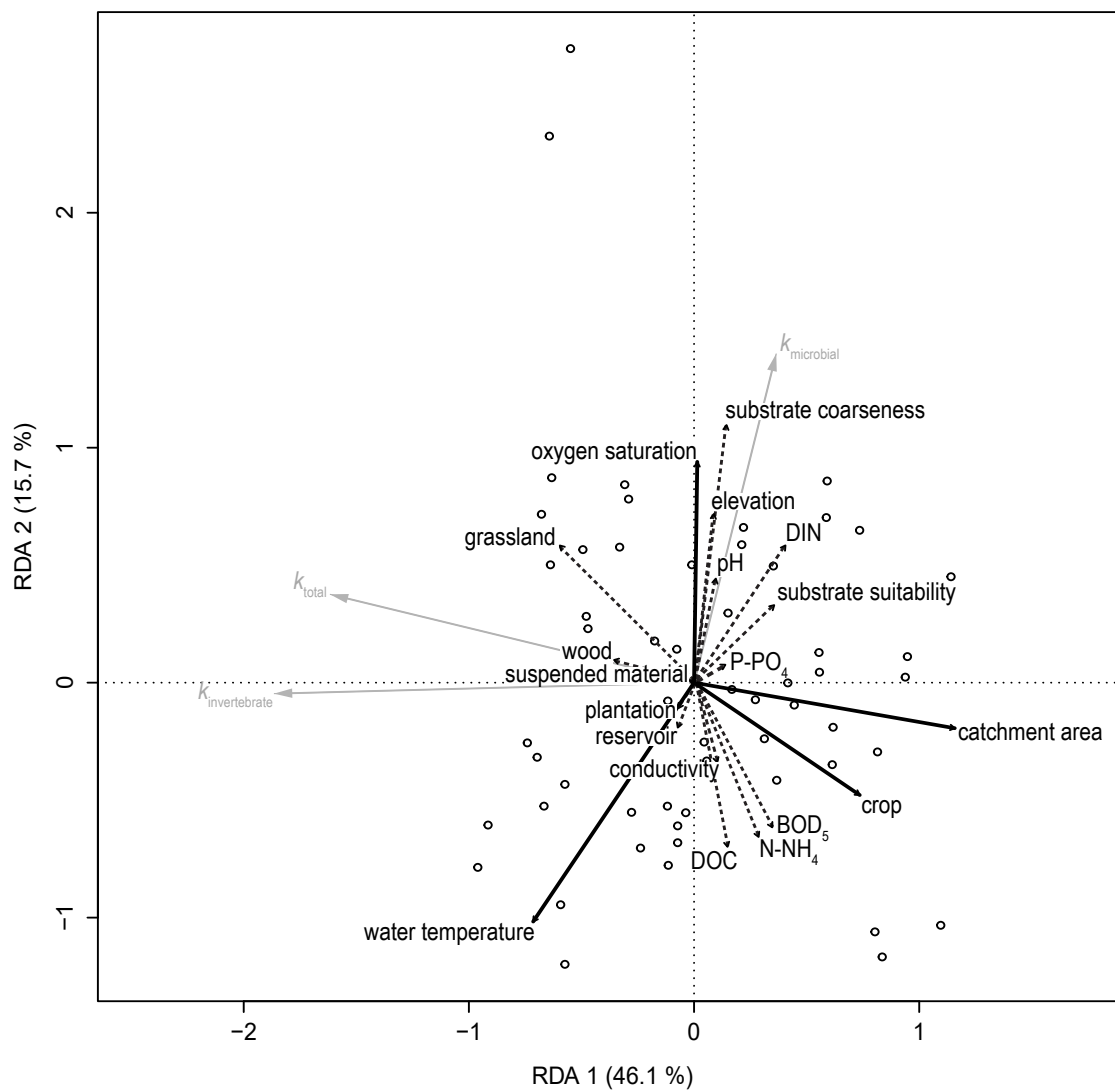


Figure 12 – Redundancy analysis (RDA 2) biplot showing the distribution of decomposition rates under the influence of environmental variables. Bold arrows represent statistically significant factors and black dotted arrows represent non-significant factors.

Discussion

We supposed that the alteration of biological community diversity and activity could, at least to some extent, be simultaneously reflected in structural and functional indicators. However the assumption of a direct assessment of function with structural indicators was not met. The examination of correlations between IBGN and I₂M₂ associated metrics and decomposition rates has shown that the overall decomposition rate (k_{total}) was only correlated to one of the associated metrics, the relative abundance of ovoviviparous taxa, which showed a negative relationship with decomposition. Ovoviviparity is a biological trait characterizing the parental care strategy that prevents high mortality at egg stage in unfavourable environmental conditions (Tachet et al., 2010, Mondy et al., 2012). The environmental conditions favouring occurrence of these ovoviviparous taxa would thus be detrimental to litter decomposition. In contrast, no correspondence between total decomposition rate and the relative abundance of polyvoltin taxa was observed. Polyvoltinism is a reproductive strategy characterised by short reproductive cycles with several generations per year and a strong potential for regeneration, with this functional trait being expected to occur at higher frequency in unstable environmental conditions (Townsend & Hildrew, 1994, Mondy et al., 2012). The absence of correlation between decomposition rate and the sensitive taxa defined by faunal indicator group in IBGN and ASPT in I₂M₂ can be due to the particular feeding habits of these sensitive taxa. As coarse organic particulate matter (CPOM; > 1 mm) characterise shredders, only 14 of the 38 faunal indicator taxa in IBGN corresponded to strict to occasional shredders, which were distributed in all different groups, from relatively sensitive taxa (group 8: Capniidae; group 7: Leuctridae, Beraeidae, Goeridae, Leptophlebiae; group 6: Nemouridae, Lepidostomatidae, Sericostomatidae, Ephemeridae) to tolerant taxa (group 3: Limnephilidae; group 2: Caenidae, Gammaridae, Asellidae). Similarly the ASPT accounted for 23 shredder families (from occasional to strict shredders) out of the 84 in concern and belonging, as the IBGN faunal indicator group, from sensitive to tolerant classes. The absence of correlation with invertebrate diversity metrics – taxa richness and Shannon index – and decomposition rates may signify that the invertebrate structure at the reach scale doesn't have influence on the functional process. When discriminating the two components of litter decomposition, it appeared that invertebrate-driven decomposition rate was not related to any measure associated to structural indicators whereas microbial-driven decomposition rate tends to be higher both at sites with high invertebrate taxa richness and sites with high shredder proportion in invertebrate assemblages as determined in IBGN. One explanation might be a greater abundance of shredders where microbial activity is high as they benefit from fungal contribution to increased leaf palatability by transforming inedible plant material into simple compounds more digestible (e.g. Bärlocher & Kendrick, 1976).

Among decomposition-associated metrics, it appeared that shredder density in litterbags induced an increase in decomposition rates likely due to higher overall performance in decomposing activity. Different studies have reported that density and not taxa richness was

determinant in controlling invertebrate-driven decomposition rates. Dangles and Malmqvist (2004) reported that an uneven community dominated by key taxa like Gammaridae was more efficient in processing litter than more even communities but with lower density of Gammaridae. Shredder density in litterbags was correlated to the shredder abundance calculated from IBGN and I2M2 faunal lists, indicating a potential pathway to assess leaf litter decomposition. Although not being correlated to decomposition rates, both shredder metrics, taxa richness and Shannon Index from litterbags, were correlated either to IBGN, I2M2 and their associated metrics of taxa richness and Shannon Index, and pollutantsensitive indices (ASPT and GFI). This fact highlights the potential consistence between the structure of the shredder community found in litterbags and the community structure found at the reach scale. At the microbial scale, fungal biomass and sporulation rates were increasing along the microbial-driven decomposition rate, while fungal diversity metrics did not, highlighting the importance to consider the functional metrics. Fungal biomass, in contrast to microbial decomposition rate, was correlated to I2M2 and associated metrics, except the ovoviviparity trait. Sporulation rate appeared to be stimulated by unfavourable conditions for invertebrates (e.g., high temperature, low oxygen concentrations) such as expressed by an increase in ovoviviparity in the invertebrate community. This is surprising since such conditions, particularly low oxygenation, are generally known to be detrimental to conidial production by leaf-associated aquatic hyphomycetes (Bärlocher, 2009). However, an explanation may lie in the uneven and poorly diversified fungal assemblages that occurred in these unfavourable conditions, whose sporulation activity may have benefit from a lower interspecific competition, and possibly lower grazing pressure by invertebrates.

Structural indicators were strongly correlated to abiotic attributes including elevation, substratum coarseness and organic pollution. Upper stream sites were characterised by a dominance of boulders and pebbles, high oxygenation and low water temperature compared to lowland streams where coarseness of substratum (i.e. sand, silt and clay) was naturally low. A regional study in Adour-Garonne has reported the regional repartition of aquatic insect (Plecoptera, Ephemeroptera, Trichoptera and Coleoptera) assemblages in river catchments to be strongly related to the altitudinal distribution of these taxa (Céréghino et al., 2001). Compin & Céréghino (2003) reported a lower discrimination of anthropogenic pressures at higher elevation due to higher richness in invertebrates and sensitive taxa. The second attribute detected by IBGN and I2M2 was organic pollution, as expressed in BOD₅, which was negatively associated to the elevation gradient. Another regional study on 594 Danish stream sites reported that both BOD₅ and substratum coarseness were dominant drivers of invertebrate occurrence (Friberg et al., 2010). Like in our study, substratum coarseness and BOD₅ were negatively correlated and associated to high water velocity, with the substratum coarseness increasing reaeration and consequently oxygen saturation, thus reducing the impact of BOD₅ within the stream. The diatom indicator, BDI, appeared sensitive to the same environmental attributes. Tison et al. (2005) reported the occurrence of distinct diatom assemblages according to the geological context and altitudinal range, while a number of other studies have documented the sensitivity of diatoms to organic pollution (e.g., Van Dam et al., 1994; Rimet et al., 2005; Dere et al., 2006; Blanco & Becares, 2007; Feio et al., 2009).

Total leaf litter decomposition and invertebrate-driven decomposition, both being strongly correlated, were affected by the proportions of land uses in the riparian corridor, from wood and grassland to agriculture coupled with an increase in catchment size. Agricultural land use in riparian areas is an illustration of the co-occurrence of multiple stressors affecting litter decomposition process, either through stimulation e.g. due to enrichment in nutrients (Ferreira et al., 2015) or higher temperature (Irons et al., 1994), or inhibition e.g. caused by sediment deposition (Larsen & Ormerod, 2010) or lower oxygen concentration, even though such an effect remains questionable (Webster & Benfield, 1986). The interaction of these factors leads in our stream sites to a decrease in leaf litter decomposition process. Unlike invertebrate-driven decomposition, fast microbial-driven decomposition occurred in our stream sites with high oxygen concentration and low water temperature. Both environmental parameters were associated to sites characterized by higher elevation and coarse substrata. It is noticeable that the responses to oxygen concentration and temperature levels are opposite in microbial decomposition and one of its related measures, i.e. leaf-associated sporulation rate (see above). A possible explanation is that both processes involve metabolic pathways that are differently affected by these factors. As a consequence, the microbial decomposition rate and sporulation rate are not redundant, implying that these metrics may be used in a complementary way in stream ecosystem assessment. Finally, it may appear counterintuitive that microbial breakdown rate is favoured by low temperatures, (Boyero et al., 2011; Taylor & Chauvet, 2014) have already reported that this phenomenon, like observed in the present study, was only related to the expression of decomposition rates in heat-time unit. When expressed per time unit, temperature effect was no more detectable, meaning that fungi are very active at low temperatures as exemplified by very high Q_{10} in the temperature range of 1-11°C (Dang et al., 2009).

Although we denote a correlation among structural indices, the present work emphasizes the absence of congruence on stream ecosystem status in terms of quality status depending on the indicator in use. In this sense the ecological status heavily depends on the indicator being used. Although this point is not new, this result highlights the difficulty to assess ecological status. Considering leaf litter decomposition as a key ecosystem process, indicating that biological quality elements may only partially contribute to ecosystem integrity assessment. The use of shredders biological traits extracted from invertebrate-based structural indicators was hypothesized to better detect their potential activity in litter decomposition, thus providing a functional dimension to structural approaches. However it did not allow predicting the orientation of litter decomposition rate, which further supports the urgent need to carry out a direct evaluation of ecosystem functions based on appropriate metrics.

Chapitre 4 : Evaluation de la qualité des eaux du bassin Adour-Garonne : vers l'utilisation de la décomposition des litières comme marqueur de l'intégrité de l'écosystème

Résumé du chapitre

Il y a 30 ans, Webster & Benfield (1986) ont soumis l'idée d'utiliser le processus de décomposition des litière comme un indicateur de l'intégrité des écosystèmes aquatiques lotiques. Or l'évaluation biologique s'est poursuivie et généralisée en Europe au cours des dernières décennies avec plusieurs milliers de rivières évaluées en routine dans la plupart des pays, sans que les aspects fonctionnels ne soient pris en compte, tandis qu'en parallèle les recherches fondamentales participant à une meilleure connaissance du processus ont connu un grand essor. Il y a 15 ans, Gessner et Chauvet (2002) ont proposé une première grille d'évaluation de l'état fonctionnel comprenant 3 classes de qualité à partir des seuils du taux de décomposition absolu (k_{total}), du rapport de ce taux entre site de référence et site impacté et du rapport des taux de décomposition dans les sacs à grosses mailles et à fines mailles ($k_{\text{total}}/k_{\text{microbien}}$) et ont stimulé un grand nombre de recherches. Suivirent de nombreux travaux de recherche appliquée utilisant le processus de décomposition comme indicateur de l'intégrité fonctionnelle, sur des sites sélectionnés en fonction du type et du degré de perturbation à caractériser. Toutefois, un écart considérable subsiste entre l'évaluation du processus de décomposition telle que décrite dans quelques études pionnières et son application en routine dans les réseaux de surveillance, qui se composent d'un ensemble de sites représentatifs de la variété des pressions affectant les masses d'eau. Les objectifs de ce chapitre sont de combler en partie cet écart, (1) en quantifiant le processus de décomposition à partir d'un protocole standardisé sur 84 sites des réseaux de surveillance du SO de la France, (2) en identifiant l'influence des hydroécorégions sur la variabilité des paramètres de la décomposition dans des sites définis comme étant en bon état écologique, notamment en se référant aux données de la littérature et (3) en proposant et en discutant certaines métriques utilisées pour une évaluation de l'intégrité fonctionnelle des cours d'eau, ainsi que leur application à une échelle régionale.

Nos sites d'étude ont été sélectionnés au sein d'un large panel de rivières du SO de la France appartenant au réseau de surveillance de l'Agence de l'Eau Adour-Garonne. Ces 84 rivières, d'ordre 2 à 4, étaient représentatives d'un état écologique allant de « très bon » à « mauvais » caractérisé à la fois par la qualité chimique de l'eau et par les indicateurs structuraux (lorsqu'ils existaient). Les taux de décomposition et des métriques associées ont été déterminés à partir de 6 répliques (blocs) par site, chacune composée d'un sac à fines mailles (FM, vide de maille de 0,5 mm) et d'un sac à grosses mailles (GM, 9 mm) contenant $4,0 \pm 0,04$ g de feuilles sénescents d'aulne récoltées après abscission. Chaque réplique a été placée en zone de courant et retirée après 21 jours d'exposition. La biomasse fongique associée aux litières, ainsi que le taux de sporulation et la richesse taxonomique caractérisés à partir des conidies produites après une brève incubation au laboratoire ont été mesurés à partir de la litière restante dans les sacs à fines mailles. La densité des détritivores et des indices de diversité (richesse taxonomique, indice de Shannon et indice d'équitabilité de Piélou) ont été déterminés à partir de la macrofaune ($> 0,5$ mm) retrouvée dans les sacs à grosses mailles. Les sites de référence issus de la littérature étaient localisés dans les Coteaux aquitains ($n=5$; Lecerf et al., 2006) et la Montagne Noire ($n=5$; Hladysz et al., 2011).

Après 21 jours d'exposition, le pourcentage de litière restante était compris entre 1 et 76 % dans les sacs GM et entre 44 et 87 % dans les sacs FM. Les taux de décomposition variaient entre 0,0129 et 0,2134 j^{-1} pour k_{total} , entre 0,0062 et 0,0404 j^{-1} pour $k_{\text{microbien}}$, et entre 0,0009 et 0,0865 j^{-1} pour $k_{\text{invertébré}}$. Les ratios $k_{\text{total}}/k_{\text{microbien}}$ étaient compris entre 0,94 et 25,50 et les ratios $k_{\text{invertébré}}/k_{\text{microbien}}$ entre 0,05 et 11,80. Sur l'ensemble des sites, k_{total} et $k_{\text{invertébré}}$ étaient positivement corrélés à l'abondance des détritivores, $k_{\text{microbien}}$ à la biomasse fongique et au taux de sporulation, et les ratios $k_{\text{total}}/k_{\text{microbien}}$ et $k_{\text{invertébré}}/k_{\text{microbien}}$ à l'abondance des décomposeurs invertébrés, ces deux ratios étant cependant corrélés négativement au taux de sporulation. Les valeurs de référence (cf. Montagne Noire) pour k_{total} et le ratio $k_{\text{total}}/k_{\text{microbien}}$ étaient entre 1,9 et 5 fois plus élevés que les valeurs proposées par Gessner et Chauvet (2002) ; cette différence résultait probablement des températures plus basses et des conditions plus oligotrophes régnant dans les sites utilisés par Gessner et Chauvet (2002), avec notamment la dominance d'une activité des microorganismes sur celle des détritivores dans le processus de décomposition. Le long des gradients régionaux de concentrations en phosphore (qui s'est avéré limitant) et azote inorganiques dissous (non limitant), les valeurs maximales de k_{total} augmentent à la fois dans nos 84 sites d'étude et dans les sites dont les données sont issues de la littérature, suggérant l'existence d'une co-limitation dans l'utilisation des nutriments de l'un par l'autre. L'effet inhibiteur de l'ammonium était essentiellement manifeste sur l'activité des décomposeurs invertébrés et devenait particulièrement prononcé au-delà de $100 \mu\text{g N-NH}_4\text{.L}^{-1}$. Les taux de décomposition dans les sites suivis pour une contamination potentielle par les pesticides (cf. Chapitre 1) étaient entre 9 et 25 fois plus faibles que la moyenne observée sur l'ensemble des sites, malgré l'existence d'une grande amplitude des concentrations en nutriment entre ces sites, suggérant que l'influence potentiellement positive des nutriment était contrecarrée par un effet inhibiteur très marqué des pesticides. Au niveau régional, des relations étroites entre les communautés de décomposeurs, les taux de décomposition et les paramètres

environnementaux ont été mises en évidence. Les tendances similaires observées dans deux régions distinctes (Irlande et SO de la France) illustrent les potentialités d'une prise en compte de certains taxons dans l'évaluation des taux de décomposition. Nous proposons une grille d'évaluation de la qualité fonctionnelle des écosystèmes croisant deux données essentielles présentées de façon graphique selon deux axes orthogonaux : (1) k_{total} , en ordonnée, et (2) le ratio $k_{\text{invertébré}}/k_{\text{microbien}}$, en abscisse, qui exprime la contribution relative des invertébrés et des microorganismes au processus. Cette grille d'évaluation a mis en évidence que le processus de décomposition est globalement perturbé à l'échelle régionale avec seulement 25 % des sites atteignent un bon état fonctionnel, soit environ deux fois moins qu'en utilisant les indicateurs biologiques.

Introduction

Il a été mis en évidence depuis une trentaine d'années que la décomposition des litières pouvait être un outil de détection des impacts anthropiques (Webster & Benfield, 1986; Gessner & Chauvet, 2002; Sandin & Solimini, 2009). Gessner et Chauvet (2002) ont proposé une première grille d'évaluation de l'état fonctionnel basée sur le processus de décomposition. A partir des données de la littérature, ils ont défini des seuils (i) pour des taux de décomposition absolus (en se basant sur des sites impactés et de référence), et (ii) pour des indicateurs relatifs, tels que le ratio des taux entre site potentiellement impacté et site de référence ou le ratio entre les taux de décomposition totale et microbienne. Comme l'atteste une littérature abondante, le processus de décomposition s'avère sensible à différentes perturbations telles que les modifications de la ripisylve (Lecerf et al., 2005; Hladyz et al., 2011; Ferreira et al., 2016b) et l'apport de nutriments (Ferreira et al., 2015) ou de molécules toxiques (Peters et al., 2013; Ferreira et al., 2016a). Selon le type de perturbation, la réponse de la décomposition des litières n'est pas la même : fonction linéaire positive avec la température, fonction gaussienne avec le degré de trophie (Woodward et al., 2012), fonction asymptotique avec les nutriments à des concentrations faibles à modérées (Ferreira et al., 2006b), fonction logarithmique en présence de pesticides (Brosed et al., 2016). Si les effets sur ce processus sont bien discernables, une réponse positive ou négative et d'ampleur variable est donc attendue. Il devient alors essentiel d'examiner la forme que prennent ces réponses, notamment à une large échelle telle que l'échelle régionale où s'exprime une grande variété de perturbations, parfois cumulées, sur un même site.

Depuis plusieurs années, l'Union Européenne encourage les approches intégrées pour évaluer l'état fonctionnel des masses d'eau. Le développement d'un indicateur basé sur la décomposition des litières semble particulièrement pertinent pour les très petites à petites masses d'eaux dans lesquelles les apports allochtones sont potentiellement majoritaires. Les petites masses d'eaux représentent une part importante des réseaux hydrographiques et sont en général proportionnellement moins suivies car leur étude demanderait une logistique

conséquence. Pourtant les petites masses d'eaux ne sont pas à l'abri de perturbations multiples en lien avec l'aménagement territorial et les pratiques agricoles et forestières, industrielles et domestiques. Par ailleurs, une distinction des caractéristiques abiotiques de ces masses d'eau est nécessaire, dans la mesure où celles-ci interviennent à la fois dans la structure des communautés aquatique et le contrôle des processus écosystémiques. Ainsi, le découpage des masses d'eau en hydroécorégions européennes a été réalisé sur la base des déterminants primaires du fonctionnement écologique des eaux courantes incluant la géologie, le relief et le climat (Wasson et al., 2002, 2006). En termes fonctionnels, les études mettant en évidence une influence des hydroécorégions sur le processus de décomposition restent rares (Hladyz et al., 2010; Pozo et al., 2011). On peut supposer un effet indirect via la communauté des invertébrés dont les caractéristiques structurales (composition taxonomique, richesse spécifique, polluo-sensibilité) dépendent des hydroécorégions (Wasson et al., 2002, 2004, 2006) et dont les traits fonctionnels varient selon les taxons (p. ex. : performance dans la consommation de litière) se répercutent sur la décomposition.

L'évaluation de l'intégrité fonctionnelle dans les réseaux de suivi mis en place depuis l'application de la Directive Cadre Européenne sur l'Eau, est néanmoins un défi, puisque qu'à ce jour, il n'y a pas eu d'évaluation poussée appliquée à l'ensemble d'un territoire. De plus, le critère de sélection des sites de surveillance complique l'application d'indicateurs fonctionnels, puisque les sites sélectionnés doivent intégrer l'ensemble des pressions sur le territoire, correspondant potentiellement à des perturbations multiples telles qu'une pollution chimique associée à une dégradation morphologique et au passage d'un milieu fermé à ouvert avec la coupe de la ripisylve, alors que la connaissance de la réponse des indicateurs fonctionnels à des perturbations cumulées reste extrêmement limitée. Enfin le dernier défi est la comparaison des sites à des situations de référence respectant les critères de représentativité de la masse d'eau, difficiles à identifier voire inexistantes dans un paysage fortement modifié par l'homme.

Le présent chapitre est ainsi une première proposition pour la prise en compte du processus de décomposition dans les réseaux de surveillance. Pour ce faire nous avons choisi un protocole simplifié par rapport à ce qui est parfois réalisé, à savoir une seule date de récolte choisie en fonction de la vitesse de décomposition des feuilles (c.à.d. environ 50% de masse restante en moyenne). Par rapport à un suivi de la perte de masse foliaire au cours du temps, l'option d'une date unique minimise le nombre de sacs à litière à déployer, collecter et analyser tout en permettant d'acquérir une information représentative et relativement fiable sur la dynamique de la décomposition (Chauvet et al., 2016). A la différence de l'étude précitée et du protocole défini dans le cadre du projet européen *RivFunction*, les feuilles d'aulne sont ici la seule litière sélectionnée, car relativement appréciée des décomposeurs invertébrés et microbiens, du fait de son contenu important en nutriment, et en raison de sa présence très commune en bordure de nombreux cours d'eau européens. Nous nous sommes appuyés sur les indicateurs et seuils proposés par Gessner et Chauvet (2002), ainsi que sur d'autres paramètres, pour évaluer la qualité fonctionnelle des cours d'eau des bassins de l'Adour et de la Garonne. Ainsi, les métriques rentrant dans le diagnostic sont les

taux de décomposition et leur ratio, ainsi que les métriques fonctionnelles fines dérivées de l'activité des décomposeurs (taux de sporulation et biomasse fongique, densité des invertébrés). Le premier objectif était d'examiner les patrons du processus de décomposition en appliquant un protocole standard à une échelle régionale dans les sites suivis par l'Agence de l'Eau Adour-Garonne. Le second objectif était d'identifier une possible influence des hydroécorégions dans la réponse du taux de décomposition et des métriques associées. Afin de disposer d'un nombre suffisant de sites de référence représentatifs, nous avons comparé certaines données régionales issues de la littérature aux sites définis comme en bon état écologique par l'Agence de l'Eau Adour-Garonne (AEAG). Enfin nous avons proposé des métriques et discuté de leur application dans le cadre d'une évaluation régionale de l'intégrité fonctionnelle des cours d'eau.

Matériel et Méthodes

Sélection des sites d'étude

Les 84 sites d'études font partie des différents réseaux de suivi de l'AEAG (Fig. 13) et concernent les sites des chapitres 1 et 2, ainsi que 26 autres sites supplémentaires dont l'état écologique a été évalué seulement par l'un des indices biologiques présentés dans le chapitre 2. Ces cours d'eau font partie des très petites et petites masses d'eau (ordre de Strahler de 2 à 4). La sélection s'est faite en choisissant un panel de sites ayant un état écologique allant de « très bon » à « mauvais », représentatifs des 5 classes de qualité des eaux définies par les Agences de l'Eau au plan national. Cet état écologique était caractérisé à la fois par la chimie de l'eau et par les indicateurs structuraux (lorsqu'ils existaient). Les sites se répartissent sur l'ensemble du bassin Adour-Garonne dans les différentes hydroécorégions présentes : les Coteaux aquitains (n=55), le Massif Central sud (n=10), les Landes (n=7), les Causses aquitains (n=3), les Cévennes (n=2), les Pyrénées (n=2) et les Tables calcaires (n=1).

Les sites issus de la littérature sont localisés dans les Coteaux aquitains (n=5 ; Lecerf *et al.*, 2006 ; Woodward *et al.*, 2012) et la Montagne Noire (n=5 ; Hladyz *et al.*, 2010, 2011). Les sites des Coteaux aquitains se trouvent dans un paysage où s'entremêlent pratiques agricoles intensives et tissus urbains caractéristiques de cette hydroécorégion et où la présence d'un substrat géologique limono-argileux s'avère favorable à l'agriculture. Toutefois la ripisylve forme un cordon rivulaire dense dont la canopée est fermée au-dessus de chaque site (Lecerf *et al.*, 2006). Cette forte anthropisation empêche de considérer ces sites comme des sites de référence, mais correspond à la situation de moindre impact que l'on peut rencontrer sur ce territoire. Les sites de la Montagne Noire sont localisés dans une forêt mixte (Laitung *et al.*, 2002). Sur ce territoire, la seule pression anthropique notable est la gestion forestière en hêtraie pure (Laitung & Chauvet, 2005; Lecerf *et al.*, 2005), mais qui ne

concerne pas la ripisylve des 5 rivières étudiées. Le substrat géologique granitique abrite des eaux courantes peu tamponnées et au pH relativement faible (pH ~ 6,5). La préhension agricole dans cette hydroécorégion est faible, se limitant principalement aux activités d'élevage extensif (pâtures et prairies fauchées) et à la sylviculture. Ces sites présentent un bon potentiel pour constituer des sites de référence, que nous utiliseront comme tels dans le présent chapitre.

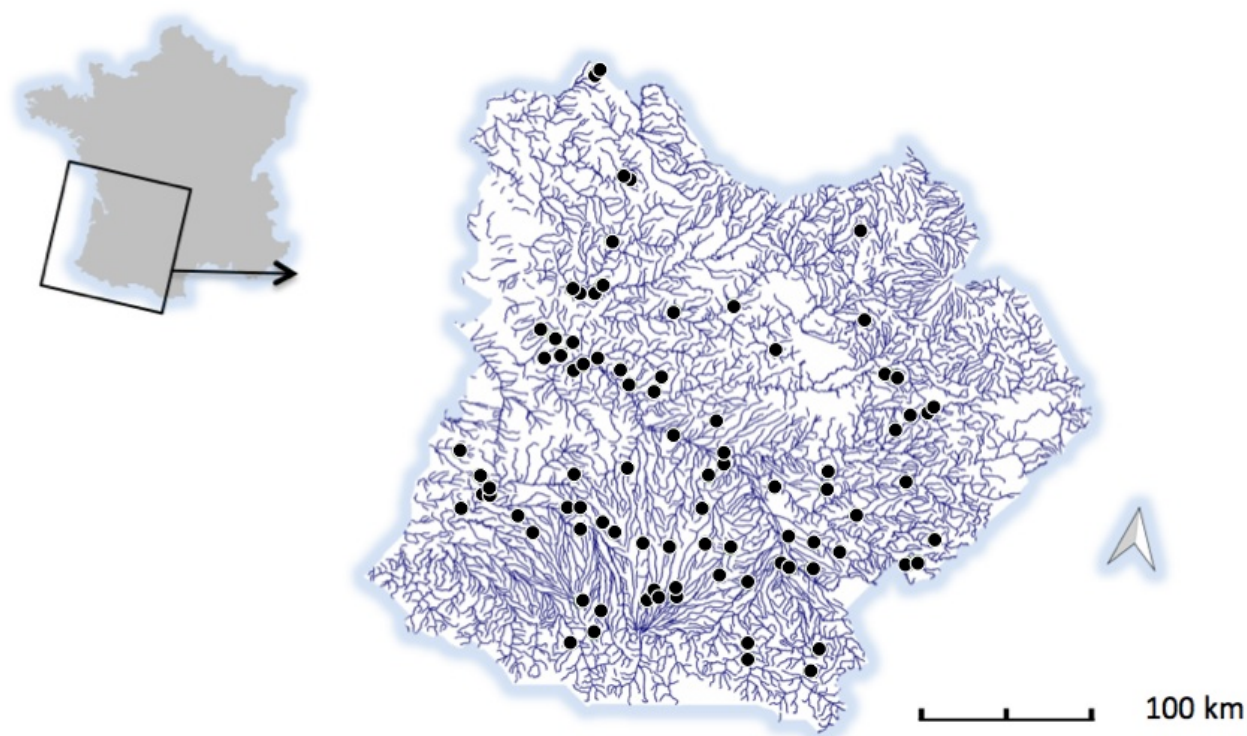


Figure 13 – Localisation des 84 sites d'étude du bassin Adour-Garonne

Paramètres physico-chimiques

Les paramètres physicochimiques sont issus de la base de donnée de l'Agence de l'Eau Adour Garonne. Les données correspondent à la période d'exposition des litières (février-mars 2013 ou 2014). Nous avons moyenné ces paramètres entre les mois de février et mars, ou janvier et mars lorsque les données du mois de février n'étaient pas disponibles, ou utilisé les valeurs du mois de mars dans les rares cas où il s'agissait des seules données existantes (Tab. 9).

Un indice d'intégrité de la ripisylve (I_R) a été calculé à partir de la proportion de 6 types différents d'occupation des sols (ripisylve arborée, plantation de feuillus, prairie, surface cultivée, surface artificialisée et réservoirs) dans un cordon rivulaire de 1500 m de long et de 25 m de large de part et d'autre des berges en amont de chacun des sites en s'inspirant des

travaux de Rasmussen et al. (2011). La caractérisation de l'occupation des sols a été réalisée à partir d'orthophotos prises en 2010 et 2013 (BD ORTHO® 2,5 m de l'Institut National d'Information Géographique et Forestière). Un score (S_i) a été attribué à chacun des types d'occupation des sols : « +2 » pour la ripisylve arborée, « +1 » pour de la prairie, « 0 » pour les plantations et « -2 » pour des champs cultivés, les surfaces artificialisées et la présence de réservoirs. L'indice d'intégrité de la ripisylve a été calculé en faisant la somme des proportions de chaque type d'occupation des sols (p_i) multiplié par le score (S_i) correspondant :

$$IR_i = \sum_{i=0}^{11} S \times p_i$$

Tableau 9 – Moyenne ($\pm$ erreur standard, minimum-maximum entre parenthèses) des paramètres physicochimiques des sites et de qualité des eaux des 82 sites d'étude répartis dans les différentes hydroécorégions, ainsi que des sites de référence issus de la littérature (* Hladyz et al., 2011 et Lecerf et al., 2005 ; ** Lecerf et al., 2006).

Paramètres physicochimiques	Causses aquitains	Landes	Massif Central Sud	Coteaux aquitains	Massif Central Sud*	Coteaux aquitains**
Surface de bassin versant (km ²)	85,1 $\pm$ 34,8 (38,5 — 153,2)	76,5 $\pm$ 17,3 (12,8 — 129,4)	18,8 $\pm$ 3,9 (3,8 — 44,4)	43 $\pm$ 7,2 (1,9 — 254,9)	ND (0,4 — 2,3)	13,6 $\pm$ 2,7 (10,2 — 17,1)
Distance à la source (km)	19,0 $\pm$ 2,9 (13,1 — 22,6)	16,4 $\pm$ 37,3 (4,8 — 30,2)	8,1 $\pm$ 1,1 (4,9 — 14,0)	13,1 $\pm$ 1,6 (1,7 — 66,0)	ND (< 1 km)	4,7 $\pm$ 1,2 (3,1 — 5,7)
Altitude (m)	82 $\pm$ 37 (31 — 154)	36,1 $\pm$ 7,4 (15 — 59)	494,4 $\pm$ 56,1 (209 — 828)	141,4 $\pm$ 15,3 (5 — 444)	ND (500 — 800)	237 $\pm$ 46,0 (170 — 290)
Température de l'eau (°C)	8,9 $\pm$ 1,5 (6,7 — 11,7)	10,2 $\pm$ 0,4 (8,6 — 11,5)	6,9 $\pm$ 0,3 (5,2 — 7,9)	8,2 $\pm$ 0,2 (4,2 — 11,4)	7,7 $\pm$ 0,5 (7,1 — 8,4)	7,3 $\pm$ 0,9 (6,6 — 8,7)
pH	8,0 $\pm$ 0,1 (8 — 8,2)	6,8 $\pm$ 0,2 (8 — 8,2)	7,8 $\pm$ 0,2 (6,8 — 8,3)	8,0 $\pm$ 0 (7 — 8,5)	6,4 $\pm$ 0,1 (6,3 — 6,5)	8,2 $\pm$ 0,1 (8,0 — 8,3)
Conductivité (μ S.cm ⁻¹)	649 $\pm$ 103 (544 — 855)	192 $\pm$ 53 (96 — 495)	287 $\pm$ 86 (34 — 666)	534 $\pm$ 32 (31 — 1098)	43 $\pm$ 10 (33 — 62)	538 $\pm$ 135 (348 — 677)
[Nitrate] (mg N-NO ₃ .L ⁻¹)	7,90 $\pm$ 3,51 (3,98 — 14,90)	2,13 $\pm$ 0,43 (0,53 — 3,26)	6,49 $\pm$ 1,44 (1,01 — 14,53)	8,57 $\pm$ 0,704 (0,53 — 26,03)	1,38 $\pm$ 0,36 (1,06 — 1,80)	4,12 $\pm$ 1,77 (1,61 — 5,74)
[Ammonium] (μ g N-NH ₄ .L ⁻¹)	51 $\pm$ 27 (8 — 101)	246 $\pm$ 82 (19 — 669)	35 $\pm$ 7 (8 — 79)	42 $\pm$ 5 (8 — 218)	13 $\pm$ 3 (9 — 17)	14 $\pm$ 2 (13 — 16)
[Nitrite] (μ g N-NO ₂ .L ⁻¹)	12 $\pm$ 7 (3 — 24)	112 $\pm$ 103 (3 — 730)	8 $\pm$ 1 (2 — 16)	15 $\pm$ 1 (3 — 38)	1 $\pm$ 0 (0 — 1)	4 $\pm$ 1 (3 — 6)
[Phosphates] (μ g P-PO ₄ .L ⁻¹)	154,5 $\pm$ 146,3 (6,5 — 447,1)	41,4 $\pm$ 29,7 (4,9 — 218,5)	21,5 $\pm$ 4,3 (4,9 — 37,5)	21,1 $\pm$ 2,5 (3,3 — 97,9)	2,5 $\pm$ 0,5 (1,9 — 3,1)	10,6 $\pm$ 2,9 (5,9 — 13,7)
DBO ₅ (mg O ₂ .L ⁻¹)	1,3 $\pm$ 0,1 (1 — 1,5)	3,6 $\pm$ 0,8 (1,5 — 8)	1,4 $\pm$ 0,2 (0,8 — 2,7)	1,6 $\pm$ 0,1 (0,5 — 4,8)	ND	ND
[COD] (mg C.L ⁻¹)	3,6 $\pm$ 0,7 (2,6 — 5)	9,9 $\pm$ 3,5 (2,5 — 28,5)	2,8 $\pm$ 0,5 (1,3 — 6,7)	3,9 $\pm$ 0,2 (0,5 — 10,4)	ND	ND
Matières en suspension (mg L ⁻¹)	7,6 $\pm$ 2,8 (2,1 — 11)	9,1 $\pm$ 2,8 (4,3 — 25,5)	13,6 $\pm$ 3,4 (2 — 39,5)	20,3 $\pm$ 2,6 (2 — 87)	ND	ND
Saturation en oxygène (%)	100,2 $\pm$ 1 (98,9 — 102,2)	88,9 $\pm$ 1,9 (82,1 — 96,5)	101,1 $\pm$ 1,2 (95 — 109)	98,2 $\pm$ 1,1 (77,1 — 114,7)	ND	ND
Intégrité de la ripisylve	0,3 $\pm$ 3,4 (-4 — 7)	2,4 $\pm$ 1,3 (-3 — 7)	3,7 $\pm$ 0,9 (0 — 8)	3 $\pm$ 0,5 (-4 — 10)	ND	ND

Taux de décomposition et décomposeurs microbiens et invertébrés associés

Se reporter au chapitre 1, aux sections du Matériel et méthodes « Leaf litter breakdown » et « Leaf-associated microorganisms and macroinvertebrates ».

Analyses des données

Le calcul du taux de décomposition (k) pour chaque sac à litière est dérivé du modèle exponentiel selon la transformation logarithmique suivante :

$$k = -\ln\left(\frac{m_f}{m_i}\right) \cdot t^{-1}$$

où m_i est la masse de matière organique initiale, m_f la masse de matière organique finale et t la durée d'exposition exprimée en degré-jours. Les taux de décomposition totaux (k_{total}) et microbien ($k_{\text{microbien}}$) ont respectivement été calculés à partir des sacs à larges et fines mailles. Le taux de décomposition réalisé par les invertébrés ($k_{\text{invertébré}}$) a été calculé à partir de la différence de la masse de matière organique dans les sacs à larges et fines mailles de chaque unité expérimentale (bloc constitué d'un sac de chaque type). Six répliques d'unité expérimentale, distantes longitudinalement de quelques mètres, ont été déployées sur chacun des sites. Les ratios $k_{\text{total}}/k_{\text{microbien}}$ et $k_{\text{invertébré}}/k_{\text{microbien}}$ ont été calculés à partir de la moyenne par site des taux k_{total} , $k_{\text{microbien}}$ et $k_{\text{invertébré}}$ pour évaluer les changements dans la contribution des décomposeurs invertébrés et microbiens dans le processus de décomposition.

Une analyse de variance a permis de comparer les taux de décomposition obtenus dans les différentes hydro-écorégions, les sites issus de la bibliographie ainsi que les sites de référence des deux hydro-écorégions (Massif Central Sud et Coteaux aquitains). A partir de la moyenne des métriques ($\bar{x}$) déterminée dans les sites de référence, les limites inférieures et supérieures de 5 classes de qualité fonctionnelle ont pu être définies (Tab. 10).

Pour interpréter la relation entre les facteurs environnementaux, les taux de décomposition et les communautés de décomposeurs, cinq analyses canoniques de redondances (« redundancy analysis » ou RDA en anglais) ont été réalisées. La première a porté sur les taux de décomposition et les variables environnementales, les deux suivantes sur la distribution des taxons d'hyphomycètes aquatiques et d'invertébrés benthiques en fonction des variables environnementales et les deux dernières sur la distribution des taux de décomposition et ratios en fonction des taxons d'hyphomycètes aquatiques et d'invertébrés benthiques. La RDA consiste en une régression multiple entre les variables explicatives et les variables réponses à partir de données centrées réduites et dont la normalité a été préalablement vérifiée (Legendre et Legendre, 1998, p 580 et suivantes). La normalité des données a été testée avec le test de Kolmogorov-Smirnoff et certaines ont été log-

transformées pour satisfaire les hypothèses de normalité et d'homoscédasticité des résidus. La significativité des modèles a été évaluée à partir d'un test de permutation de type ANOVA (test de permutation de Monte Carlo, $p < 0,05$, 10000 permutations). Le coefficient de corrélation de Spearman a été utilisé pour identifier l'effet confondant potentiel des variables environnementales considérées (concentrations en nitrates, nitrites, ammonium et phosphates, pH, alcalinité, conductivité et température de l'eau). Les analyses ont été effectuées avec la version du logiciel statistique R 3.1.3 et la librairie vegan pour les analyses de redondance (Oksanen et al., 2015). Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$.

Résultats

Taux de décomposition sur les 84 sites d'étude

La masse de litière restante dans les sacs à grosses mailles après 3 semaines est en moyenne de 39 ± 2 % (SE) avec une gamme de valeurs comprises entre 1 et 76 %. Les taux de décomposition correspondants (k_{total}) sont compris entre 0,0129 et 0,2134 j^{-1} avec une moyenne de $0,0663 \pm 0,0060$ j^{-1} et, exprimés en degré-jour, sont compris entre 0,0015 et 0,0287 $^{\circ}\text{j}^{-1}$ avec une moyenne pour les 84 sites de $0,0078 \pm 0,0007$ $^{\circ}\text{j}^{-1}$. Dans les sacs à fines mailles, la masse de litière restante est comprise entre 44 et 87 % avec une moyenne de 67 ± 1 %. Les taux de décomposition microbienne, $k_{\text{microbien}}$, sont compris entre 0,0062 et 0,0404 j^{-1} , avec une moyenne de $0,0193 \pm 0,0058$ j^{-1} . Exprimés en degré-jour, $k_{\text{microbien}}$ est compris entre 0,0007 et 0,0055 $^{\circ}\text{j}^{-1}$, avec une moyenne de $0,0024 \pm 0,0008$ $^{\circ}\text{j}^{-1}$. Les taux de décomposition par les invertébrés, déduits de la masse restante dans les sacs à grosses maille et fines mailles, sont compris entre 0,0009 et 0,0865 j^{-1} pour une moyenne de $0,0189 \pm 0,0019$ jour^{-1} . Exprimés en degré-jour, $k_{\text{invertébré}}$ est compris entre 0,0001 et 0,0088 $^{\circ}\text{j}^{-1}$, avec une moyenne de $0,0022 \pm 0,0002$ $^{\circ}\text{j}^{-1}$. Les ratios $k_{\text{total}}/k_{\text{microbien}}$ sont compris entre 0,94 et 25,50 et les ratios $k_{\text{invertébré}}/k_{\text{microbien}}$ entre 0,05 et 11,80.

La comparaison des taux absolus et des ratios de taux décomposition dans les quatre hydroécorégions comprenant au moins trois sites d'étude ne montre aucune différence entre ces hydroécorégions, excepté pour $k_{\text{microbien}}$ qui est significativement plus faible dans les Landes (Fig. 14).

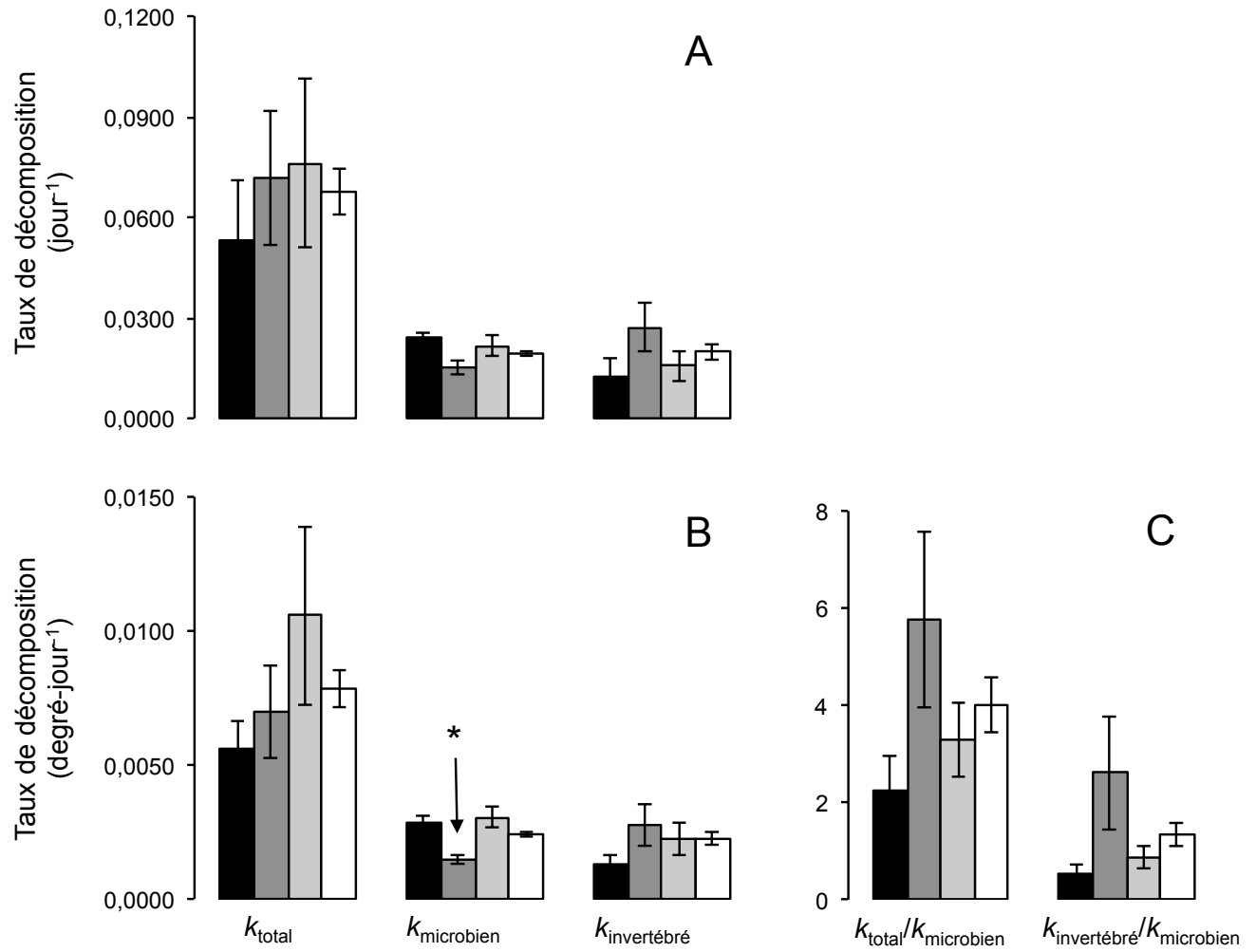


Figure 14 – Taux de décomposition exprimés en jour^{-1} (A) et en degré-jour^{-1} (B) et ratios des taux (C) dans les sites d'études. Les valeurs (moyenne $\pm$ SE) sont exprimées par hydroécorégion (noir : Causses aquitains, gris foncé : Landes, gris clair : Massif Central sud et blanc : Coteaux aquitains).

Taux de décomposition dans les sites tirés de la littérature

Concernant les cours d'eau tirés de la littérature, k_{total} ($F_{1,8} = 6,67$; $p = 0,033$) et $k_{\text{invertébré}}$ ($F_{1,8} = 5,71$; $p = 0,04$) sont significativement différents entre les deux hydro-écorégions (Fig. 15). Ainsi k_{total} se révèle moins élevé en Montagne Noire ($0,0054 - 0,0174$ °j⁻¹) que dans les Coteaux aquitains ($0,0110 - 0,0259$ °j⁻¹). Cette même tendance s'observe avec $k_{\text{invertébré}}$ en Montagne Noire ($0,0015 - 0,0034$ °jour⁻¹), plus faible que dans les Coteaux aquitains ($0,0029 - 0,0040$ °j⁻¹). Les taux de décomposition microbiens sont relativement peu variables et très comparables entre les deux hydro-écorégions (Montagne Noire : $0,0015 - 0,0021$ °j⁻¹ ; Coteaux aquitains : $0,0018 - 0,0022$ °j⁻¹). Le ratio $k_{\text{total}}/k_{\text{microbien}}$ n'est toutefois pas significativement différent entre les deux hydro-écorégions du fait d'une forte variabilité au sein de chaque hydroécorégion ($2,8 - 11,6$ en Montagne Noire et $5,8 - 12,6$ dans les Coteaux aquitains). De façon similaire, le ratio $k_{\text{invertébré}}/k_{\text{microbien}}$ n'est pas significativement différent entre les hydroécorégions ($0,8 - 2,1$ en Montagne Noire et $1,82 - 2,22$ dans les Coteaux Aquitains). L'analyse des corrélations de Spearman entre les variables environnementales et les taux de décomposition indique une corrélation entre k_{total} et l'alcalinité ($r = 0,65$; $p < 0,01$), entre $k_{\text{invertébré}}$ et la concentration en nitrate ($r = 0,67$; $p < 0,01$) et entre $k_{\text{invertébré}}$ et le pH ($r = 0,67$; $p < 0,01$).

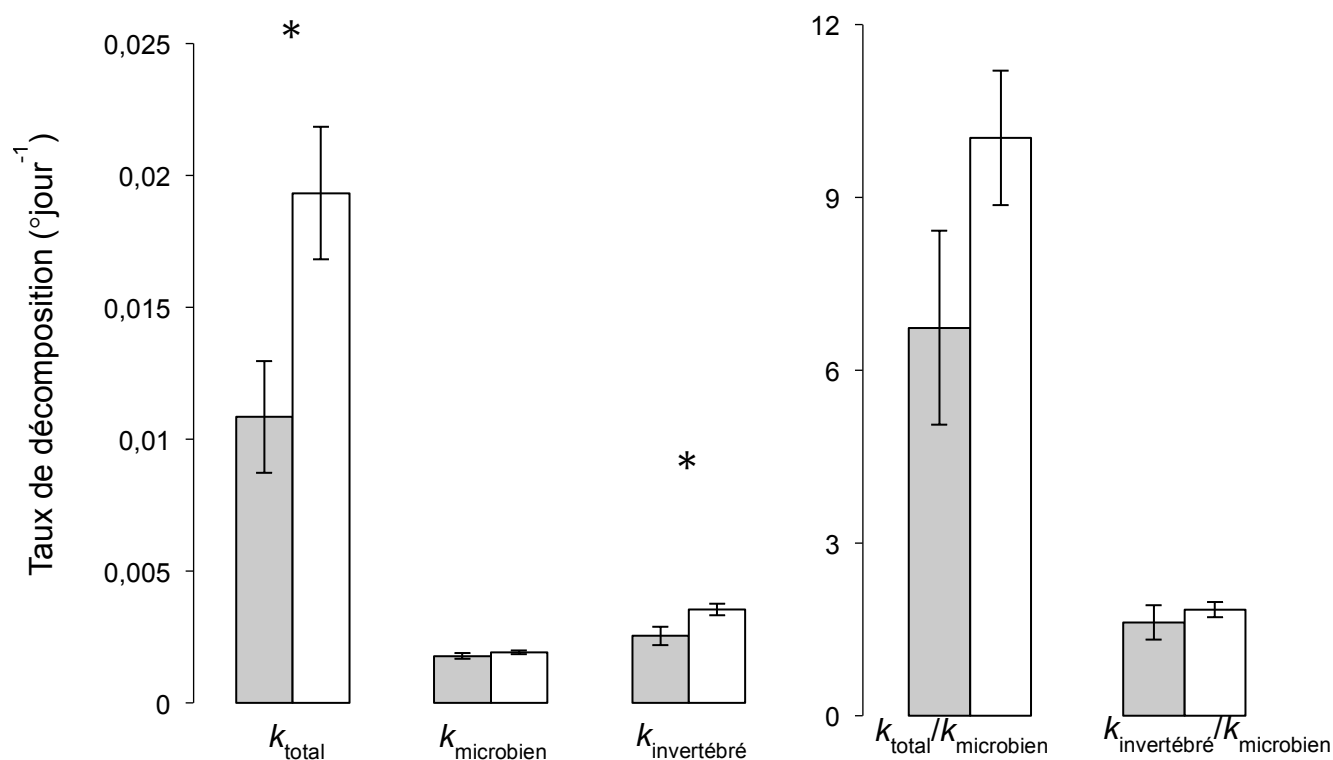


Figure 15 – Taux de décomposition moyen ($\pm$ SE) exprimé en degré-jour⁻¹ et ratios moyens des taux ($\pm$ SE) dans les sites de référence de la Montagne Noire (en gris, d'après les données de Hladysz et al., 2011, n = 5) et dans les Coteaux aquitains (en blanc, d'après les données de Lecerf et al., 2006, n = 5).

Influence des décomposeurs microbiens et invertébrés sur les taux de décomposition

Sur la base des 84 sites suivis, le taux de décomposition total (k_{total}) est positivement corrélé à l'abondance des familles d'invertébrés classés comme décomposeurs retrouvés dans les sacs à larges mailles, mais inversement corrélé à l'indice de Shannon et d'équitabilité qui leur sont associés (Tab. 10). Le taux de décomposition rapportés aux microorganismes ($k_{microbien}$) est positivement corrélé à la biomasse fongique et au taux de sporulation et inversement corrélé à l'indice d'équitabilité des espèces d'hyphomycètes ayant sporulé en laboratoire (Tab. 10). Le taux de décomposition calculé se rapportant à l'activité des macroinvertébrés suit les même patrons de corrélation que k_{total} , avec en plus une corrélation positive avec l'indice d'équitabilité associé au nombre de famille d'invertébrés rencontrées (Tab. 10). Les rapports des taux $k_{total}/k_{microbien}$ et $k_{invertébrés}/k_{microbien}$ sont corrélés à la fois à des métriques associées aux hyphomycètes (taux de sporulation) et aux familles d'invertébrés décomposeurs (abondance, indice d'équitabilité ; Tab. 10).

Tableau 10 – Corrélations entre les taux de décomposition et les métriques fonctionnelles et structurales associées. Les relations significatives sont en gras et '*' correspond à $p < 0.05$, '**' à $p < 0.001$ et '***', $p < 0.0001$.

	k_{total}	$k_{microbien}$	$k_{invertébré}$	$k_{total}/k_{microbien}$	$k_{invertébré}/k_{microbien}$
biomasse fongique	0.10	0.45 ***	-0.03	-0.07	-0.16
taux de sporulation	-0.13	0.33 **	-0.18	-0.24 *	-0.25 *
abondance des invertébrés	-0.12	0.02	-0.17	-0.10	-0.15
abondance des décomposeurs invertébrés	0.24 *	-0.14	0.27 *	0.30 **	0.30 **
richesse taxinomique conidies	0.04	-0.07	0.04	0.05	0.03
richesse taxinomique invertébrés	-0.09	0.02	-0.04	-0.06	-0.03
richesse taxinomique détritivores	-0.06	-0.02	-0.03	-0.01	0.02
Indice de Shannon conidies	0.01	-0.22	0.04	0.05	0.08
Indice de Shannon invertébrés	0.13	0.08	0.19	0.12	0.15
Indice de Shannon détritivores	-0.27 *	0.09	-0.23 *	-0.26 *	-0.19
Indice d'équitabilité conidies	-0.09	-0.25 *	-0.03	-0.03	0.02
Indice d'équitabilité invertébrés	0.20	0.06	0.24 *	0.18	0.20
Indice d'équitabilité détritivores	-0.27 *	0.15	-0.26 *	-0.30 **	-0.27 *

Effets des facteurs environnementaux sur les taux de décomposition

Le long des gradients régionaux de concentrations en phosphore et azote inorganiques dissous, les valeurs maximales de k_{total} augmentent à la fois dans les 84 sites d'étude et dans les sites dont les données sont issues de la littérature (Fig. 16). Les sites contaminés par les pesticides présentent des concentrations intermédiaires en phosphore dissous et intermédiaires à élevées en azote dissous, mais des taux de décomposition parmi les plus bas de l'ensemble des sites ($k_{\text{total}} < 0,0071 \text{ °j}^{-1}$). L'effet de l'azote ammoniacal est opposé, avec une diminution des valeurs maximales de k_{total} dès que la concentration en azote ammoniacal dépasse les $100 \mu\text{g.L}^{-1}$. Aucune tendance claire ne se dégage entre $k_{\text{microbien}}$ et les gradients de concentration en phosphore, azote dissous et azote ammoniacal.

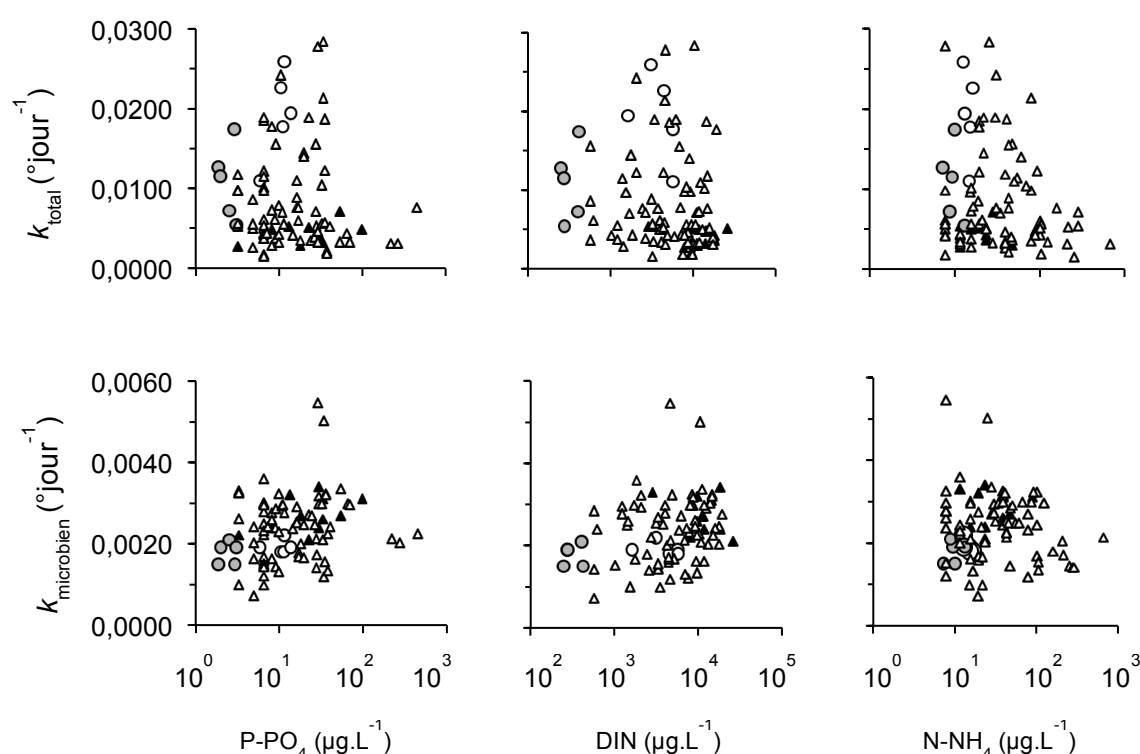


Figure 16 – Distribution des taux de décomposition le long des gradients de concentration en phosphore dissous (P-PO_4), azote inorganique dissous (DIN) et azote ammoniacal (N-NH_4). Les cercles gris correspondent aux valeurs de Hladyz et al. (2011), les cercles blancs aux valeurs de Lecerf et al. (2006), les triangles aux 84 sites étudiés et les triangles noirs aux sites spécifiquement étudiés pour la contamination par les pesticides (chapitre 2).

Les ratios $k_{\text{total}}/k_{\text{microbien}}$ et $k_{\text{invertébré}}/k_{\text{microbien}}$ ainsi que le taux $k_{\text{invertébré}}$ sont corrélés aux coordonnées du premier axe de l'analyse de redondance (Fig. 17). Les taux de décomposition total et microbien sont tous deux tirés à la fois par les deux axes de la RDA, mais de façon indépendante. Les variables environnementales significatives qui contribuent à expliquer la distribution de ces métriques sont sur l'axe 1, la température de l'eau, la surface du bassin versant et la concentration en phosphore dissous et sur l'axe 2, le score d'intégrité de la ripisylve et la saturation en oxygène dissous.

Certains taxons d'hyphomycètes aquatiques sont particulièrement influencés par les variables environnementales (Fig. S1). *Anguillospora filiformis* (Greathead) est principalement retrouvé dans les cours d'eau des Landes, tandis qu'*Alatospora acuminata* (Ingold) est fortement présent dans les cours d'eaux ayant une ripisylve réduite et une saturation en oxygène élevés. La présence d'une espèce filiforme indéterminée de longueur généralement inférieure à 40 μm est corrélée à la pression d'artificialisation et une conductivité élevée. Les espèces *Heliscus lugdunensis* (Sacc. & Théry) et *Anguillospora longissima* (Sacc. & Syd., Ingold) sont retrouvées dans des sites présentant des taux faibles de décomposition totale ou de décomposition due aux invertébrés (Fig. S2). Les valeurs de $k_{\text{microbien}}$ sont corrélées à l'abondance d'*Alatospora acuminata* (Ingold), *Clavariopsis aquatica* (De Wild.), *Stenocladia neglecta* (Marvanová & Descals), et *Crucella subtilis* (Marvanová & Suberkropp), tandis que *Tetrachaetum elegans* (Ingold) est associé à de faibles taux de décomposition microbien.

La distribution des décomposeurs invertébrés dans les sites étudiés est fortement influencée par l'altitude, la conductivité, la pression agricole et les phosphates (Fig. S3). Trois familles de décomposeurs se distinguent : les Nemouridae retrouvés dans les rivières d'altitude, les Gammaridae plutôt présents dans les cours d'eau sujets à des températures élevées, tandis que les Asellidae sont présentes dans les cours d'eau ayant une conductivité élevée et riche en phosphore dissous. Au total, les métriques de la décomposition se révèlent corrélées à l'abondance d'une dizaine de taxons de détritivores (Fig. S4). Ainsi, les taux de décomposition k_{total} , $k_{\text{invertébré}}$ et les ratios $k_{\text{total}}/k_{\text{microbien}}$ et $k_{\text{invertébré}}/k_{\text{microbien}}$ sont corrélés à l'abondance des Gammaridae et des Limoniidae et inversement corrélé à la présence des Physidae, des Caenidae et des Asellidae. Par ailleurs, $k_{\text{microbien}}$ se trouve positivement corrélé à l'abondance des Nemouridae, Leuctridae et Limnephilidae, mais négativement corrélé à l'abondance des Gastéropodes à opercules (Hydrobiidae et des Psychodidae).

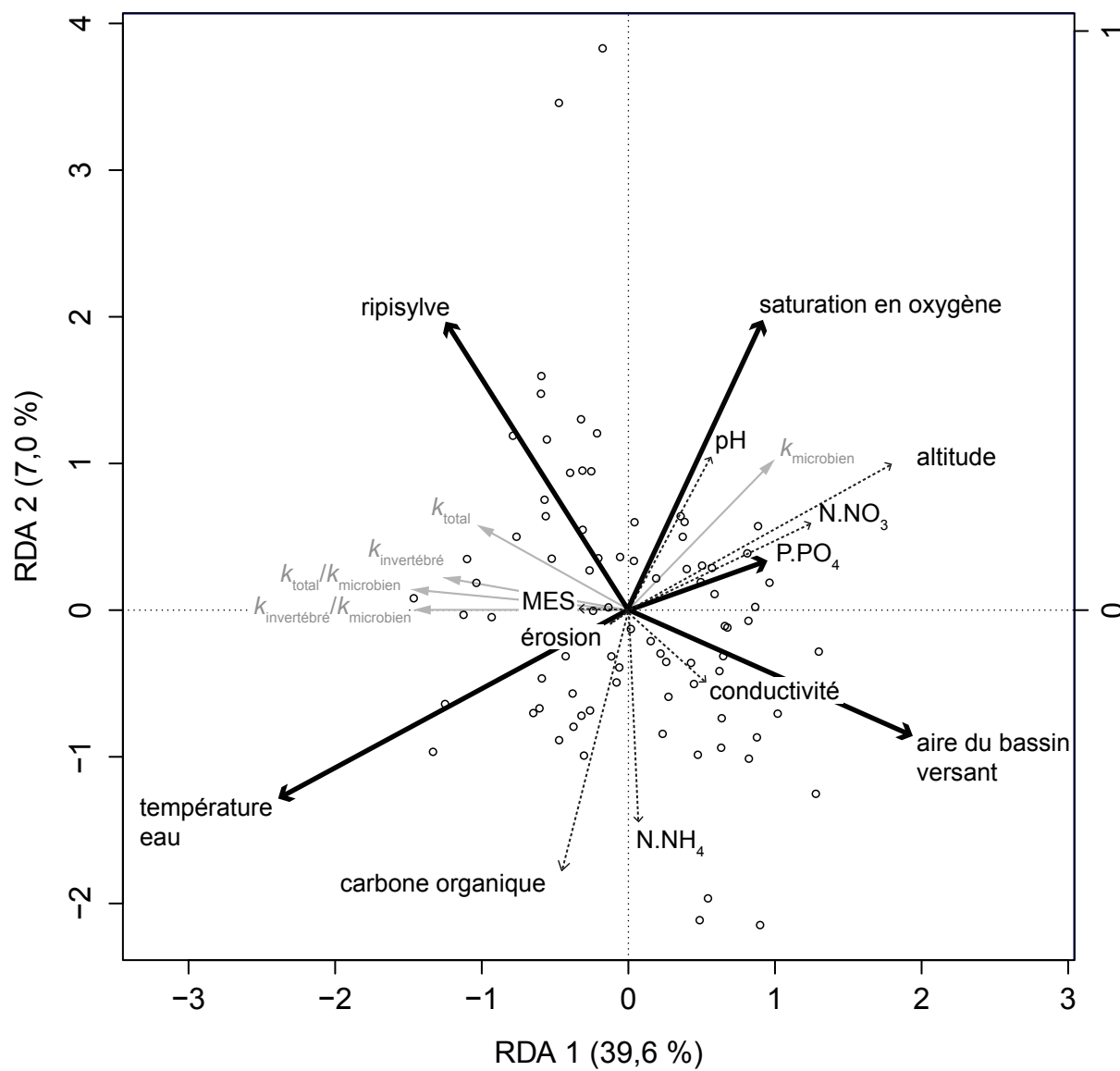


Figure 17 – Triplot des 5 métriques de la décomposition avec les variables environnementales disponibles pour les 84 sites étudiés. ($F_{16,5} = 4,08$, $p < 0,001$, $R^2_{adj} = 0,378$).

Proposition de métriques d'évaluation de l'intégrité

La distribution des 84 sites d'étude dans les 5 classes de qualité fonctionnelle déterminées à partir des valeurs moyennes du ratio $k_{\text{invertébré}}/k_{\text{microbien}}$ tirées de la littérature (Tab. 11) montre que : 8 rivières sont en très bon état, 14 en bon état, 15 en état moyen, 15 en état médiocre et 32 en mauvais état fonctionnel (Fig. 18).

La répartition basée, cette fois, sur les valeurs du k_{total} est la suivante : 8 rivières sont en très bon état, 6 en bon état, 25 en état moyen, 40 en état médiocre et 5 rivières en mauvais état fonctionnel (Fig. 18). Les 12 stations de l'étude pour les pesticides se situent dans un état mauvais à moyen d'après le ratio $k_{\text{invertébré}}/k_{\text{microbien}}$ et de mauvais à médiocre d'après le taux de décomposition totale (Fig. 18).

Tableau 11 – Limites des 5 classes d'intégrité fonctionnelle pour chacune des 5 métriques de la décomposition, déterminées pour l'ensemble du bassin Adour-Garonne à partir des valeurs moyennes issues de la littérature (Hladyz et al., 2011). Le coefficient indique le ratio par rapport à une valeur référence de 1.

état	coefficient	k_{total}	$k_{\text{microbien}}$	$k_{\text{invertébré}}$	$k_{\text{total}}/k_{\text{microbien}}$	$k_{\text{invertébré}}/k_{\text{microbien}}$
mauvais	>4,00	>0,0433	>0,0071	>0,0103	>25,9	>6,1
médiocre	4	0,0433	0,0071	0,0103	25,9	6,1
moyen	2	0,0217	0,0036	0,0052	13,0	3,0
bon	1,33	0,0144	0,0024	0,0034	8,6	2,0
très bon	1,11	0,0120	0,0020	0,0029	7,2	1,7
très bon	1	0,0108	0,0018	0,0026	6,5	1,5
très bon	0,9	0,0097	0,0016	0,0023	5,8	1,4
bon	0,75	0,0081	0,0013	0,0019	4,9	1,1
moyen	0,5	0,0054	0,0009	0,0013	3,2	0,8
médiocre	0,25	0,0027	0,0004	0,0006	1,6	0,4
mauvais	<0,25	<0,0027	<0,0004	<0,0006	<1,6	<0,4

Lorsqu'on croise les deux métriques $k_{\text{invertébré}}/k_{\text{microbien}}$ et k_{total} (Fig. 18), 20 sites se trouvent dans une classe de qualité identique (symbolisée par une même couleur) pour les deux métriques.

50 sites présentent une classe de qualité d'écart, 12 sites ont deux classes d'écart, 1 sites a trois classes d'écart et 1 site a quatre classes d'écart. Ces écarts sont représentés par le hachurage de couleurs sur la figure 18. Dans l'objectif de présenter une typologie intégrée de l'information issue des deux métriques, nous proposons une nouvelle figure attribuant précisément l'une des cinq classes de qualité à chacune de ces situations d'écart. Pour les sites présentant une classe de qualité d'écart (p.ex., moyen/bon), il a été attribué la classe la moins « dégradante » des deux métriques (c.à.d. bon). Pour les sites avec deux classes d'écart, c'est la classe intermédiaire qui est sélectionnée. Au-delà de deux classes (p.ex., bon/mauvais), c'est la classe intermédiaire la moins dégradante qui est prise en compte (moyen). Cette nouvelle classification répartit les 84 sites de la manière suivante 7 sites

« très bon », 14 sites « bon », 26 sites « moyen », 33 sites « médiocre » et 4 sites « mauvais » (Fig. 19).

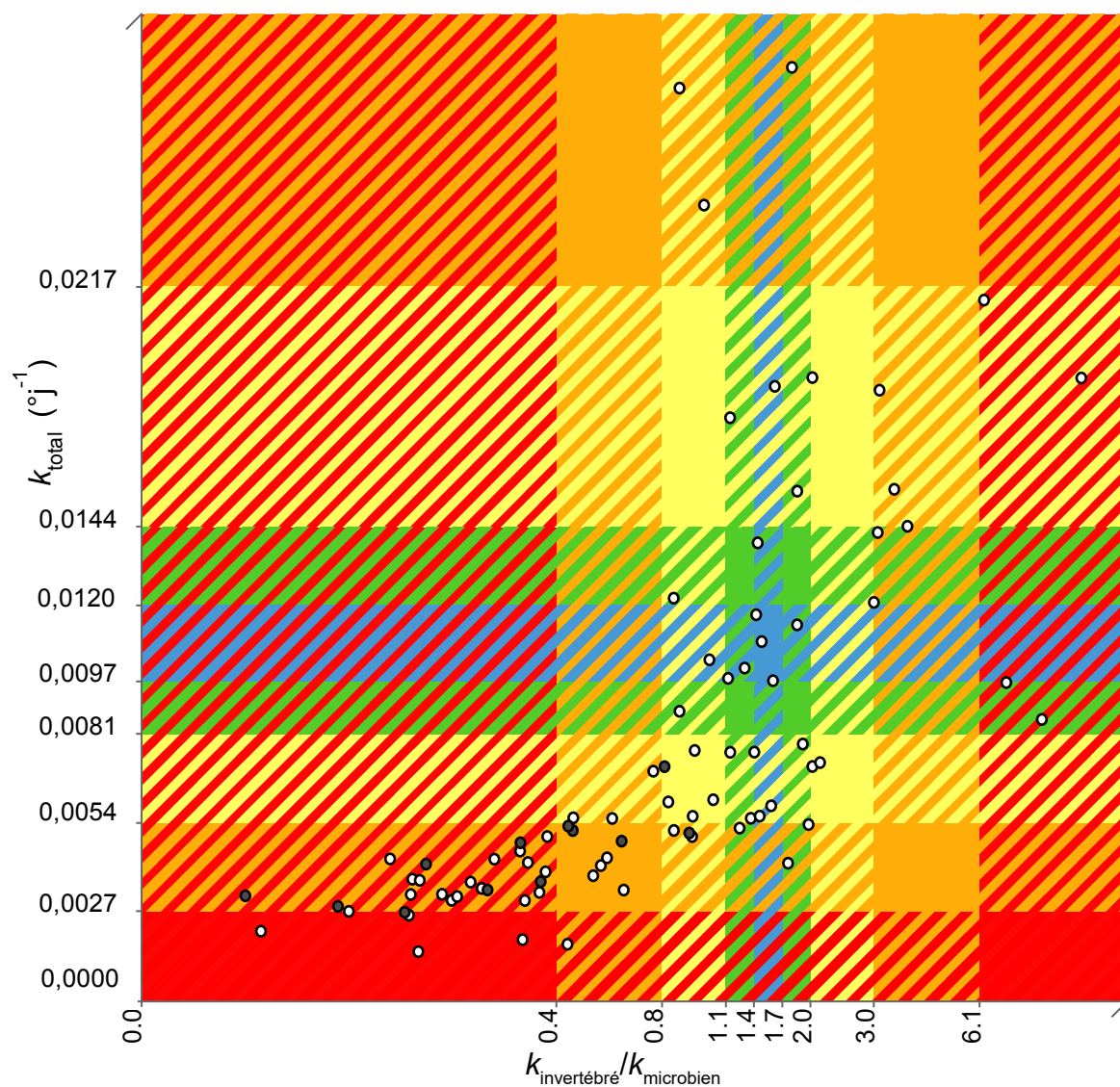


Figure 18 – Graphique croisant le taux k_{total} et le ratio $k_{\text{invertébré}}/k_{\text{microbien}}$ obtenus pour les 84 sites d'étude, les cercles gris correspondant aux sites suivis pour la contamination par les pesticides dans le chapitre 1. Les classes de qualité – allant de bleu (très bon) à rouge (mauvais) – se distribuent de part et d'autre de la valeur moyenne définie comme référence à partir des cinq sites de référence suivis par Hladyz et al. (2011, Tab. 11). Les zones, où les deux métriques ont une classe de qualité différente, sont hachurées avec les couleurs de qualité de chaque métrique.

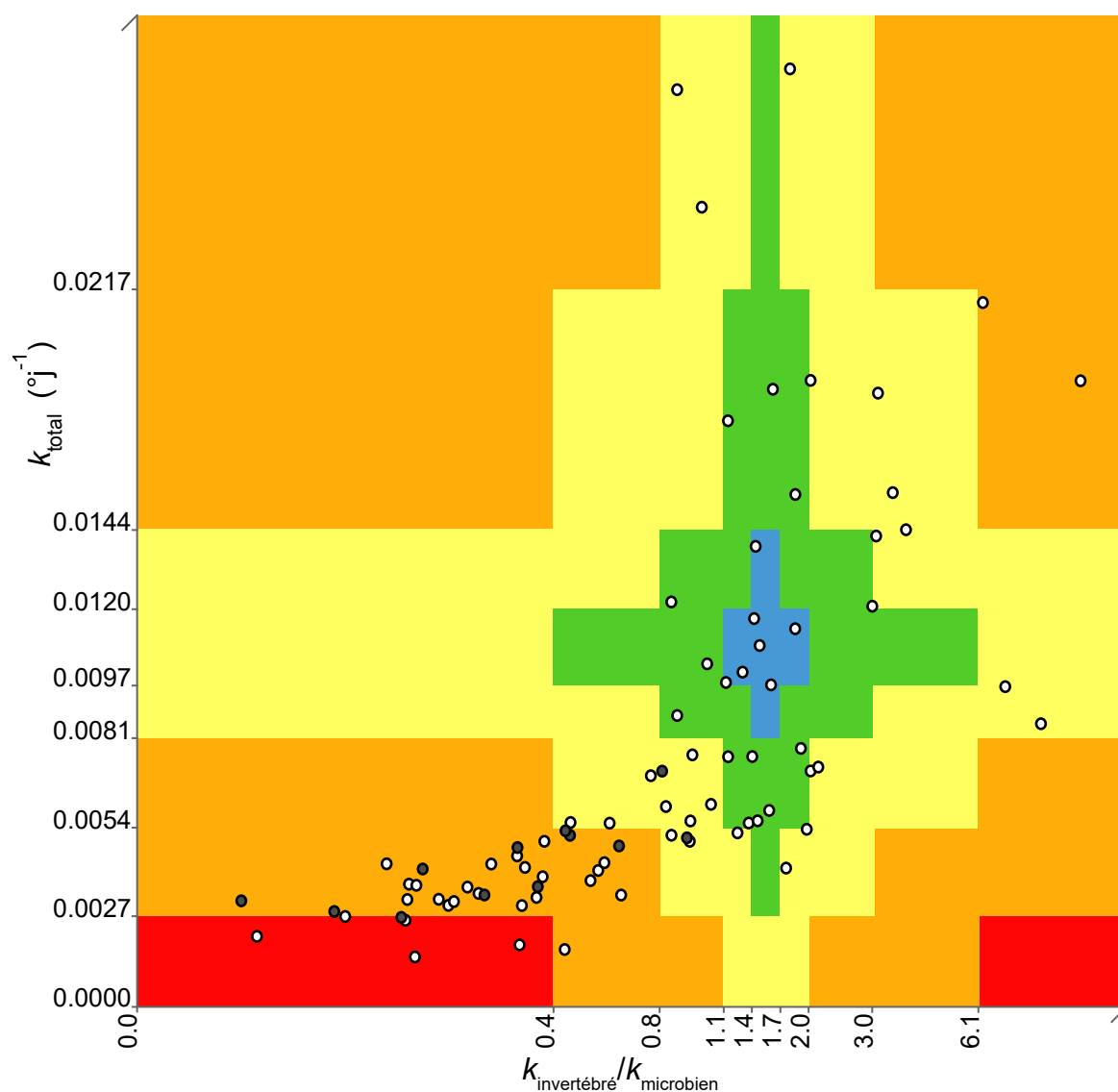


Figure 19 – Grille d'évaluation de la qualité fonctionnelle proposée, croisant le taux k_{total} et le ratio $k_{\text{invertébré}}/k_{\text{microbien}}$ obtenus pour les 84 sites d'étude, les cercles gris correspondant aux sites suivis pour la contamination par les pesticides dans le chapitre 1. Les classes de qualité – allant de bleu (très bon) à rouge (mauvais) – se distribuent de part et d'autre de la valeur moyenne définie comme référence à partir des cinq sites de référence suivis par Hladysz et al. (2011, Tab. 11). Pour les sites présentant une classe de qualité d'écart (p.ex., moyen/bon), il a été attribué la classe la moins « dégradante » des deux métriques (c.à.d. bon). Pour les sites ayant deux classes d'écart, c'est la classe intermédiaire qui est sélectionnée. Au-delà de deux classes (p.ex., bon/mauvais), c'est la classe intermédiaire la moins dégradante qui est prise en compte (moyen).

Discussion

Facteurs contrôlant la décomposition des litières dans le bassin Adour-Garonne

Il est maintenant bien documenté que les nutriments, notamment l'azote et le phosphore, lorsqu'ils sont présents en faible concentration ont tendance à limiter le processus de décomposition (Elwood et al., 1981, Woodward et al., 2012). Dans ces eaux oligotrophes, c'est notamment la décomposition microbienne qui est accélérée par de faibles apports en nitrates (Ferreira et al., 2006b), tandis que la décomposition par les décomposeurs invertébrés est peu affectée (Gulis et al., 2006, Woodward et al., 2012). Cette demande microbienne a été comparée au modèle de saturation de type Michaelis-Menten, la concentration en nutriments dissous à la moitié du seuil d'activité microbienne étant comprise entre 16 et 303 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour le N-nitrate (Ferreira et al., 2006b, Gulis et al., 2006) et entre 7 et 21 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour le P-PSR (Rosemond et al., 2002). Dans les rivières du bassin Adour-Garonne, la concentration en nitrate dépasse ce seuil ($> 500 \mu\text{g N-NO}_3.\text{L}^{-1}$) et ne semble pas limitante pour la décomposition microbienne. Au contraire, la concentration en phosphore est potentiellement limitante puisque 50 des 84 sites présentent une concentration inférieure à 21 $\mu\text{g P-PO}_4.\text{L}^{-1}$. La méta-analyse de Ferreira et al. (2015) sur l'effet des nutriments a confirmé que l'apport combiné d'azote et de phosphore stimule plus fortement le processus de décomposition que l'apport d'un seul des deux nutriments et suggère l'existence d'une co-limitation.

A l'échelle régionale, l'effet de l'ammonium sur le processus de décomposition est négatif au delà d'une certaine concentration (40 $\mu\text{g N-NH}_4.\text{L}^{-1}$) et plus notablement encore au delà de 100 $\mu\text{g N-NH}_4.\text{L}^{-1}$, cf. Fig. 16). Ce résultat confirme la tendance observée dans l'étude de Lecerf et al. (2006) dans les cours d'eau agricoles. Les sites présentant une concentration en ammonium supérieure à 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ présentaient un taux de décomposition entre 5 et 10 fois plus faible que les sites ayant une concentration en ammonium inférieure à 23 $\mu\text{g.L}^{-1}$. De plus, la modélisation du taux de décomposition en fonction de la concentration en ammonium proposée dans l'étude de Lecerf et al. (2006) semble s'appliquer à l'échelle régionale de notre étude. L'effet inhibiteur de l'ammonium porte essentiellement sur l'activité des décomposeurs invertébrés (Camargo & Alonso, 2006, Lecerf et al., 2006) et dans nos sites, cet effet s'observe de façon évidente au delà de 100 $\mu\text{g N-NH}_4.\text{L}^{-1}$.

Les taux de décomposition semblent aussi affectés négativement par d'autres polluants fréquemment trouvés dans les cours d'eau, tels les pesticides (Peters et al., 2013). En considérant les sites étudiés dans le chapitre 1 pour l'évaluation de l'effet des pesticides, on constate que ces douze sites ont des taux de décomposition entre 9 et 25 fois plus faibles que la moyenne observée sur l'ensemble des sites. De plus les nutriments ne semblent pas contribuer à la variation du taux de décomposition entre ces sites contaminés, malgré

l'existence d'une grande amplitude des concentrations en nutriment entre sites (facteur 30 pour le phosphore, et 9 pour l'azote nitrique), suggérant bien que l'influence potentiellement positive des nutriments est contrecarrée par un effet inhibiteur très marqué des pesticides.

A partir des 84 sites suivis, la décomposition est inversement corrélée à la perte d'intégrité de la ripisylve, et notamment à la proportion de champs cultivés dans le corridor rivulaire (chapitre 2). La méta-analyse de Ferreira et al. (2016b) rapporte une inhibition moyenne de la décomposition de 26% due au remplacement de la ripisylve originelle par une ripisylve plantée de feuillus. Les principales causes sous-tendant ces résultats étaient une baisse de la diversité des litières apportées (Lecerf et al., 2005) et leur plus faible qualité nutritionnelle (Bruder et al., 2014). La présence de cultures aux abords de la rivière est susceptible d'entraîner de multiples altérations dans les écosystèmes lotiques, se répercutant sur les processus écosystémiques et la décomposition en particulier (Piscart et al., 2009; Clapcott et al., 2010; Wagenhoff et al., 2011; Bruder et al., 2015) avec à la fois des modifications qui stimulent le processus (p.ex. réchauffement des eaux) ou qui le ralentissent (apport de nutriments par ruissellement). Hladysz et al. (2011) avaient observé un changement des processus écosystémiques le long d'un gradient d'altération de la ripisylve (ripisylve de feuillus vs. prairies pâturées vs. ripisylve dominée par une espèce invasive *Rhododendron ponticum* L.), avec une baisse des taux de décomposition dans les rivières bordées d'une prairie au profit d'un flux de matière et d'énergie transitant par la voie de la production primaire. L'effet résultant à l'échelle régionale est une baisse globale du taux de décomposition réalisée par les invertébrés détritvires non compensée par la décomposition microbienne. Cette altération peut s'expliquer par un certain nombre de facteurs agissant isolément mais le plus souvent en interaction : réduction des apports allochtones de litières végétales (contraignant la diversité et l'abondance des détritvires), perturbations hydromorphologiques telles que la linéarisation du chenal (Elosegi & Sabater, 2013; Mutz et al., 2013) et la simplification des habitats qui réduisent le temps de rétention des litières (Elosegi et al., 2011), abstraction d'eau (Matthaei et al., 2010) et effet inhibiteur des sédiments fins et des molécules toxiques (Magbanua et al., 2013). Le fait que le processus réponde de manière sensible aux perturbations de la qualité de la ripisylve avec des taux de décomposition élevés indicateurs d'une certaine intégrité forestière (Silva-Junior et al., 2014) est un résultat intéressant, permettant d'envisager l'usage de cet indicateur pour la gestion forestière dans le voisinage des rivières.

C'est seulement dans l'hydroécocorégion des Landes que les caractéristiques physico-chimiques semblent défavorables à la décomposition microbienne, avec la présence quasi exclusive d'*Anguillospora filiformis* (Greathead). Dans les autres hydroécocorégions, la décomposition microbienne semble être d'avantage influencée par les variables chimiques (température et oxygénation de l'eau) que par les caractéristiques physiques, même si leur influence s'observe au niveau de l'identité des espèces dominantes impliquées dans le processus. Dans les ripisylves fortement réduites (enherbées ou artificialisées), le cortège microbien est dominé par *Alatospora acuminata* (Ingold) et une espèce filiforme indéterminée dont la dominance est fortement corrélée à l'artificialisation de la ripisylve. Il a

été montré le caractère ubiquiste d'*Alatospora acuminata*, puisque c'est l'une des espèces ayant la distribution la plus large dans le sud-ouest de la France (Chauvet, 1990) et à travers le monde (Webster & Descals, 1981 in Chauvet, 1990).

Au niveau régional il apparaît une relation étroite entre les communautés de décomposeurs, les taux de décomposition et les paramètres environnementaux. Concernant la communauté des invertébrés, nos observations sont proches de celles faites par Hladyz et al. (2011) dans des cours d'eau agricoles d'Irlande couvrant un large gradient de nutriments. En effet, dans les sites où les conditions environnementales sont les moins modifiées, on observe la présence de larves de Nemouridae, une famille de plécoptère avec de nombreux taxa décomposeurs. A l'inverse, dans les sites présentant une forte charge ionique associée à des phosphates et nitrites en concentrations élevées, on retrouve les taxons indicateurs d'une pollution ionique, c'est à dire la famille de crustacés Asellidae et des gastéropodes à opercules de la famille des Hydrobiidae et des Physidae. Aux sites ayant un niveau de trophie intermédiaire et présentant des eaux relativement chaudes associées à un milieu ouvert, principalement agricole, sont associés les crustacés de la famille des Gammaridae. Ces tendances similaires dans deux régions distinctes (Irlande et SO de la France) mettent en évidence les potentialités d'une prise en compte de certains taxons dans l'évaluation des taux de décomposition. En effet, Hladyz et al. (2011) ont montré que les changements dans la structure du macrobenthos, exprimée sur un seul axe à l'aide d'une analyse de correspondance avec élimination des tendances associées au degré d'eutrophisation, expliquaient d'avantage les variations des taux de décomposition totale et liée aux invertébrés que ne le font les concentrations en nutriments. Il apparaît clairement qu'une abondance élevée de Gammaridae, qui dominent alors la communauté des décomposeurs invertébrés, accélère fortement la décomposition (Dangles et al., 2004, Lecerf et al., 2006, Piscart et al., 2009), tandis qu'un taux de décomposition microbien élevé est souvent associé à une abondance des Nemouridae et des Leuctridae dont la contribution relative dans la décomposition reste modérée.

Approche d'une évaluation de l'intégrité fonctionnelle

Les gestionnaires utilisant un indicateur, quel qu'il soit, ont besoin d'une grille d'évaluation pour traduire les valeurs obtenues en termes de qualité d'évaluation de l'intégrité de l'écosystème étudié et définir les limites du bon état, permettant ainsi de définir des objectifs de gestion fixés par la Commission Européenne (2000). La première proposition d'évaluation fonctionnelle des rivières à partir de la décomposition des litières (Gessner et Chauvet, 2002) est basée sur deux approches.

La première, qui correspond au cas idéal, consiste à évaluer l'écart entre le taux de décomposition du site à évaluer et celui obtenu dans un site de référence. Plus l'écart est élevé, plus le dysfonctionnement de l'écosystème étudié est important. Les limites de « bonne qualité fonctionnelle » sont comprises entre 75 et 133 % du taux de décomposition mesuré dans les sites de référence proches (c'est à dire ne présentant pas d'impact

anthropiques notables). Ces limites sont sensées intégrer la variabilité naturelle du processus. Un tel intervalle de valeurs a été relevé sur des litières d'aulne entre sites du même bassin versant, localisés à l'amont et à l'aval d'un cours d'eau et de son affluent dans les Pyrénées (Fabre et Chauvet, 1998). Une variation interannuelle comprise entre 75 et 133 % a également été observée pour d'autres types de litières dans une rivière des Appalaches aux Etats-Unis (Wallace et al., 1999). Sur nos sites de références (Hladyz et al., 2011), on observe un coefficient de variation élevé (44 %) correspondant à un écart compris entre 49 et 161 % entre 5 rivières pourtant proches géographiquement, car toutes localisées dans la Montagne Noire, et écologiquement, du fait de caractéristiques abiotiques très homogènes. Un tel intervalle coïncide en fait avec celui proposé par Gessner et Chauvet (2002) (50 à 200 %, i.e. correspond au premier niveau d'altération), pour exprimer la variabilité du processus de décomposition à une échelle régionale, telle que déterminée à partir de valeurs relevées dans 23 rivières boréales d'ordre 1 à 7 (Jonsson et al., 2001). L'étude de Feio et al. (2010) mentionne une moyenne et une variabilité du taux de décomposition [$k_{\text{total}} = 0,0916 \pm 0,0160$ (SE)] des feuilles d'aulne dans 24 rivières portugaises considérées comme références à une échelle régionale, également proches de nos valeurs de référence [$k_{\text{total}} = 0,0848 \pm 0,0174$ (SE)] (Hladyz et al., 2011). D'après ce premier constat, il apparaît que la variabilité entre nos sites choisis comme des références est élevée, semblable à la variabilité observée au niveau régional dans d'autres études. Toutefois, la valeur moyenne du taux, sur laquelle est basée notre appréciation de l'altération fonctionnelle, est homogène avec celle relevée dans d'autres régions. En conséquence, bien que le choix des sites de référence sélectionnés pour notre étude ne soit sans doute pas optimal du fait d'une grande variabilité inter-sites, toutefois proches géographiquement, nous avons utilisé ces sites pour notre démonstration, tout en gardant en perspective le déploiement d'un suivi de la décomposition sur un nombre beaucoup plus conséquent de sites de référence à l'échelle régionale.

La seconde approche consiste à considérer les taux de décomposition absolus, permettant de qualifier les taux de décomposition en l'absence de sites de référence. Les valeurs absolues des taux de décomposition de feuilles d'aulne glutineux proposés par Gessner et Chauvet (2002) sont comprises entre 0,01 et 0,03 jour⁻¹ pour des rivières ayant un fonctionnement optimal. Ces valeurs ont été déterminées à partir de la connaissance, par les auteurs, des valeurs relevées dans différents cours d'eau de moyenne montagne et de piedmont, considérés de fait comme des références (p.ex., taux de décomposition compris entre 0,0204 et 0,0365 jour⁻¹ dans les Pyrénées ariégeoises ; cf. Fabre et Chauvet, 1998). Le premier constat est que les taux de décomposition mesurés sur nos sites de référence dans la Montagne Noire sont entre 1,9 et 5 fois plus élevés, de même pour les 24 sites de référence portugais (Feio et al., 2010). L'étude de Piscart et al. (2009) mentionne également des valeurs de taux de décomposition au moins trois fois plus élevées que les valeurs proposées par Gessner et Chauvet (2002) pour une rivière forestière de plaine. Cette différence peut être due à (1) l'effet limitant des nutriments dans les sites de références utilisés dans Gessner et Chauvet (2002), consistant essentiellement en des rivières de montagne peu anthropisées comparées aux rivières agricoles de Piscart et al (2009), et (2)

l'effet stimulant de la température, plus élevée dans les cours de plaine. La température de l'eau est un facteur important à considérer dans la variabilité des taux de décomposition (ex : Friberg et al., 2009, Ferreira and Chauvet, 2011, Boyero et al., 2016, Irons et al., 1994). L'expression des taux de décomposition en degré-jour permet de corriger les différences du taux de décomposition liées à la température entre les rivières (Hladyz et al., 2011, Woodward et al., 2012). Cette correction est d'autant plus importante pour la comparaison des taux de décomposition à une échelle inter-régionale.

Proposition de métriques

L'évaluation du processus de décomposition gagne en précision lorsque les taux de décomposition sont déterminés pour chacun des deux grands types de décomposeurs réalisant le processus, les macroinvertébrés benthiques et les micro-organismes (Woodward et al., 2012, Dangles et al., 2011, Lecerf et al., 2006). Le ratio des taux de décomposition entre les sacs à grosses mailles et les sacs à fines mailles ($k_{\text{total}}/k_{\text{microbien}}$) est l'une des expressions de la contribution relative des invertébrés et des microorganismes (Gessner et al., 2002). La valeur optimale pour ce ratio a été déterminée comme devant être comprise entre 1,2 et 1,5. Or certains des taux observés dans nos sites de référence (c.à.d. les sites de la Montagne Noire issus de la littérature ; Hladyz et al., 2011) compris entre 2,8 et 11,7 sont totalement déclassés par la grille d'évaluation de Gessner & Chauvet (2002). En fait, les valeurs du ratio $k_{\text{total}}/k_{\text{microbien}}$ proposées par Gessner et Chauvet (2002) partent du principe que le processus de décomposition est largement dominé par l'activité des microorganismes. Ainsi, dans les cours d'eau alpins, ce sont généralement les microorganismes, notamment les champignons aquatiques, qui orientent le processus (Taylor and Chauvet, 2014, Robinson et al., 1998) conduisant à des ratios proches de ceux proposés par Gessner et Chauvet (2002). En conséquence, on mesure bien ici que le choix du type de cours d'eau, par ses paramètres abiotiques qui vont influencer ses caractéristiques biotiques, est particulièrement déterminant pour fixer les valeurs du ratio $k_{\text{total}}/k_{\text{microbien}}$. Pour des cours de basse altitude ou de plaine, une révision à la hausse des valeurs proposées Gessner et Chauvet (2002) devrait ainsi être envisagée.

Le ratio $k_{\text{invertébré}}/k_{\text{microbien}}$ (qui est une formulation différente du ratio $k_{\text{total}}/k_{\text{microbien}}$) a été utilisé dans de nombreuses études (Woodward et al., 2012, Hladyz et al., 2011). Il donne une appréciation plus directe de la contribution relative de chaque compartiment de décomposeur. Cette métrique n'a toutefois pas été proposée par Gessner et Chauvet (2002). Rappelons que, comme pour le ratio $k_{\text{total}}/k_{\text{microbien}}$, le calcul du ratio $k_{\text{total}}/k_{\text{microbien}}$ nécessite que les sacs à grosses et fines mailles soient exposés dans la rivière pendant la même période de temps lorsque l'évaluation du temps de décomposition n'est basée que sur une seule durée d'exposition dans la rivière.

La grille d'évaluation de la qualité fonctionnelle à partir du processus de décomposition proposée dans le présent chapitre tient compte des demandes de la Directive Cadre (Commission Européenne, 2000) de (1) comparer les valeurs obtenues à des valeurs de

référence spécifiques et (2) classer les résultats en terme de ratio de qualité écologique (EQR « Ecological Quality Ratio ») selon cinq classes de qualité de l'écosystème aquatique depuis un « mauvais » jusqu'à un « très bon » état écologique (Hatton-Ellis, 2008), ici en se référant à des classes de qualité de l'état fonctionnel. Cette grille d'évaluation croise (1) le taux de décomposition total (axe des ordonnées) mesuré dans chacun des sites à partir de feuilles d'aulne exposées dans les sacs à grosses mailles et (2) le rapport de l'activité des invertébrés à l'activité microbienne (axe des abscisses) obtenu en tenant compte des pertes de masses des feuilles d'aulne dans les sacs à grosses et à fines mailles. Comparativement aux scores proposés par Gessner et Chauvet (2002) pour l'évaluation du taux de décomposition en fonction de l'écart à la référence, nos classes de qualité de « très bon » et « bon » état correspondent à un score de '2', tandis que notre classe de qualité d'état « moyen » correspond au score de '1' et nos classes d'état « médiocre » et « mauvais » au score '0'.

L'interprétation de la position des sites sur l'axe des ordonnées, en rapport au taux de décomposition total (k_{total}), donne une idée globale de la vitesse de transformation des feuilles d'aulne en chacun des sites d'étude. On considère les sites ayant un k_{total} proche des valeurs de référence comme dans un état « bon » à « très bon ». Les sites ayant un k_{total} plus élevé sont caractérisés par un processus de décomposition accéléré. Cette accélération de la transformation de la matière organique peut-être associée à des facteurs environnementaux tel que les nutriments dont le rôle stimulant a été mis en évidence expérimentalement (Ferreira et al., 2015; Rosemond et al., 2015). En-deçà de la classe de qualité de « bon » état, le processus de décomposition est ralenti. On peut supposer que des facteurs environnementaux inhibent le processus de décomposition dans ces sites, tels l'ammonium (Lecerf et al., 2006a), les éléments métalliques (Ferreira et al., 2016a) ou encore des molécules organiques toxiques comme les pesticides (Peters et al., 2013 ; Ferreira et al., 2016b). Sur l'axe des abscisses, le ratio $k_{\text{invertébré}}/k_{\text{microbien}}$ permet d'avoir une connaissance directe de la contribution des microorganismes et des invertébrés dans le processus. En deçà du ratio observé dans les classes de qualité de « très bon » à « bon » état, le processus est principalement réalisé par les microorganismes. Au-delà des classes de qualité de « très bon » à « bon » état, le processus de décomposition est principalement réalisée par les décomposeurs invertébrés. En fait, l'altération de la décomposition tend à se manifester simultanément sur les deux métriques. On observe une tendance générale où k_{total} augmente exponentiellement en fonction du ratio $k_{\text{invertébré}}/k_{\text{microbien}}$, indiquant une implication croissante des détritivores lorsque le taux de décomposition augmente. Par ailleurs, le graphique de distribution montre une importance des détritivores très variable selon les sites. Les rivières présentant à la fois un taux de décomposition modéré à faible ($k_{\text{total}} \leq$ « moyen ») et une dominance de la décomposition microbienne ($k_{\text{invertébré}}/k_{\text{microbien}} \leq$ « moyen ») subissent une altération du processus essentiellement dans sa composante « invertébré ».

Il est intéressant de remarquer que toutes les combinaisons envisageables entre ces deux métriques ne sont pas rencontrées (c.à.d. k_{total} élevé + $k_{\text{invertébré}}/k_{\text{microbien}}$ élevé ; k_{total} élevé +

$k_{\text{invertébré}}/k_{\text{microbien}}$ faible ; k_{total} faible + $k_{\text{invertébré}}/k_{\text{microbien}}$ élevé ; k_{total} faible + $k_{\text{invertébré}}/k_{\text{microbien}}$ faible) avec notamment deux secteurs de la grille d'évaluation quasiment exempts de sites. Le premier concerne un k_{total} élevé dominé par la décomposition microbienne et le second un k_{total} faible dominé par la décomposition invertébrée. Il est difficilement envisageable en climat tempéré d'observer des valeurs dans le premier secteur où, pour des conditions de référence, la présence de détritivores contribuant de façon importante à la décomposition est attendue (Hladysz et al., 2010; Pozo et al., 2011; Woodward et al., 2012). Par contre ce cas est envisageable dans d'autres biomes tels que les cours d'eaux tropicaux, p. ex. d'Amérique centrale et du sud, où l'activité des détritivores est faible et la décomposition microbienne relativement importante dans des conditions de référence (Mathuriau & Chauvet, 2002, Rincón & Santelloco, 2009, Boyero et al., 2015). Citons également le cas des torrents glaciaires où l'intervention des détritivores dans la décomposition est très faible (Robinson et al., 1998). Le second secteur, correspondant à une inhibition générale du processus affectant toutefois davantage les microorganismes que les invertébrés est envisageable quel que soit le biome considéré. C'est typiquement le cas d'une altération ciblant en priorité les décomposeurs microbiens, telle qu'une contamination par les fongicides. Il est rapporté que les litières exposées aux fongicides (p. ex., imazilil, tébuconazole et propiconazole) induisent à la fois des changements dans la structure et le fonctionnement de la communauté microbienne, généralement dominée par les champignons aquatiques, une diminution du taux de décomposition microbien et une altération des performances de consommation des détritivores (Artigas et al., 2012; Rasmussen et al., 2012a; Flores et al., 2014). Toutefois de tels résultats relèvent le plus souvent d'études de laboratoires. L'importance relative des fongicides se révèle généralement faibles et leurs effets sur la décomposition microbienne non détectables dans les études de terrain évaluant les conséquences fonctionnelles d'une contamination par les pesticides, comme nous l'avons vu dans les cours d'eau agricoles du sud-ouest de la France (Brosed et al., 2016).

Enfin, un résultat marquant est l'obtention d'une répartition de nos 84 sites d'étude dans l'ensemble des 5 classes de qualité définies. Ce résultat met bien en évidence la diversité des situations de qualité fonctionnelle dans le district hydrographique Adour-Garonne. Il résulte d'un choix de limites de classe inspirées par la littérature (cf. Gessner & Chauvet 2002), mais appliquées aux deux paramètres de la décomposition ici croisés. Par ailleurs, il est intéressant d'analyser cette variabilité de la qualité fonctionnelle à la lumière de la procédure de sélection de nos sites, basée sur le principe de recouvrement des 5 classes de qualité de l'état écologique, d'après les indicateurs biologiques et les mesures physicochimiques, rencontrées dans le bassin Adour-Garonne. En comparant le pourcentage de sites atteignant le bon état avec les indicateurs structuraux (49 % pour IBGN et 59 % pour IBD), le bon état selon l'évaluation de la qualité fonctionnelle proposée n'est atteint que pour deux fois moins de sites (28 %). Cela confirme toute la pertinence d'une évaluation du fonctionnement des écosystèmes lotiques basée sur un indicateur mettant en évidence des altérations non mesurées avec les outils de gestion actuels (Sandin & Solimini, 2009). Toutefois, l'utilisation de la décomposition des litières comme indicateur du

fonctionnement des écosystèmes lotiques dans les réseaux de suivi de la qualité écologique demande encore des affinements techniques pour être validés par la communauté ; ceux-ci sont développés dans la discussion générale du présent travail.

Matériel supplémentaire

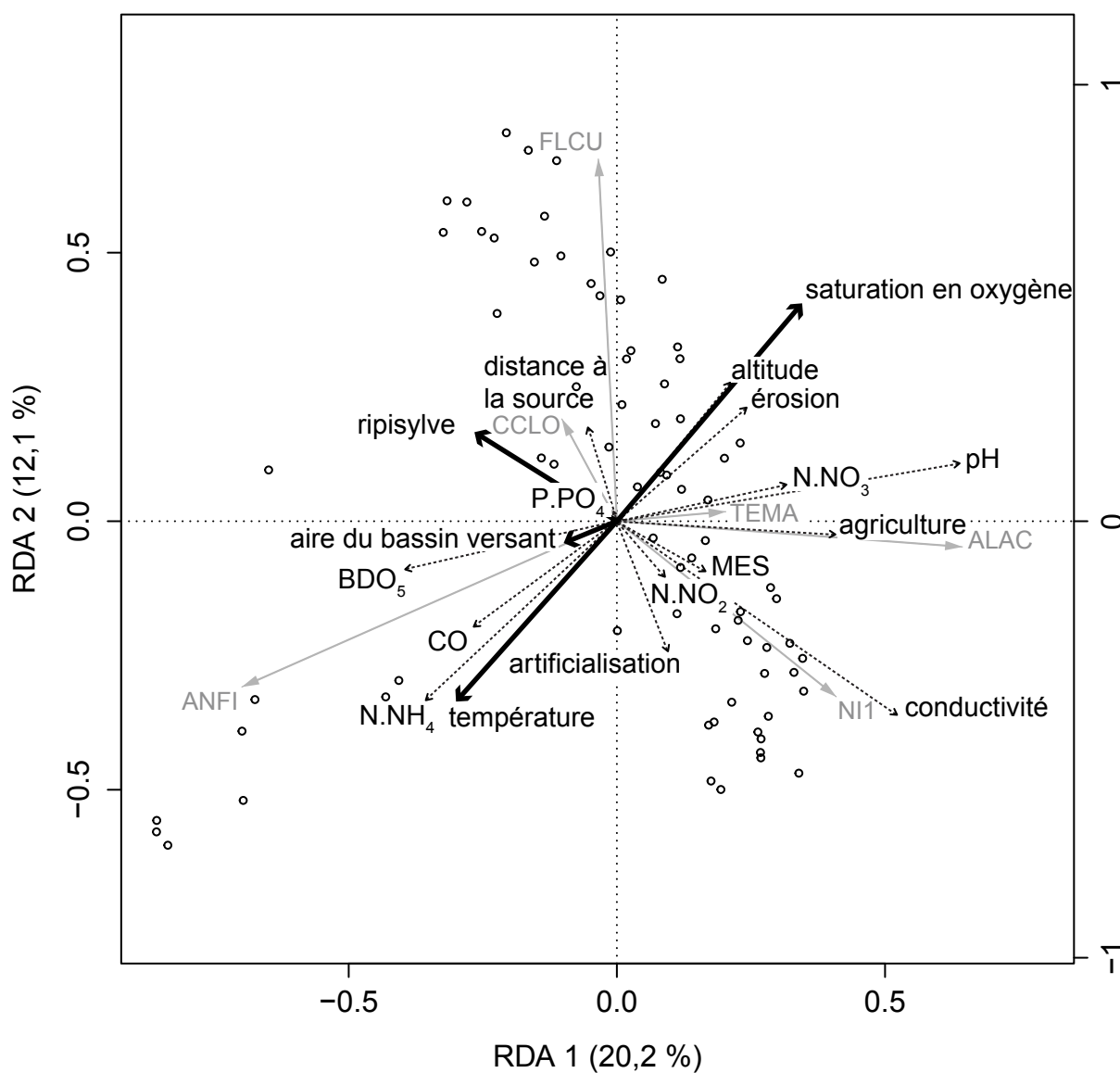


Figure S1 – Triplot des espèces d'hyphomycètes aquatiques (gris), des variables environnementales (noir) pour les 84 sites d'étude. Le modèle est significatif ($F_{83,15} = 3,65$, $p < 0,001$, $R^2_{adj} = 0,344$).

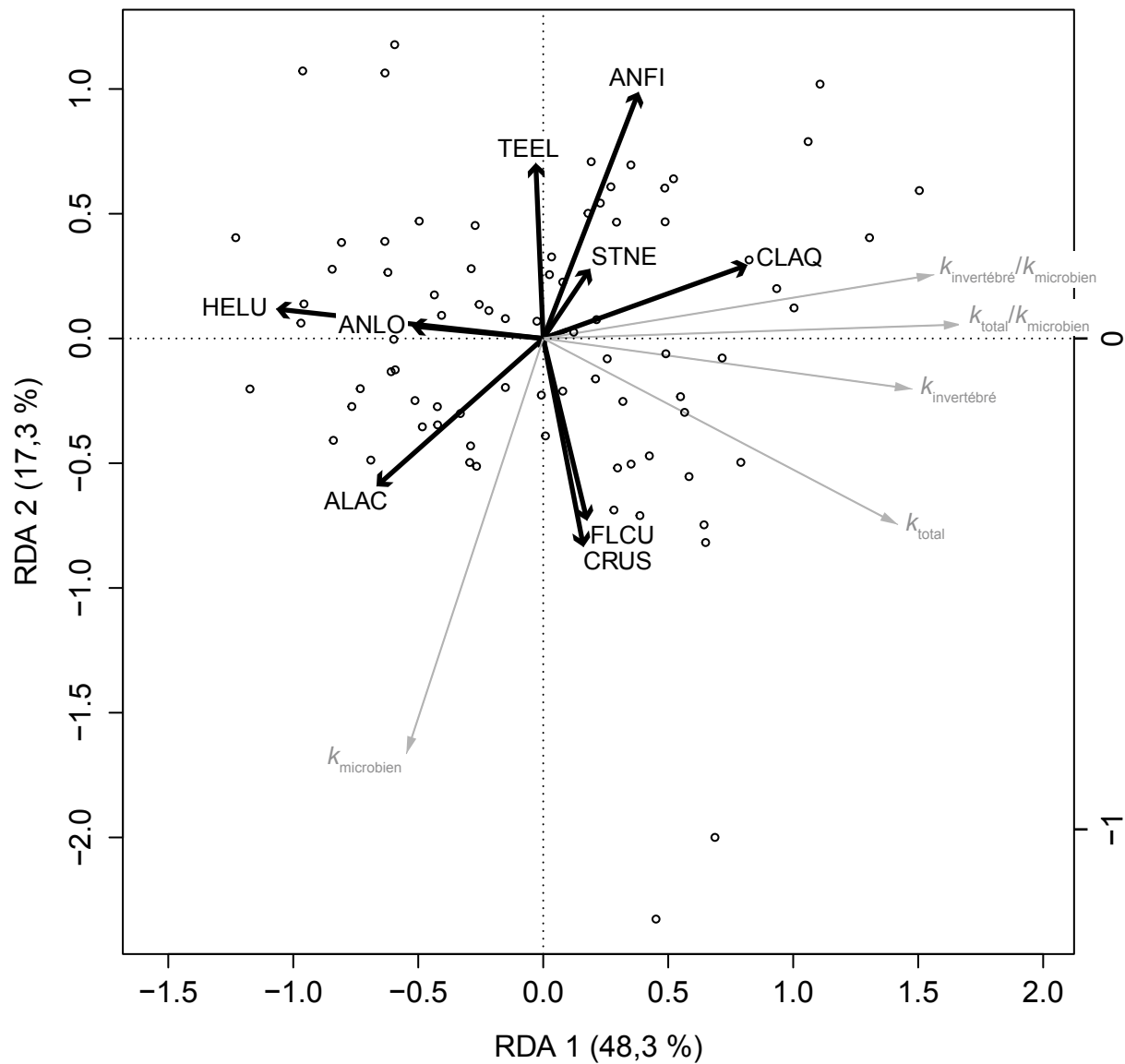


Figure S2 – Triplot des métriques de la décomposition (gris), des espèces d'hyphomycètes aquatiques (noir) pour les 84 sites d'étude. Le modèle est significatif ($F_{83,39} = 2,43$, $p < 0,001$, $R^2_{adj} = 0,395$).

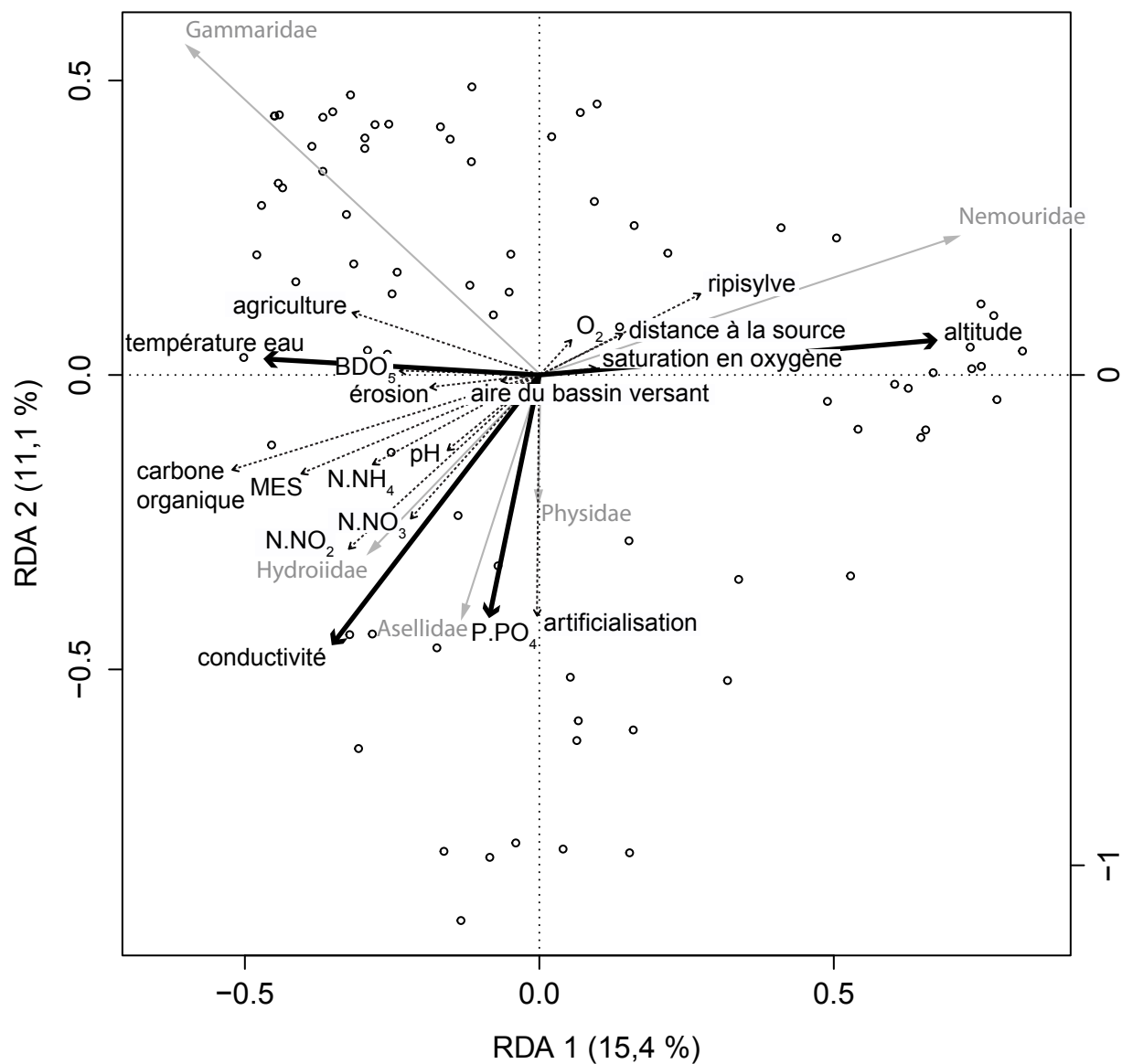


Figure S3 – Triplot des décomposeurs invertébrés (gris), des variables environnementales (noir) pour les 84 sites d'étude. Le modèle est significatif ($F_{83,15} = 2,23$, $p < 0,001$, $R^2_{\text{adj}} = 0,223$).

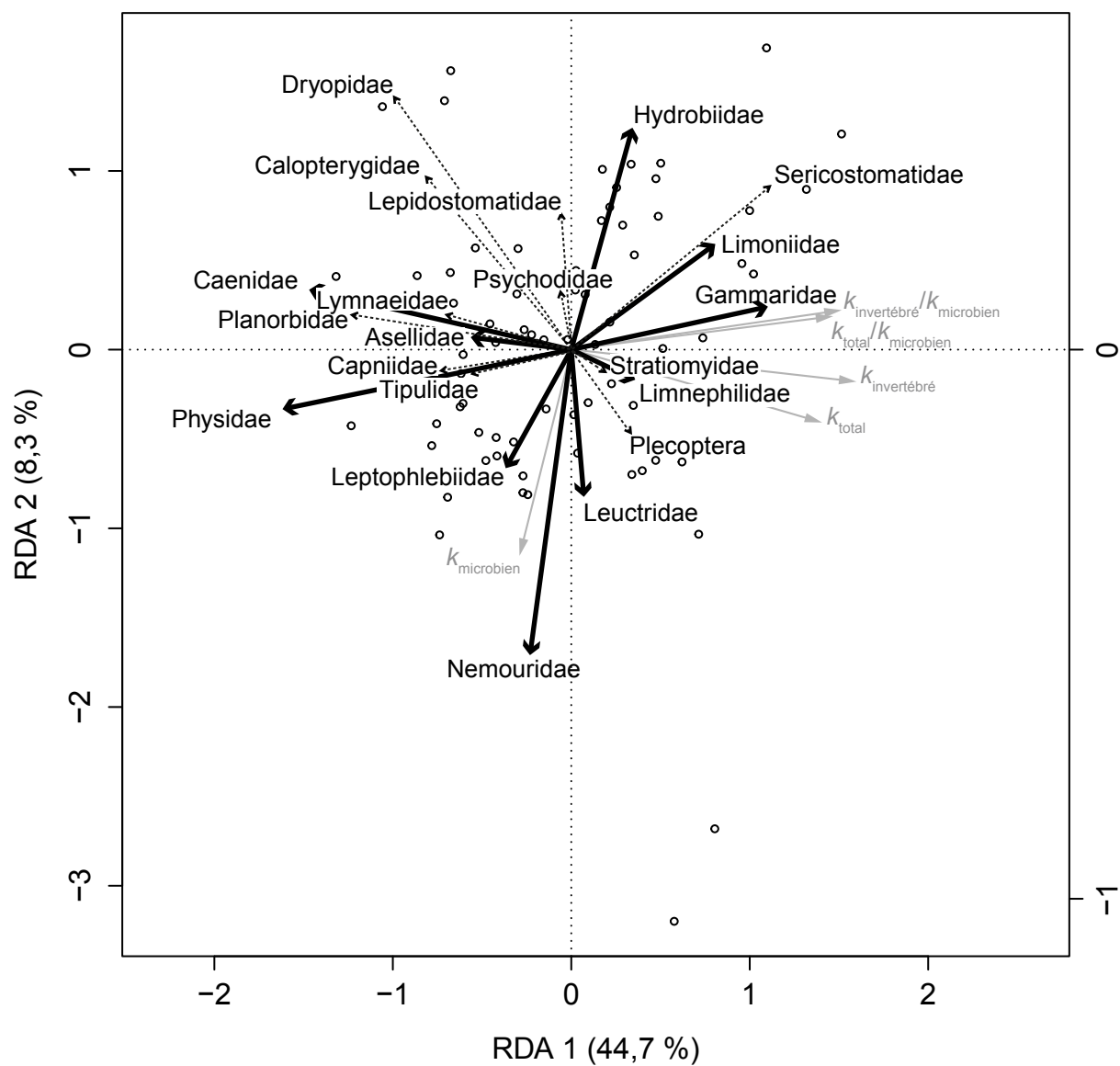


Figure S4 – Triplot des taux de décomposition (gris) et des invertébrés benthiques déterminés à la famille et retrouvés dans les sacs à grosse maille (noir) pour les 84 sites d'étude. Le modèle est significatif ($F_{83,20} = 4,0$, $p < 0,001$, $R^2_{adj} = 0,383$).

Chapitre 5 : Discussion générale et conclusions

L'objet central de cette thèse a été d'appliquer, sur les réseaux de suivi de l'Agence de l'Eau Adour Garonne, un protocole d'évaluation du fonctionnement des rivières de têtes de bassin (d'ordre 1 à 4) à partir de la décomposition des litières et d'analyser les potentialités de ce processus dans l'élaboration d'un indicateur d'évaluation de l'intégrité fonctionnelle. Les hypothèses formulées à la naissance de ce projet ont structuré ce travail en trois études connexes qui apportent chacune des éléments encourageants pour le développement d'un tel indicateur fonctionnel.

Bénéfices d'une évaluation fonctionnelle

A l'échelle régionale, sur l'un des bassins parmi les 110 que compte l'UE et en excluant les cours d'eau de haute montagne, le processus de décomposition dans le sud-ouest de la France semble répondre de manière sensible aux modifications anthropiques, ce qui fait de la décomposition des litières un très bon candidat pour l'évaluation de l'intégrité fonctionnelle. En réponse aux caractéristiques régionales, nous avons observé une forte amplitude du taux de décomposition totale et du ratio $k_{\text{invertébré}}/k_{\text{microbien}}$ (découplant l'activité des invertébrés de celle des micro-organismes) qui ont été choisis comme métriques pour rendre l'évaluation la plus intégrée possible. Le taux de décomposition totale informe sur la dynamique générale du processus par rapport à une référence (accélération vs. ralentissement), tandis que le ratio $k_{\text{invertébré}}/k_{\text{microbien}}$ permet de savoir quel compartiment de décomposeur oriente le plus le processus. Dans l'interprétation de la grille d'évaluation de la qualité fonctionnelle proposée, s'est posée la question du choix de la classe pour les sites n'ayant pas la même classe de qualité pour le taux de décomposition total et le ratio $k_{\text{invertébré}}/k_{\text{microbien}}$. Lorsqu'il y a une seule classe d'écart, nous avons choisi arbitrairement la classe la plus favorable quelle que soit la métrique, car à ce stade très en amont de développement d'un indicateur fonctionnel, nous ne disposons pas de connaissances suffisantes pour déterminer si l'une des deux métriques était plus importante que l'autre. Pour un écart de deux classes, nous avons fait le choix de prendre en compte la valeur intermédiaire. Au delà de deux classes, aucun choix n'a été fait et une expertise devrait être mise en place pour identifier la cause d'un tel écart. Deux scénarii sont possibles : (1) un taux de décomposition proche des valeurs de référence mais avec une contribution très déséquilibrée des deux compartiments, ou (2) un taux de décomposition très réduit ou fortement augmenté associé à une contribution équilibrée des décomposeurs invertébrés et microbien. Sur nos sites d'étude, le premier scénario, avec un processus de décomposition réalisé quasi-exclusivement par les détritivores, est représenté par 2 cours d'eau de faible

altitude et ayant un substrat majoritairement sableux ; le second scénario correspond à 3 rivières de milieu ouvert (prairies) présentant des optima habitationnels, nutritionnels et thermiques, favorisant l'activité des deux types de décomposeurs. La question se pose, pour de telles rivières aux marges de la grille d'évaluation, (1) d'une adaptation des valeurs seuils en lien avec la recherche de situations de référence adaptées, et (2) d'une évaluation complémentaire par d'autres métriques associées à la décomposition (abondance et activité des deux types de décomposeurs).

Les valeurs de référence utilisées pour l'évaluation fonctionnelle de nos 84 sites d'étude sont issues de la littérature, provenant de sites considérés comme des références et appartenant au même bassin hydrographique. Toutefois ces sites de référence sont localisés à plus haute altitude que la majorité de nos sites, qui correspondent essentiellement à des cours d'eau de plaine. Les taux de décomposition et les ratios $k_{\text{total}}/k_{\text{microbien}}$ sur ces sites de référence sont plus élevés, en raison d'une contribution plus importante des invertébrés sur des sites d'altitude plus faible, comparativement aux valeurs proposées par Gessner & Chauvet (2002), basées sur des cours d'eau de moyenne montagne. Par ailleurs, notre choix de limites de classe est similaire à la proposition de Gessner & Chauvet (2002) pour leur évaluation de l'écart à la référence, mais nous y avons ajouté deux classes supplémentaires pour répondre aux critères d'évaluation de la DCE (2000) c'est à dire, les classes de « très bon » et « mauvais » état. Ces limites de classes ont été également utilisées dans l'élaboration d'autres indicateurs (ex. Mondy et al., 2012). Si le présent travail confirme les potentialités d'utiliser la décomposition dans l'évaluation fonctionnelle, de prochains travaux devraient porter sur l'usage de valeurs de références et les limites de classes de qualité. Ceux-ci devraient s'inspirer soit de l'indication structurelle, qui est parvenue à définir une typologie d'utilisation des indicateurs à partir de valeurs existantes malgré la grande variabilité des écosystèmes lotiques (Birk et al., 2012, Feio et al., 2010), soit utiliser des valeurs de références modélisées (p. ex. avec la méthode de hindcasting, Hawkins et al., 2010) puisqu'il existe de nombreuses hydroécorégions où les activités anthropiques ont déjà largement modifié les écosystèmes lotiques conduisant à l'absence de sites de référence.

Le présent travail est la première tentative de comparaison des évaluations structurelles et fonctionnelles à une échelle régionale sur un grand nombre de sites. L'évaluation du statut écologique associé aux indicateurs structuraux n'a pas permis de dégager de correspondance directe avec les taux de décomposition. Les indicateurs structuraux se sont révélés moins sensibles au gradient d'eutrophisation ou d'occupation des sols que les indicateurs fonctionnels. De plus, depuis l'élaboration des indicateurs structuraux qui ont principalement ciblé la pollution organique, de nombreux efforts ont été réalisés pour limiter ce type de pollution (réglementation en terme de traitement des eaux), ce qui fait que cette pression tend à devenir obsolète de nos jours (Friberg et al., 2011), alors que d'autres perturbations plus importantes apparaissent et sont décelées par le processus de décomposition, telles que l'eutrophisation des cours d'eau et la dégradation des sols dans le cordon rivulaire.

Afin d'incorporer la composante fonctionnelle dans le protocole d'évaluation actuel, on peut imaginer coupler les évaluations biologiques structurelles et fonctionnelles dans une matrice (Fig. 20). Ce type de d'évaluation est plus exigeant que l'évaluation actuelle, puisqu'il n'y a qu'une possibilité de très bon état sur 25 possibilités, contre 1 classe sur 5 lorsque l'on s'intéresse soit uniquement à l'évaluation structurelle. Cependant il y a de fortes raisons de penser qu'une bonne qualité structurelle se traduise par une bonne qualité fonctionnelle. Un autre argument en faveur d'une évaluation matricielle est de permettre une gestion plus précise en terme d'objectifs de restauration pour parvenir un bon état des masses d'eau. En combinant l'évaluation fonctionnelle à l'évaluation structurelle avec les indicateurs invertébrés (IBGN) et diatomées (IBD) pour les 58 sites du chapitre 2, on observe que 35 % des sites suivis avec l'IBGN sont déclassés car n'atteignant plus le bon état et 44 % des sites sont déclassés avec l'IBD (cf. Fig. 9 et Fig. 21). De plus, aucun des sites suivis dans le chapitre 1 n'atteint le bon état avec l'indicateur fonctionnel tandis qu'un tiers atteignent le bon état à partir de l'IBGN et la moitié avec l'IBD.

Qualité fonctionnelle	Mauvais	Médiocre	Moyen	Bon	Très bon
	Mauvais	Médiocre	Moyen	Bon	Bon
	Mauvais	Médiocre	Moyen	Moyen	Moyen
	Mauvais	Médiocre	Médiocre	Médiocre	Médiocre
	Mauvais	Mauvais	Mauvais	Mauvais	Mauvais
Qualité structurelle					

Figure 20 – Proposition d'évaluation matricielle du statut écologique à partir des composantes structurelles et fonctionnelles.

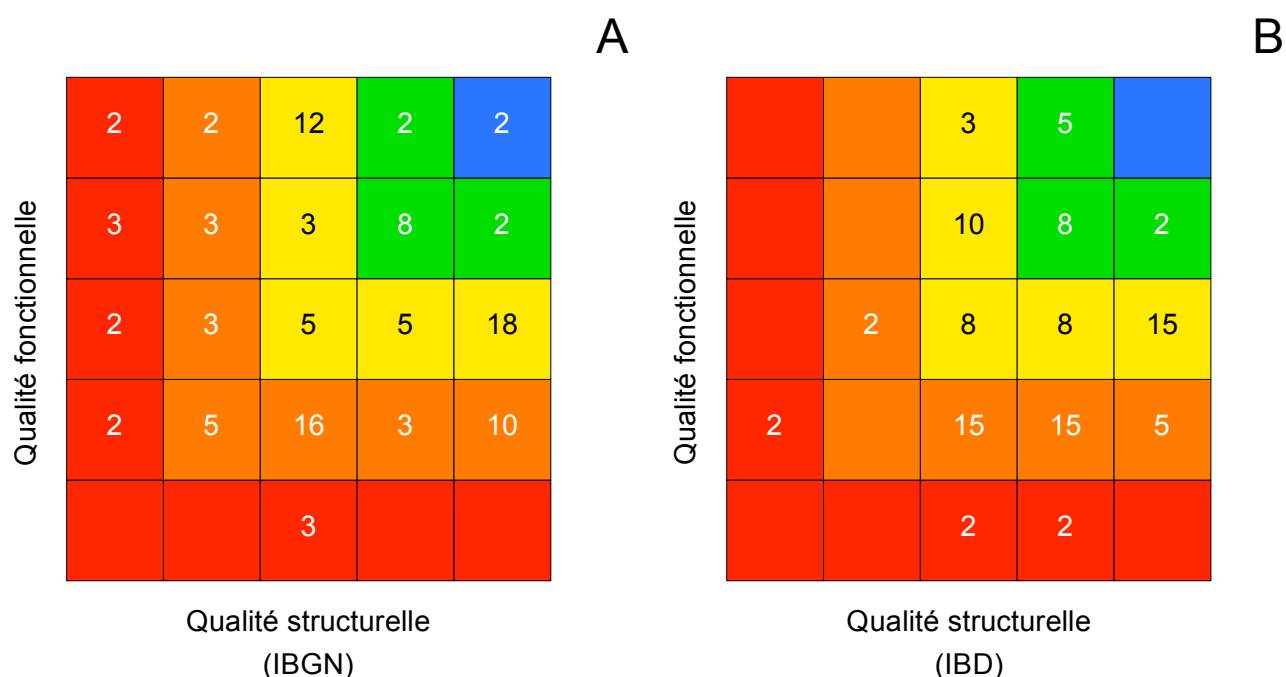


Figure 21 – Evaluation matricielle du statut écologique à partir de la composante structurelle IBGN (graphique A) et IBD (graphique B) et de la composante fonctionnelle à partir des 58 sites étudiés dans la chapitre 2. Le nombre de site par classe est exprimé en pourcentage.

Quantification du temps de réalisation

En plus d'être simple, l'indicateur fonctionnel idéal se doit également d'être le moins onéreux possible pour qu'il puisse être employé en routine sur un maximum de sites des réseaux de bio-surveillance. Pour cette raison, l'utilisation des litières de feuilles a été fortement critiquée en raison du temps requis pour appliquer l'ensemble du protocole depuis la collecte des feuilles, la fabrication des sacs jusqu'au broyage et à la pesée. Des substrats alternatifs ont été utilisés tels les bâtonnets en bois de peuplier non traité (« tongue depressors » en anglais) et la toile à tableau en coton non traité (Tiegs et al., 2007). Ces deux substrats présentent comme avantage d'avoir une composition chimique stable, un faible prix d'achat et sont facilement à disposition. En comparant la mise en œuvre d'un suivi de la décomposition avec des bâtonnets de bois à celle menée avec des litières de feuilles, Arroita et al. (2012) on constaté un gain de temps jusqu'à 10 supérieur, faisant des bâtonnets de bois un outil de bioindication prometteur. Néanmoins nous pensons que la méthode des sacs à litières n'est pas forcément aussi couteuse en temps que ce que suggèrent les chiffres présentés. Le tableau ci-dessous (Tab. 12) répertorie le temps alloué à chaque étape du processus en comptant les temps de préparation, de déplacement, d'organisation et d'analyse, avec une comparaison des estimations publiées par Arroita et al. (2012) et nos propres évaluations basées sur deux campagnes et près d'une centaine de sites. Ainsi lorsque cette méthode est employée sur un grand nombre de sites certaines tâches

deviennent beaucoup plus rentables en terme de temps alloué (économie d'échelle), notamment pour les temps de collecte des feuilles (division du temps par 13) et de préparation des sacs à litières (division du temps par 10). Au total, un peu plus de 500 heures de travail sont nécessaires pour obtenir une indication de la décomposition sur une centaine de sites (Tab. 12), soit environ 5 heures par site, le temps nécessaire atteignant plus de 2000 heures si l'on souhaite intégrer les paramètres d'abondance, diversité et activité des décomposeurs fongiques et invertébrés. Il est important de relever que, pour l'instant, seuls les paramètres de la décomposition font l'objet d'une grille de valeurs-seuils et de classes de qualité. Par ailleurs, une certaine marge existe dans l'allocation du temps aux différentes tâches et dans le coût des consommables nécessaires. Ainsi, pour les études réalisées dans le cadre de la présente thèse, les sacs à fines mailles ont été fabriqués par un industriel, ce qui représente un gain de temps mais un coût supplémentaire. De plus ces sacs sont réutilisables d'une année sur l'autre, bien qu'ils aient tendance à s'user assez rapidement du fait que la couture utilisée pour fermer les sacs abîme les mailles.

Tableau 12 – Temps (en heure) nécessaire au suivi du processus de décomposition et à une évaluation complète sur 100 sites à partir de 6 répliques, composées chacune d'un sac à grosses mailles (GM) et d'un sac à fines mailles, relevées à une seule date (cf. Présent étude de thèse), comparé à celui correspondant à 7 dates de relevé et 5 répliques uniquement composées d'un sac GM, soit 35 sacs par site (Arroita et al., 2012 ; Table 3). Les évaluations ont été déterminées au niveau d'un site dans chacune des deux études, sauf pour la récolte des litières de la présente étude (100 sites). Selon les études, le nombre de répliques pour les analyses biologiques est 4 (*) ou 5 (**).

	Présente étude			Arroita et al. (2012)		
	Par site (12 échantillons)	Par échantillon	Pour 100 sites (1200 échantillons)	Par site (35 échantillons)	Par échantillon	Pour 100 sites (3500 échantillons)
Récolte des litières	0,26	0,02	26	10	0,29	350
Pose de 5 filets récepteurs			5			
Ramassage (4 passages)			3			
Trajet automobile (5 AR)			15			
Manipulation pour séchage			3			
Préparation logistique	0,12	0,01	12			
Préparation des échantillons	1,75	0,15	175	18	0,51	1800
Fabrication des sacs GM	0,5					
Pesée	0,5					
Ensachage	0,75					
Traitement de la décomposition	3,25	0,27	325	12	0,34	1200
Installation in situ	0,5					
Relevé in situ	0,5					
Rinçage	0,75					
Pesée de la masse sèche	0,5					
Broyage	0,5					
Pesées avant et après combustion	0,5					
Traitement des champignons	8*	2*	800*	12**	0,34**	1200**
Détermination du taux de sporulation	4*			6**		
Détermination de la biomasse (HPLC)	4*			6**		
Tri et détermination des invertébrés	8*	2*	800*	27**	0,77**	2700**
Total (décomposition)	5,38		538	35		3500
Total (évaluation complète)	21,38		2138	74		7400

En résumé, il est incontestable que les approches alternatives proposées récemment (bandes de coton, bâtonnets de bois) présentent des avantages, notamment en termes de standardisation et de gain de coût et de temps. Toutefois, il apparaît que l'investissement

dans la méthode des sacs à litière reste très raisonnable lorsqu'on considère les coûts et temps associés en situation concrète, i.e. typiquement les campagnes de routine des services de l'eau et des bureaux d'étude en charge du réseau de surveillance de la qualité des eaux.

Optimisation du protocole d'application

Si l'on envisage un déploiement en réseau, une standardisation est toutefois indispensable si l'on veut limiter la variabilité des mesures. L'application d'une méthodologie sur les procédures et métriques est, à l'heure actuelle, basée sur quelques protocoles disponibles (Graça et al., 2005). Une perspective à court terme est ainsi de rédiger un ensemble de protocoles précis, permettant une large diffusion et une appropriation par les techniciens en charge du suivi de la qualité des eaux. Une étape importante est également la formation des personnels concernés. De telles activités semblent désormais tout à fait envisageables, car la demande des personnels en termes d'indicateur intégratif de la qualité fonctionnelle des écosystèmes est aujourd'hui très forte. L'Onema (Office national sur l'Eau et les Milieux Aquatiques, intégré aujourd'hui dans l'Agence Française de la Biodiversité) est fortement engagé dans le développement d'indicateurs fonctionnels de la qualité des eaux continentales. Des collectivités de plus en plus nombreuses soutiennent de telles approches au plan national (Chauvet et al., 2016), traduction d'une politique affichée au plan européen. Il est donc temps de concrétiser cette nouvelle évaluation fonctionnelle des milieux aquatiques, en la rendant opérationnelle sur un maximum de sites. Le bénéfice en retour serait de disposer de grandes bases de données dont l'exploitation permettrait d'affiner encore les métriques et seuils de qualité.

Toutefois, il est important de considérer certains éléments du processus de décomposition qui peuvent avoir leur importance pour les gestionnaires, à la fois en terme de temps et de coûts.

- Expression des taux de décomposition

Les taux de décomposition ont été calculés soit en fonction de la durée d'exposition exprimée en jour (chapitre 1) soit à partir de la somme thermique exprimée en degré-jour (c.à.d. la somme des moyennes journalières de la température durant la durée de l'exposition ; chapitres 2 et 3). La question se pose de l'utilité d'une correction par la somme thermique dans une étude régionale, à fortiori dans une démarche d'évaluation de la qualité fonctionnelle, car de multiples altérations d'origine anthropique peuvent conduire à un réchauffement de l'eau qu'une évaluation en degré-jour tendrait à corriger (Young & Collier, 2009). En effet, il a été observé que la décomposition exprimée en degré-jour était plus rapide pour la décomposition par les invertébrés dans des rivières ayant une température élevée et, contre toute attente, plus lente pour la décomposition microbienne dans ces

mêmes rivières (cf. chapitre 2 et 3). Or ce phénomène n'est plus observé si l'on exprime la décomposition microbienne en fonction du temps d'exposition. Ceci semble simplement résulter de la très forte activité des champignons à basse température, comme cela a été démontré expérimentalement pour les hyphomycètes aquatiques, qui présentent un Q_{10} très élevé dans une gamme de température allant de 1 à 10 °C (Dang et al., 2009). La température est un facteur essentiel de variation des activités métaboliques et par extension des processus écosystémiques. Il est généralement admis que les activités augmentent linéairement (degré-jour) ou exponentiellement (p.ex. : le modèle d'Arrhénius) à mesure que la température augmente (Davidson & Janssens, 2006; Davidson et al., 2006). La somme thermique, exprimée en degré-jour permet donc de s'affranchir de l'effet de la température afin de comparer directement l'activité de décomposition en des sites ayant différents régimes thermiques, comme dans le cas d'études inter-biomes (p. ex. : Irons et al., 1994, Boyero et al., 2016) ou inter-écorégions (p.ex. : Woodward et al., 2012).

Les changements dans les températures moyennes et le degré d'oscillations de température journalière affectent les communautés d'invertébrés (Piggott et al., 2015) et d'hyphomycètes aquatiques ainsi que les taux de décomposition de la litière associés (Dang et al., 2009). Par conséquent le suivi de la température dans les cours d'eau lors du suivi de la décomposition est une information précieuse, notamment en raison de la pollution thermique, des aménagements hydroélectriques et de la probable intensification de ces changements avec le réchauffement climatique (Céréghino et Lavandier, 1998; Isaak et al., 2012).

- Expression de la masse restante de litière

Une étape coûteuse en temps et en argent est de considérer le taux de décomposition à partir de la masse de matière organique (combustion à 550 °C) plutôt que la masse sèche (séchage jusqu'à masse constante) des litières. La masse de matière organique dans les feuilles d'aulne utilisées pour ces travaux est de 93 %. Lorsque les feuilles exposées dans les rivières sont collectées, il est fréquent qu'elles soient recouvertes d'une couche de sédiments fins qui est en partie retirée lors de l'étape de rinçage des feuilles. Cependant certaines particules sont intimement liées aux feuilles et ne peuvent pas être retirées. L'étape de combustion est un moyen de contourner. L'accumulation de sédiment (dont le contenu organique est généralement inférieur à 10%) n'est pas négligeable puisque la matière organique constitue entre 55 et 93 % de la masse des litières dans les sacs à fines mailles et entre 38 et 99 % dans les sacs à grosses mailles au moment de la collecte. Sur un faible nombre de répliques, on peut observer une masse organique plus élevée que la valeur initiale, indice du développement d'un matériel biologique autre que les litières tel les biofilm composés de mycélium fongiques, bactéries, algues, exoenzymes et particules minérales (Golladay & Sinsabaugh, 1991). De ce fait, l'expression des taux de décomposition en fonction de la masse de matière organique s'avère être la plus pertinente.

- Prise en compte de la variabilité naturelle des taux de décomposition

La variabilité des taux de décomposition est un autre point important à considérer lorsqu'il s'agit d'évaluer l'impact anthropique. Cette variation peut être divisée en deux sources (Chauvet et al., 2016). Une source extrinsèque au protocole de suivi de la décomposition est due aux conditions environnementales, incluant la température, les nutriments dissous et le pH de l'eau, qui va influencer l'activité des communautés de décomposeurs. La variabilité induite par le protocole est la source d'une variabilité intrinsèque, induite notamment par le choix de la litière, la période d'exposition, le nombre de réplique et leur localisation dans le site.

Les espèces de feuilles sont connues pour avoir des taux de décomposition différents (Webster & Benfield, 1986). Dans le protocole proposé, une seule espèce de feuille a été choisie, *Alnus glutinosa*, car c'est une espèce à grande aire de distribution (Prat et al., 1992), qui peut permettre une transposition sur l'ensemble de cette aire (Woodward et al., 2012). Outre le temps épargné lorsque l'on récolte les feuilles d'une seule espèce végétale, de précédentes études ont permis de déceler qu'au-delà de l'espèce végétale, ce sont les traits fonctionnels des feuilles qui influencent les processus écosystémiques (Lavorel & Garnier 2002, Westoby & Wright 2006, Violle et al., 2007), tels que la décomposition de la matière organique par les communautés de décomposeurs. Les feuilles ayant une teneur élevée en nutriments et une faible concentration en composés réfractaires (polyphénols et lignine) sont consommées plus rapidement (Gessner & Chauvet 1994, Lecerf et al., 2007, Lecerf & Chauvet 2008a). La variabilité foliaire intraspécifique d'*Alnus glutinosa* a été évaluée par Lecerf & Chauvet (2008a) en tenant compte de la localisation géographique des arbres (variation de la longitude $\leq$ à 17°N), le moment de la chute des feuilles (chute précoce versus chute tardive), la couleur des feuilles (vertes versus brunes), l'année de la récolte, et le positionnement de l'arbre dans la plaine alluviale (berge versus plaine alluviale). Tous ces paramètres induisent une variabilité des traits foliaires dont le contenu en phosphore et lignine expliquent jusqu'à 84% de la variation de masse restante dans les sacs à grosses mailles. Cette variation de masse restante est comparable à la variabilité interspécifique obtenue en mettant à décomposer des feuilles de 7 (Gessner & Chauvet 1994) à 10 essences végétales (Lecerf et al., 2007). Il semble donc judicieux de considérer attentivement l'étape de la collecte feuilles pour limiter certains facteurs de variabilité contrôlables tels que le lieu de collecte ou la fenêtre temporelle de la période de récolte. La variabilité temporelle induite par des collections d'années différentes, si l'on envisage un suivi pluriannuel, ou bien la variabilité spatiale induite par la position à l'échelle régionale du lieu de collecte, si l'on envisage un déploiement national ou européen, nécessitent une correction des valeurs de perte de masse limitant l'influence de la variabilité des traits foliaires et autorisant une comparaison des résultats entre eux. Lecerf et Chauvet (2008a) ont proposé une première équation concernant la correction les litières d'aulne (% de masse restante = $-229 \times [P] + 3.0 \times [\text{lignine}]$) qui permettrait de standardiser *a posteriori* les litières employées dans ce genre de déploiement.

Une variabilité du taux de décomposition intra-site a par ailleurs été mise en évidence sur nos stations. Il s'agit de la différence entre les 6 blocs échantillonnés, liée à l'hétérogénéité spatiale des caractéristiques abiotiques (p. ex., vitesse du courant, qualité du/colmatage par le substrat, concentration en oxygène dissous) mais aussi biotiques (p. ex., identité et densité des invertébrés détritivores présents localement). Pour réduire cette variabilité, une tentation évidente serait de réaliser un choix plus strict des blocs, p.ex. basé sur des mesures (vitesse du courant) ou envisager de supprimer un ou deux 'outliers' par site lorsque ceux-ci sont trop éloignés de la moyenne, représentant un écart trop important aux conditions moyennes. Le tableau ci-dessous présente la variabilité entre les répliques d'un même site, exprimé avec le coefficient de variation (CV) (Tab. 13). C'est le taux de décomposition microbien moyen qui présente le moins de variation, tandis que le ratio $k_{\text{invertébré}}/k_{\text{microbien}}$ est le plus variable. En supprimant 1 à 2 valeurs aberrantes par sites dans les sites où le CV dépasse 50%, on observe une nette amélioration, car certaines valeurs étaient jusqu'à 5 fois plus élevée que les autres répliques. Le fait d'avoir retiré les valeurs aberrantes pour k_{total} a fortement réduit la variabilité du ratio $k_{\text{total}}/k_{\text{microbien}}$ mais pas du taux du décomposition invertébré moyen ni du ratio $k_{\text{invertébré}}/k_{\text{microbien}}$ (Tab. 13). Toutefois cette proposition réduirait la représentativité du processus à l'échelle stationnelle et, dans les cas extrêmes, conduirait à ne pas détecter certaines perturbations, telles que les altérations hydrauliques (p. ex. lentification).

Tableau 13 – Statistiques descriptives des taux de décomposition moyen et des ratios avant (a) et après suppression des valeurs aberrantes (b).

(a)	k_{total}	$k_{\text{microbien}}$	$k_{\text{invertébré}}$	$k_{\text{total}}/k_{\text{microbien}}$	$k_{\text{invertébré}}/k_{\text{microbien}}$
minimum	7,2	4,3	7,0	1,7	9,5
médiane	32,0	14,4	52,2	34,1	62,1
maximum	108,3	59,2	211,0	157,5	218,0
moyenne	37,3	17,9	65,5	40,5	73,6
écart-type	22,8	11,3	45,5	24,2	45,3
nb site (%) avec CV > 50%	26,5	2,4	54,2	31,3	63,9
(b) après suppression des valeurs aberrantes					
	k_{total}	$k_{\text{microbien}}$	$k_{\text{invertébré}}$	$k_{\text{total}}/k_{\text{microbien}}$	$k_{\text{invertébré}}/k_{\text{microbien}}$
minimum	3,7	3,5	6,3	1,7	8,0
médiane	24,4	13,4	47,1	27,0	53,9
maximum	58,5	59,2	211,0	69,5	218,0
moyenne	26,1	17,0	57,7	29,8	66,1
écart-type	12,3	11,4	42,7	14,4	43,0
nb site (%) avec CV > 50%	1,2	1,2	45,8	11,0	57,3

Conclusions

S'appuyant sur un large jeu de données, nos travaux confortent le bien-fondé de l'utilisation de la décomposition des litières comme indicateur de la santé fonctionnelle des écosystèmes

de rivière, telle que documentée dans quelques études pionnières. Ils démontrent surtout la faisabilité d'une telle approche à l'échelle régionale, en conditions réelles de suivi de sites existants au sein des réseaux de surveillance. Notre étude a été volontairement restreinte aux cours de dimension faible à moyenne (ordre 1 à 4), du fait de l'importance avérée du processus pour les rivières de têtes de bassin. Il serait toutefois intéressant d'étendre cette application aux rivières plus grandes (≥ 5), dans la mesure où (1) celles-ci concentrent souvent des formes et degrés divers d'altération liées aux activités humaines en rapport avec l'usage de l'eau, et (2) les résultats de recherches fondamentales indiquent que la litière végétale peut représenter une ressource non négligeable dans les fleuves. Dans le cadre d'une telle extension aux grandes rivières, il y aurait sans doute lieu d'examiner dans quelle mesure les métriques de la décomposition répondent de façon similaire à ce qui est observé plus en amont, puisque la composition des communautés de décomposeurs diffère entre l'amont et l'aval des réseaux, ce qui pourrait donner lieu à une adaptation des grilles d'évaluation. Au final, l'avantage serait de pouvoir disposer d'un outil fonctionnel unique et universel, adapté à l'ensemble des réseaux hydrographiques. Dans la même logique, il conviendrait de valider l'intérêt d'une approche par hydro-écorégions, telle qu'évoquée dans cette thèse.

L'une des perspectives de ce travail est de poursuivre le développement de la bioindication de la qualité fonctionnelle des écosystèmes au sein du département de recherche et développement d'Asconit-Consultants, en partenariat avec les chercheurs des centres de recherches nationaux. Le projet le plus abouti consiste à transposer le protocole utilisé dans cette thèse afin de tester sa pertinence dans les écosystèmes aquatiques insulaires. En effet, dans les cours d'eaux tropicaux, les impacts des pesticides, notamment du chlordécone utilisé pour lutter contre le charançon du bananier, ne sont pas détectés en s'appuyant sur l'évaluation de l'écosystème via la structure des communautés. Aussi il est urgent de trouver des indicateurs pertinents, tel que ceux évaluant les fonctions des écosystèmes aquatiques. Les écosystèmes aquatiques tropicaux insulaires se caractérisent par un recouvrement important de la canopée se traduisant par une forte dépendance des communautés aquatiques et du fonctionnement de ces écosystèmes vis à vis des apports de litières végétales terrestres au milieu aquatique se déroulant plus ou moins tout au long de l'année (Boyero et al., 2009). L'activité détritique tient ainsi une place essentielle, réalisée par de nombreux groupes taxonomiques – depuis les microorganismes jusqu'aux poissons – ce qui en fait un processus central et dont la perturbation a potentiellement des conséquences sur les communautés impliquées et le réseau trophique associé et sur les flux de matière et d'énergie qui en découlent. Ainsi, l'influence de certaines caractéristiques (p.ex., la saisonnalité peu marquée des apports de litière ou l'identité de l'espèce de litière à utiliser) nécessitent d'être approfondies afin d'adapter le protocole, aujourd'hui plutôt conçu pour une application aux rivières de régions tempérées.

Bibliographie

- Abelho, M. (2001) From litterfall to breakdown in streams: a review. *The Scientific World Journal*, **1**, 656–80.
- AFNOR (2004) Qualité de l'eau – Détermination de l'indice biologique global normalisé (IBGN). NF T90-350.
- AFNOR (2007) Qualité de l'eau : détermination de l'indice biologique diatomées (IBD. NF T90-354 (2000), révision 2007.
- AFNOR (2009) Qualité de l'eau – Prélèvement des macro-invertébrés aquatiques en rivières peu profondes. XP T90-333.
- AFNOR (2010) Qualité de l'eau – Traitement au laboratoire d'échantillons contenant des macro-invertébrés de cours d'eau. XP T90-388.
- Agence de l'Eau Adour-Garonne (2015) Qualité des eaux et produits phytosanitaires sur le bassin Adour Garonne – situation 2013-2014.
- Alexander, A.C., Culp, J.M., Liber, K. & Cessna, A.J. (2007) Effects of insecticide exposure on feeding inhibition in mayflies and oligochaetes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **26**, 1726–1732.
- Allan, J.D. & Castillo M.M. (2009) Stream ecology : structure and function of running waters. *Dordrecht, Springer*, 2nd edition.
- Allan, J.D., Erickson, D.L. & Fay, J. (1997) The influence of catchment land use on stream integrity across multiple spatial scales. *Freshwater Biology*, **37**, 149–161.
- Allan, J.D. (2004) Landscapes and riverscapes: the influence of land use on stream ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **35**, 257–284.
- Andrén, C. & Jarlman, A. (2008) Benthic diatoms as indicators of acidity in streams. *Fundamental and Applied Limnology*, **173**, 237–253.
- Armitage, P.D., Moss, D., Wright, J.F. & Furse, M.T. (1983) The performance of a new biological water quality score system based on macroinvertebrates over a range of unpolluted running water sites. *Water Research*, **17**, 333–347.
- Arrêté du 27 juillet 2015 modifiant l'arrêté du 25 janvier 2010 relatif aux méthodes et critères d'évaluation de l'état écologique, de l'état chimique et du potentiel écologique des eaux de

surface pris en application des articles R. 212-10, R. 212-11 et R. 212-18 du code de l'environnement. *Journal officiel de la République française*, n°0198 du 28 août 2015.

- Arroita, M., Aristi, I., Flores, L., Larrañaga, A., Díez, J., Mora, J., Romaní, A.M. & Elosegí, A. (2012) The use of wooden sticks to assess stream ecosystem functioning: Comparison with leaf breakdown rates. *Science of the Total Environment*, **440**, 115–122.
- Artigas, J., Majerholc, J., Foulquier, A., Margoum, C., Volat, B., Neyra, M. & Pesce, S. (2012) Effects of the fungicide tebuconazole on microbial capacities for litter breakdown in streams. *Aquatic Toxicology*, **122-123**, 197–205.
- Backhaus, T. & Faust, M. (2012) Predictive Environmental Risk Assessment of Chemical Mixtures: A Conceptual Framework. *Environmental Science and Technology*, **46**, 2564–2573.
- Baldy, V., Gobert, V., Guérol, F., Chauvet, E., Lambrigot, D. & Charcosset, J.-Y. (2007) Leaf litter breakdown budgets in streams of various trophic status: effects of dissolved inorganic nutrients on microorganisms and invertebrates. *Freshwater Biology*, **52**, 1322–1335.
- Bärlocher, F. (1980) Leaf-eating invertebrates as competitors of aquatic hyphomycetes. *Oecologia*, **47**, 303–306.
- Bärlocher, F. (1985) The role of fungi in the nutrition of stream invertebrates. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **91**, 83–94.
- Bärlocher, F. (2005) Leaf mass loss estimated by litter bag technique. *Methods to Study Litter Decomposition* (eds. M.A.S. Graça, F. Bärlocher & M.O. Gessner), pp. 189–195. Springer-Verlag, Dordrecht, The Netherlands.
- Bärlocher, F. (2009) Reproduction and dispersal in aquatic hyphomycetes. *Mycoscience*, **50**, 3–8.
- Bärlocher, F. & Kendrick, B. (1976) *Hyphomycetes as intermediaries of energy flow in streams*. In: Recent Advances in Aquatic Mycology (ed. Jones, E.B.J.), Elek Science, London, 435–446.
- Battarbee, R.W., Turner, S., Yang, H., Rose, N.L., Smyntek, P.M., Reimer, P.J., Oldfield, F., Jones, V.J., Flower, R.J., Roe, K., Shilland, E. & Blaauw, M. (2015) Air pollutant contamination and acidification of surface waters in the North York Moors, UK: Multi-proxy evidence from the sediments of a moorland pool. *The Holocene*, **25**, 226–237.
- Beketov, M.A., Foit, K., Schäfer, R.B., Schriever, C.A., Sacchi, A., Capri, E., Biggs, J., Wells, C. & Liess, M. (2009) SPEAR indicates pesticide effects in streams - Comparative use of species- and family-level biomonitoring data. *Environmental Pollution*, **157**, 1841–1848.

- Beketov, M.A., Kefford, B.J., Schäfer, R.B. & Liess, M. (2013) Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 11039–11043.
- Benfield, E.F. (1997) Comparison of litterfall input to streams. *Journal of the North American Benthological Society*, **16**, 104–108.
- Bergknut, M., Laudon, H., Jansson, S., Larsson, A., Gocht, T. & Wiberg, K. (2011) Atmospheric deposition, retention, and stream export of dioxins and PCBs in a pristine boreal catchment. *Environmental Pollution*, **159**, 1592–1598.
- Bermingham, S., Fisher, P., Martin, A., Marriott, M. & Lappin-Scott, H. (1998) The Effect of the Herbicide Mecoprop on *Heliscus lugdunensis* and Its Influence on the Preferential Feeding of *Gammarus Pseudolimnaeus*. *Microbial ecology*, **35**, 199–204.
- Birk S., Bonne W., Borja A., Brucet S., Courrat A., Poikane S., Solimini, A., Van de Bund, W., Zampoukas, N. & Hering, D. (2012) Three hundred ways to assess Europe's surface waters: an almost complete overview of biological methods to implement the water framework directive. *Ecological Indicators*, **18**, 31–41.
- Blanco, S. & Becares, E. (2007) Comparison of biotic indices for water quality diagnosis in the Duero Basin (Spain). *Large Rivers*, **17**, 267–286.
- Blandin, P. (1986) Bioindicateurs et diagnostic des systèmes écologiques. *Bulletin d'écologie*, **17**, 215–307.
- Bonada, N., Prat, N., Resh, V.H. & Statzner, B. (2006) Developments in aquatic insect biomonitoring: a comparative analysis of recent approaches. *Annual review of entomology*, **51**, 495–523.
- Borcard, D., Gillet, F. & Legendre, P. (2011) *Numerical Ecology with R*. Springer New York Dordrecht London Heidelberg.
- Boyero, L., Pearson, R.G., Dudgeon, D., Graça, M.A.S., Gessner, M.O., Albariño, R.J., Ferreira, V., Yule, C.M., Boulton, A.J., Arunachalam, M., Callisto, M., Chauvet, E., Ramírez, A., Chará, J., Moretti M.S., Gonçalves, J.F., Helson, J.E., Chará Serna, A.M., Encalada, A.C., Davies, J.N., Lamothe, S., Cornejo, A., Li, A.O.Y., Buria, L.M., Villanueva, V.D., Zúñiga, C. & Pringle, C.M. (2011) Global distribution of a key trophic guild contrasts with common latitudinal diversity patterns. *Ecology*, **92**, 1839–1848.
- Boyero, L., Pearson, R.G., Hui, C., Gessner, M.O., Alexandrou, M.A., Grac, M.A.S., Pérez, J., Alexandrou, M.A., Graça, M.A.S., Cardinale, B.J., Albariño, R.J., Arunachalam, M., Barmuta, L.A., Boulton, A.J., Bruder, A., Callisto, M., Chauvet, E., Death, R.G., Dudgeon, D., Encalada, A.C., Ferreira, V., Figueroa, R., Flecker, A.S., Gonçalves, J.F., Helson, J.E., Iwata, T., Jinggut,

- T., Mathooko, J.M., Mathuriau, C., M'Erimba, C., Moretti, M.S., Pringle, C.M., Ramírez, A., Ratnarajah, L., Rincon, J. & Yule, C.M. (2016) Biotic and abiotic variables influencing plant litter breakdown in streams: a global study. *Proceedings of the Royal Society*, **283**: 20152664. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2015.2664>.
- Boyero, L., Ramírez, A., Dudgeon, D. & Pearson, R.G. (2009) Are tropical streams really different? *Journal of North American Benthological Society*, **28**, 397–403.
- Brock, T.C., Arts, G.H., Maltby, L. & Van den Brink, P.J. (2006) Aquatic risks of pesticides, ecological protection goals, and common aims in European Union legislation. *Integrated Environmental Assessment and Management*, **2**, 20–46.
- Brosed, M., Lamothe, S. & Chauvet, E. (2016) Litter breakdown for ecosystem integrity assessment also applies to streams affected by pesticides. *Hydrobiologia*, **77**, 87–102.
- Bruder, A., Salis, R.K., McHugh, N.J. & Matthaei, C.D. (2015) Multiple-stressor effects on leaf litter decomposition and fungal decomposers in agricultural streams contrast between litter species. *Functional Ecology*, **30**, 1257–1266.
- Bruder, A., Schindler, M.H., Moretti, M.S. & Gessner, M.O. (2014) Litter decomposition in a temperate and a tropical stream: the effects of species mixing, litter quality and shredders. *Freshwater Biology*, **59**, 438–449.
- Bundschuh, M., Zubrod J.P., Klemm P., Elsaesser D., Stang C. & Schulz R. (2013). Effects of peak exposure scenarios on *Gammarus fossarum* using field relevant pesticide mixtures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **95**, 137–143.
- Bunn, S.E. & Davies, P.M. (2000) Biological processes in running waters and their implications for the assessment of ecological integrity. *Hydrobiologia*, **422/423**, 61–70.
- Bunzel, K., Liess, M. & Kattwinkel, M. (2014) Landscape parameters driving aquatic pesticide exposure and effects. *Environmental Pollution*, **186**, 90–97.
- Camargo, J.A. & Alonso, Á. (2006) Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment International*, **32**, 831–849.
- Carson, R. (1962) *Silent Spring*. Boston, Houghton Mifflin Company.
- Céréghino, R., Giraudel, J.L. & Compin, A. (2001) Spatial analysis of stream invertebrates distribution in the Adour-Garonne drainage basin (France), using Kohonen self organizing maps. *Ecological Modelling*, **146**, 167–180.
- Céréghino, R. & Lavandier, P. (1998) Influence of hypolimnetic hydropeaking on the distribution and population dynamics of ephemeroptera in a mountain stream. *Freshwater Biology*, **40**, 385–399.

- Chandrashekar, K.R. & Kaveriappa, K.M. (1989) Effect of pesticides on the growth of aquatic hyphomycetes. *Toxicology letters*, **48**, 311–315.
- Chauvet, E. (1990) Hyphomycètes aquatiques du sud-ouest de la France. *Gaussenia*, **6**, 3–31.
- Chauvet, E. & Jean-Louis, A.-M. (1988) Production de litière de la ripisylve de la Garonne et apport au fleuve. *Acta Oecologica*, **9**, 65–279.
- Chauvet, E., Ferreira, V., Giller, P.S., Mckie, B.G., Tiegs, S.D., Woodward, G., Eloise, A., Dobson, M., Fleituch, T., Graça, M.A.S., Gulis, V., Hladysz, S., Lacoursière, J.O., Lecerf, A., Pozo, J., Preda, E., Riipinen, M.P., Rîsnoveanu, G., Vadineanu, A., Vought, L.B.-M. & Gessner, M.O. (2016) Litter decomposition as an indicator of stream ecosystem functioning: insights from RivFunction. *Advances in Ecological Research*, **55**, 99–182.
- Cheng, Z.L., Andre, P. & Chiang, C. (1997) Hyphomycetes and macroinvertebrates colonizing leaf litter in two belgian streams with contrasting water quality. *Limnetica*, **13**, 57–63.
- Clapcott, J.E., Young, R.G., Goodwin, E.O. & Leathwick, J.R. (2010) Exploring the response of functional indicators of stream health to land-use gradients. *Freshwater Biology*, 2181–2199.
- Commission Européenne (1998) Special report No 3/98 concerning the implementation by the Commission of EU policy and action as regards water pollution accompanied by the replies of the Commission. *Official Journal of the European Communities*, **C191**, 2–44.
- [DCE] European Commission (2000) European Water Framework Directive establishing a framework for Community action in the field of water policy. *Official Journal of the European Communities*, 1–72 (2000/60/EC).
- Compin, A. & Céréghino, R. (2003) Sensitivity of aquatic insect species richness to disturbance in the Adour-Garonne stream system (France). *Ecological Indicators*, **3**, 135–142.
- Cornut, J., Ferreira V., Gonçalves A.L., Chauvet, E. & Canhoto, C. (2015) Fungal alteration of the elemental composition of leaf litter affects shredder feeding activity. *Freshwater Biology*, **60(9)**, 1755–1771.
- Coste M., Boutry S., Tison-Rosebery J. & Delmas F. (2009) Improvements of the Biological Diatom Index (BDI): description and efficiency of the new version (BDI-2006). *Ecological Indicators*, **9**, 621–650.
- Covich, A.P., Austen, M.C., Bärlocher, F., Chauvet, E., Cardinale, B.J., Biles, C.L., Inchausti, P., Dangles, O., Solan, M., Gessner, M.O., Statzner, B. & Moss, B. (2004) The Role of Biodiversity in the Functioning of Freshwater and Marine Benthic Ecosystems. *BioScience*, **54**, 767.
- Covich, A.P., Palmer, M.A. & Crowl, T.A. (1999) The role of benthic invertebrate species in freshwater

- ecosystems. *BioScience*, **49**, 119–127.
- Cuffney, T.F., Wallace, J.B. & Lugthart, G.J. (1990) Experimental evidence quantifying the role of benthic invertebrates in organic matter dynamics of headwater streams. *Freshwater Biology*, **23**, 281–299.
- Cummins, K.W. (1974) Structure and function of stream ecosystems. *BioScience*, **24**, 631–641.
- CWA (1972) Federal Water Pollution Control Act. 33 U.S.C. §1251 et seq. *Environmental Protection Agency*.
- Daily G.C. (1997) *Natures's services : societal dependence on natural ecosystems*. Island Press, Washington, D.C. & Covelo, California.
- Dalton, S.A., Hodkinson, M. & Smith, K.A. (1970) Interactions between DDT and river fungi. *Applied Microbiology*, **20**, 662–666.
- Dang, C.K., Schindler, M., Chauvet, E. & Gessner, M.O. (2009) Temperature oscillation coupled with fungal community shifts can modulate warming effects on litter decomposition. *Ecology*, **90**, 122–31.
- Danger, M., Cornut, J., Chauvet, E., Chavez, P., Elger, A. & Lecerf, A. (2013) Benthic algae stimulate leaf litter decomposition in detritus-based headwater streams: a case of aquatic priming effect? *Ecology*, **94**, 1604–13.
- Dangles, O. & Malmqvist, B. (2004) Species richness-decomposition relationships depend on species dominance. *Ecology Letters*, **7**, 395–402.
- Dangles, O., Crespo-Pérez, V., Andino, P., Espinosa, R., Calvez, R. & Jacobsen, D. (2011) Predicting richness effects on ecosystem function in natural communities: insights from high-elevation streams. *Ecology*, **92**, 733–43.
- Davidson E.A. & Janssens I.A. (2006). Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change. *Nature*, **440**: 165–173.
- Davidson, E. A., Janssens, I.A. & Luo, Y.Q. (2006) On the variability of respiration in terrestrial ecosystems: moving beyond Q10. *Global Change Biology*, **12**, 154–164.
- DeFries, R.S., Foley, J.A. & Asner, G.P. (2004) Land-use choices: balancing human needs and ecosystem function. *Frontiers in Ecology and the Environment*, **2**, 249–257.
- Dentener, F., Drevet, J., Lamarque, J.F., Bey, I., Eickhout, B., Fiore, A.M., Hauglustaine, D., Horowitz, L.W., Krol, M., Kulshrestha, U.C., Lawrence, M., Galy-Lacaux, C., Rast, S., Shindell, D., Stevenson, D., Van Noije, T., Atherton, C., Bell, N., Bergman, D., Butler, T., Cofala, J., Collins,

- B., Doherty, R., Ellingsen, K., Galloway, J., Gauss, M., Montanaro, V., Müller, J.F., Pitari, G., Rodriguez, J., Sanderson, M., Solomon, F., Strahan, S., Schultz, M., Sudo, K., Szopa, S. & Wild, O. (2006) Nitrogen and sulfur deposition on regional and global scales: a multimodel evaluation. *Global Biogeochemical Cycles*, **20**, 1–21.
- Dere, Ş., Dalkiran, N., Karacaoğlu, D., Elmaci, A., Dülger, B. & Şentürk, E. (2006) Relationships among epipellic diatom taxa, bacterial abundances and water quality in a highly polluted stream catchment, Bursa - Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment*, **112**, 1–22.
- Directive 91/676/CEE (1991), concernant la protection des eaux contre la pollution par les nitrates à partir de sources agricoles. *Journal Officiel de l'Union Européenne*, **L 375 du 31 décembre 1991**.
- Directive 91/271/CEE (1991) relative au traitement des eaux urbaines résiduaires. *Journal Officiel de l'Union Européenne*, **L 135 du 30 mai 1991**.
- Dijksterhuis, J., Van Doorn, T., Samson, R. & Postma, J. (2011) Effects of seven fungicides on non-target aquatic fungi. *Water, Air, and Soil Pollution*, **222**, 421–425.
- Dolédec, S., Statzner, B., Bournard, M. (1999). Species traits for future biomonitoring across ecoregions: patterns along a human-impacted river. *Freshwater Biology*, **42**, 737–758.
- Drake, P., Baldó, F., Cuesta, J.A., García-González, D., Silva-García, A., Arias, A.M., Rodríguez, A., Sobrino, I. & Fernández-Delgado, C. (1999) Initial effects of the toxic waste spill (Aznalcollar mine accident) on the aquatic macrofauna of the Guadalquivir Estuary. *Science of the Total Environment*, **242**, 271–280.
- Dudgeon, D., Arthington, A.H., Gessner, M.O., Kawabata, Z.I., Knowler, D.J., Lévêque, C., Naiman, R.J., Prieur-Richard, A.-H., Soto, D., Stiassny, M.L.J. & Sullivan, C.A. (2006) Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, **81**, 163–182.
- Elosegi, A., Flores, L. & Díez, J. (2011) The importance of local processes on river habitat characteristics: A Basque stream case study. *Limnetica*, **30**, 183–196.
- Elosegi, A. & Sabater, S. (2013) Effects of hydromorphological impacts on river ecosystem functioning: a review and suggestions for assessing ecological impacts. *Hydrobiologia*, **712**, 129–143.
- Elwood J.W., Newbold J.D., Trimble A.F. & Stark R.W. (1981) The limiting role of phosphorus in a woodland stream ecosystem: effects of P enrichment on leaf decomposition and primary producers. *Ecology*, **62**, 146–158.

- Englert, D., Zubrod, J.P., Schulz, R. & Bundschuh, M. (2015) Variability in ecosystem structure and functioning in a low order stream: implications of land use and season. *Science of the Total Environment*, **538**, 341–349.
- European Commission (2000) European Water Framework Directive (2000) establishing a framework for Community action in the field of water policy. *Official Journal of the European Communities*, 1–72 (2000/60/EC).
- Fabre, E. & Chauvet, E. (1998) Leaf breakdown along an altitudinal stream gradient. *Archiv für Hydrobiologie*, **141**, 167–179.
- Feio, M.J., Almeida, S.F.P., Craveiro, S.C. & Calado, A.J. (2009) A comparison between biotic indices and predictive models in stream water quality assessment based on benthic diatom communities. *Ecological Indicators*, **9**, 497–507.
- Feio, M.J., Alves, T., Boavida, M., Medeiros, A. & Graça, M.A.S. (2010) Functional indicators of stream health: a river-basin approach. *Freshwater Biology*, **55**, 1050–1065.
- Fernández, Voss, D.,K., Bundschuh, M., Zubrod, J.P. & Schäfer, R.B. (2015) Effects of fungicides on decomposer communities and litter decomposition in vineyard streams. *Science of the Total Environment*, **533**, 40–48.
- Ferreira, V. & Chauvet, E. (2011) Synergistic effects of water temperature and dissolved nutrients on litter decomposition and associated fungi. *Global Change Biology*, **17**, 551–564.
- Ferreira, V., Castagnérol, B., Koricheva, J.K., Gulis, V., Chauvet, E. & Graça, M.A.S. (2015) A meta-analysis of the effects of nutrient enrichment on litter decomposition in streams. *Biological Reviews*, **90**, 669–688.
- Ferreira, V., Graça, M.A.S., de Lima, J.L.M.P. & Gomes, R. (2006a) Role of physical fragmentation and invertebrate activity in the breakdown rate of leaves. *Archiv für Hydrobiologie*, **165**, 493–513.
- Ferreira, V., Gulis, V. & Graça, M.A.S. (2006b) Whole-stream nitrate addition affects litter decomposition and associated fungi but not invertebrates. *Oecologia*, **149**, 718–729.
- Ferreira, V., Koricheva, J., Duarte, S., Niyogi, D.K. & Guérol, F. (2016a) Effects of anthropogenic heavy metal contamination on litter decomposition in streams – A meta-analysis. *Environmental Pollution*, **210**, 261–270.
- Ferreira, V., Koricheva, J., Pozo, J. & Graça, M.A.S. (2016b) A meta-analysis on the effects of changes in the composition of native forests on litter decomposition in streams. *Forest Ecology and Management*, **364**, 27–38.

- Flores, L., Banjac, Z., Farré, M., Larrañaga, A., Mas-Martí, E., Muñoz, I., Barceló, D. & Elosegi, A. (2014) Effects of a fungicide (imazalil) and an insecticide (diazinon) on stream fungi and invertebrates associated with litter breakdown. *Science of the Total Environment*, **476/477**, 532–541.
- Foley, J.A., DeFries, R., Asner, G.P., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S.R., Chapin, F.S., Coe, M.T., Daily, G.C., Gibbs, H.K., Helkowski, J.H., Holloway, T., Howard, E.A., Kucharik, C.J., Monfreda, C., Patz, J.A., Prentice, I.C., Ramankutty, N. & Snyder, P.K. (2005) Global Consequences of Land Use. *Science*, **309**, 570–574.
- Friberg, N., Bonada, N., Bradley, D.C., Dunbar, M.J., Edwards, F.K., Grey, J., Hayes, R.B., Hildrew, A.G., Lamouroux, N., Trimmer, M. & Woodward, G. (2011) Biomonitoring of human impacts in freshwater ecosystems: the good, the bad, and the ugly. *Advances In Ecological Research*, **44**, 2–68.
- Friberg, N., Dybkjaer, J.B., Olafsson, J.S., Gislason, G.M., Larsen, S.E. & Lauridsen, T.L. (2009) Relationships between structure and function in streams contrasting in temperature. *Freshwater Biology*, **54**, 2051–2068.
- Friberg, N., Skriver, J., Larsen, S.E., Pedersen, M.L. & Buffagni, A. (2010) Stream macroinvertebrate occurrence along gradients in organic pollution and eutrophication. *Freshwater Biology*, **55**, 1405–1419.
- Gessner, M.O. (2005) *Ergosterol as a measure of fungal biomass*. In: Methods to Study Litter Decomposition (eds Graça, M.A.S., Bärlocher, F. & Gessner M.O.), Springer-Verlag, Dordrecht, The Netherlands, 189–195.
- Gessner, M.O. & Chauvet, E. (1993) Ergosterol-to-biomass conversion factors for aquatic hyphomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 502–507.
- Gessner, M.O. & Chauvet, E. (1994) Importance of stream microfungi in controlling breakdown rates of leaf litter. *Ecology*, **75**, 1807.
- Gessner, M.O. & Chauvet, E. (2002) A case for using litter breakdown to assess functional stream integrity. *Ecological Applications*, **12**, 498–510.
- Gessner, M.O., Bärlocher, F. & Chauvet, E. (2007) *Qualitative and quantitative analysis of aquatic hyphomycetes in streams*. In: Freshwater mycology (eds Tsui, C.K.M. & Hyde, K.D.), Fungal Diversity Press, Hong Kong, 127–157.
- [GIS WG] Common Implementation Strategy Working Group 2.3. (2004) Ecological Status (ECOSTAT), Guidance on the intercalibration process, agreed version of WG 2. *An Ecological Status meeting held 7–8 October 2004 in Ispra* (IT).

- Gessner, M.O., Chauvet, E. & Dobson, M. (1999) A perspective on leaf litter breakdown in streams. *Oikos*, **85**, 377–384.
- Gleick P.H. (2003) *Water in Crisis : a guide to the World's Fresh Water Resources*. Oxford University Press, UK.
- Golladay S.W. & Sinsabaugh R.L. (1991) Biofilm development on leaf and wood surface in a boreal river. *Freshwater Biology*, **25**, 437–450.
- Gonçalves, A.L., Chauvet, E., Bärlocher, F., Graça, M. A. S. & Canhoto, C. (2014) Top-down and bottom-up control of litter decomposers in streams. *FreshwaterBiology*, **59**, 2172–2182.
- Graça, M.A.S. (2001) The role of invertebrates on leaf litter decomposition in streams - a review. *International Review of Hydrobiology*, **86**, 383–393.
- Graça, M.A.S., Bärlocher, F. & Gessner, M.O. (2005) *Methods to Study Litter Decomposition. A Practical Guide*. Springer, the Netherlands.
- Graça, M.A.S., Ferreira, V., Canhoto, C., Encalada, A.C., Guerrero-Bolaño, F., Wantzen, K.M. & Boyero, L. (2015) A conceptual model of litter breakdown in low order streams. *International Review of Hydrobiology*, **100**, 1–12.
- Gulis, V., Ferreira, V. & Graça, M.A.S. (2006) Stimulation of leaf litter decomposition and associated fungi and invertebrates by moderate eutrophication: implications for stream assessment. *Freshwater Biology*, **51**, 1655–1669.
- Gulis, V., Marvanová, L. & Descals, E. (2005) *An illustrated key to the common temperate species of aquatic hyphomycetes*. *Methods to Study Litter Decomposition* (eds Graça, M.A.S., Bärlocher, F. & Gessner, M.O.), Kluwer Academic, Dordrecht, 153 – 167.
- Hagen, E.M., Webster, J.R. & Benfield, E.F. (2006) Are leaf breakdown rates a useful measure of stream integrity along an agricultural landuse gradient? *Journal of the North American Benthological Society*, **25**, 330–343.
- Harding, J.S., Benfield, E.F., Bolstad, P. V, Helfman, G.S. & Jones, E.B. (1998) Stream biodiversity: the ghost of land use past. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 14843–14847.
- Hatton-Ellis, T. (2008) The hitchhiker's guide to the Water Framework Directive. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, **18**, 111–116.
- Hawkins, C.P., Olson, J.R. & Hill, R.A. (2010) The reference condition : predicting benchmarks for ecological and water quality assessments. *Journal of the North American Benthological Society*, **29**, 312–343.

- Heatherly, T., Whiles, M.R., Royer, T. V & David, M.B. (2007) Relationships between water quality, habitat quality, and macroinvertebrate assemblages in Illinois streams. *Journal of environmental quality*, **36**, 1653–60.
- Hering, D., Borja, A., Carvalho, L. & Feld, C.K. (2013) Assessment and recovery of European water bodies: Key messages from the WISER project. *Hydrobiologia*, **704**, 1–9.
- Hering, D., Feld, C.K., Moog, O. & Ofenböck, T. (2006a) Cook book for the development of a Multimetric Index for biological condition of aquatic ecosystems: Experiences from the European AQEM and STAR projects and related initiatives. *Hydrobiologia*, **566**, 311–324.
- Hering, D., Johnson, R.K., Kramm, S., Schmutz, S., Szoszkiewicz, K. & Verdonschot, P.F.M. (2006b) Assessment of European streams with diatoms, macrophytes, macroinvertebrates and fish: a comparative metric-based analysis of organism response to stress. *Freshwater Biology*, **51**, 1757–1785.
- Hering, D., Meier, C., Rawer-Jost, C., Feld, C.K., Biss, R., Zenker, A., Sundermann, A., Lohse S. & Böhmer J. (2004). Assessing streams in Germany with benthic invertebrates: selection of candidate metrics. *Limnologia*, **516**, 398–415.
- Hieber, M. & Gessner, M.O. (2002) Contribution of stream detritivores, fungi, and bacteria to leaf breakdown based on biomass estimates. *Ecology*, **83**, 1026–1038.
- Hill, B.H., Herlihy, A.T., Kaufmann, P.R., Stevenson, R.J., McCormick, F.H. & Johnson C.B. (1999) Use of periphyton assemblage data as an index of biotic integrity. *Journal of the North American Benthological Society* **19**, 50–67
- Hill, B.H., Stevenson, Pan, R.J., Herlihy, A.T., Kaufmann, P.R. & Johnson, C.B. (2001) Comparison of correlations between environmental characteristics and stream diatom assemblages characterized at genus and species levels. *Journal of the North American Benthological Society*, **20**, 299–310.
- Hladyz, S., Åbjörnsson, K., Giller, P.S. & Woodward, G. (2011) Impacts of an aggressive riparian invader on community structure and ecosystem functioning in stream food webs. *Journal of Applied Ecology*, **48**, 443–452.
- Hladyz, S., Tiegs, S.D., Gessner, M.O., Giller, P.S., Rîșnoveanu, G., Preda, E., Nistorescu, M., Schindler, M. & Woodward, G. (2010) Leaf-litter breakdown in pasture and deciduous woodland streams: a comparison among three European regions. *Freshwater Biology*, **55**, 1916–1929.
- Illies, J. (1978) Limnofauna Europaeae. *Gustav Fischer Verlag, Stuttgart*.
- Irons III, J.G., Oswood, M.W., Stout, R.J. & Pringle, C.M. (1994) Latitudinal patterns in leaf litter breakdown: Is temperature really important? *Freshwater Biology*, **32**, 401–411.

- Isaak, D.J., Wollrab, S., Horan, D. & Chandler, G. (2012) Climate change effects on stream and river temperatures across the northwest U.S. from 1980-2009 and implications for salmonid fishes. *Climatic Change*, **113**, 499–524.
- Jonsson, M., Malmqvist, B. & Hoffsten, P.-O. (2001) Leaf litter breakdown rates in boreal streams: does shredder species richness matter? *Freshwater Biology*, **46**, 161–171.
- Jax, K. & Setälä, H. (2005) Function and “functioning” in ecology : what does it mean? *Oikos*, **111**, 641–648.
- Karr, J.R. (1981) Assessment of biotic integrity using fish communities. *Fisheries*, **6**, 21–27.
- Karr, J.R. & Chu, E.W. (2000) Sustaining living rivers. *Hydrobiologia*, **422**, 1–14.
- Kerans, B.L. & Karr, J.R. (1994) A benthic index of biotic integrity (B-IBI) for rivers for the Tennessee Valley. *Ecological Applications*, **4**, 768–785.
- Kolkwitz, R. & M. Marsson (1902) Grundsätze für die biologische Beurteilung des Wassers nach seiner Flora und Fauna. *Mitt. Prüfungsanst. Wasserversorg. Abwasserreinig*, **1**: 33–72.
- Kominoski, J.S., Marczak, L.B. & Richardson, J.S. (2011) Riparian forest composition affects stream litter decomposition despite similar microbial and invertebrate communities. *Ecology*, **92**, 151–159.
- Kreutzweiser, D.P., Thompson, D.G. & Scarr, T.A. (2009) Imidacloprid in leaves from systemically treated trees may inhibit litter breakdown by non-target invertebrates. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72**, 1053–1057.
- Kuehn, K.A., Francoeur, S.N., Findlay, R.H. & Neely, R.K. (2014) Priming in the microbial landscape: periphytic algal stimulation of litter-associated microbial decomposers. *Ecology*, **95**, 749–762.
- Laitung, B. & Chauvet, E. (2005) Vegetation diversity increases species richness of leaf-decaying fungal communities in woodland streams. *Archiv für Hydrobiologie*, **164**, 217–235.
- Laitung, B., Pretty, J.L., Chauvet, E. & Dobson, M. (2002) Response of aquatic hyphomycete communities to enhanced stream retention in areas impacted by commercial forestry. *Freshwater Biology*, **47**, 313–323.
- Larsen, S. & Ormerod, S.J. (2010) Combined effects of habitat modification on trait composition and species nestedness in river invertebrates. *Biological Conservation*, **143**, 2638–2646.
- Lavorel, S. & Garnier, E. (2002). Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: Revisiting the Holy Grail. *Functional Ecology*, **16**, 545–556.

- Lecerf, A. & Chauvet, E. (2008a) Intraspecific variability in leaf traits strongly affects alder leaf decomposition in a stream. *Basic and Applied Ecology*, **9**, 598–605.
- Lecerf, A. & Chauvet, E. (2008b) Diversity and functions of leaf-decaying fungi in human-altered streams. *Freshwater Biology*, **53**, 1658–1672.
- Lecerf, A., Dobson, M., Dang, C.K. & Chauvet, E. (2005) Riparian plant species loss alters trophic dynamics in detritus-based stream ecosystems. *Oecologia*, **146**, 432–42.
- Lecerf, A., Risnoveanu, G., Popescu, C., Gessner, M.O. & Chauvet, E. (2007) Decomposition of diverse litter mixtures in streams. *Ecology*, **88**, 219–27.
- Lecerf, A., Usseglio-Polatera, P., Charcosset, J.-Y., Lambrigot, D., Bracht, B. & Chauvet, E. (2006) Assessment of functional integrity of eutrophic streams using litter breakdown and benthic macroinvertebrates. *Archiv für Hydrobiologie*, **165**, 105–126.
- Leopold, L.B. (1962) Rivers. *American Scientist*, **50**, 511–537.
- Leps, M., Tonkin, J.D., Dahm, V., Haase, P. & Sundermann, A. (2015) Disentangling environmental drivers of benthic invertebrate assemblages: The role of spatial scale and riverscape heterogeneity in a multiple stressor environment. *Science of the Total Environment*, **536**, 546–556.
- Liess, M. & Von Der Ohe, P.C. (2005) Analyzing effects of pesticides on invertebrate communities in streams. *Environmental toxicology and chemistry*, **24**, 954–65.
- Liess, M., Schäfer, R.B. & Schriever, C.A. (2008) The footprint of pesticide stress in communities – species traits reveal community effects of toxicants. *Science of the Total Environment*, **406**, 484–490.
- Lucas, R.W., Sponseller, R.A., Gundale, M.J., Stendahl, J., Fridman, J., Högberg, P. & Laudon, H. (2016) Long-term declines in stream and river inorganic nitrogen (N) export correspond to forest change. *Ecological Applications*, **26**, 545–556.
- Macklin, M.G. & Lewin, J. (2003) River sediments, great floods and centennial-scale Holocene climate change. *Journal of Quaternary Science*, **18**, 101–105.
- Magbanua, F.S., Townsend, C.R., Hageman, K.J. & Matthaei, C.D. (2013) Individual and combined effects of fine sediment and the herbicide glyphosate on benthic macroinvertebrates and stream ecosystem function. *Freshwater Biology*, **58**, 1729–1744.
- Maltby, L., Brock, T.C.M. & Van Den Brink, P.J. (2009) Fungicide risk assessment for aquatic ecosystems: Importance of interspecific variation, toxic mode of action, and exposure regime. *Environmental Science and Technology*, **43**, 7556–7563.

- Martinez-Haro M., Beiras, R., Bellas, J., Capela, R., Coelho, J.P., Lopes, I., Moreira-Santos, M., Reis-Henriques, A.M., Ribeiro, R., Santos, M.M. & Marques, J.C. (2015) A review on the ecological quality status assessment in aquatic systems using community based indicators and ecotoxicological tools: what might be the added value of their combination? *Ecological Indicators*, **48**, 8–16.
- Mathuriau, C. & Chauvet, E. (2002) Breakdown of leaf litter in a neotropical stream. *Journal of the North American Benthological Society*, **21**, 384–396.
- Matthaei, C.D., Piggott, J.J. & Townsend, C.R. (2010) Multiple stressors in agricultural streams: Interactions among sediment addition, nutrient enrichment and water abstraction. *Journal of Applied Ecology*, **47**, 639–649.
- Matthews, R.A., Buikema, A.L., Cairns, J. & Rodgers, J.H. (1982) Biological monitoring. Part IIA – Receiving system functional methods, relationships and indices. *Water Research*, **16**, 129–139.
- Metcalfe, J.L. (1989) Biological water-quality assessment of running waters based on macroinvertebrate communities – history and present status in Europe. *Environmental Pollution*, **60**, 101–139.
- Meybeck, M. (2003) Global analysis of river systems: from Earth system controls to Anthropocene syndromes. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **358**, 1935–55.
- Meybeck, M. & Vörösmarty C.J. (2004) The integrity of river and drainage basin systems: Challenges from environmental change. In: *Vegetation, Water, Humans and the Climate: A New Perspective on an Interactive System* (eds Kabat P. et al.), Springer-Verlag, New York, part D, 297–479.
- MEA (2005) Millenium Ecosystem Assessment. Ecosystems and human weel-being : biodiversity synthesis. *World Ressource Institute, Washington DC*.
- Minshall, G.W., Petersen, R.C., Cummins, K.W., Bott, T.L., Sedell, J.R., Cushing, C.E. & Vannote, R.L. (1983) Interbiome comparison of stream ecosystem dynamics. *Ecological Monographs*, **53**, 1–25.
- Mondy, C.P., Villeneuve, B., Archaimbault, V. & Usseglio-Polatera, P. (2012) A new macroinvertebrate-based multimetric index (I_2M_2) to evaluate ecological quality of French wadeable streams fulfilling the WFD demands: a taxonomical and trait approach. *Ecological Indicators*, **18**, 452–467.

- Moore, R.D., Spittlehouse, D.L. & Story, A. (2005) Riparian microclimate and stream temperature response to forest harvesting: a review. *Journal Of The American Water Resources Association*, **7**, 813–834.
- Morin, S., Pesce, S., Tlili, A., Coste, M. & Montuelle, B. (2010) Recovery potential of periphytic communities in a river impacted by a vineyard watershed. *Ecological Indicators*, **10**, 419–426.
- Moss, D., Furse, M.T., Wright, J.F. & Armitage, P.D. (1987) The prediction of the macro-invertebrate fauna of unpolluted running-water sites in Great Britain using environmental data. *Freshwater Biology*, **17**, 41–52.
- Mutz, M., Elozegi, A. & Piégay, H. (2013) Preface: physical template and river ecosystem functioning: interdisciplinary feedbacks for improving rivers. *Hydrobiologia*, **712**, 1–4.
- Naeem, S., Bunker D.E., Hector A., Loreau M. & Perrings C. (2010) *Biodiversity, ecosystem functioning, & human wellbeing – an ecological and economic perspective*. Oxford University Press, New York.
- Newbold, J.D., Elwood, J.W., O'Neill, R.V. & VanWinkle, W. (1982) Nutrient spiralling in streams: Implications for nutrient limitation and invertebrate activity. *American Naturalist*, **120**, 628–652.
- Niemi, G.J. & McDonald, M.E. (2004) Application of ecological indicators *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **35**, 89–111.
- Norris, R.H. & Hawkins, C.P. (2000) Monitoring river health. *Hydrobiologia*, **435**, 5–17.
- Odum, E.P. (1962) Relationship between structure and function in ecosystems. *Japanese Journal of Ecology*, **12**, 108–118.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H. & Wagner, H. (2015) Vegan: Community Ecology Package. R Package Version 2.2-1. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Palmer, M.A. & Febria C.M. (2012) The Heartbeat of ecosystems. *Science*, **336**, 1393–1394.
- Palmer, M.A., Reidy Liermann, C.A., Nilsson, C., Flörke, M., Alcamo, J., Lake, P.S. & Bond, N. (2008) Climate change and the world's river basins: Anticipating management options. *Frontiers in Ecology and the Environment*, **6**, 81–89.
- Pascoal, C., Pinho, M., Cássio, F. & Gomes, P. (2003) Assessing structural and functional ecosystem condition using leaf breakdown: Studies on a polluted river. *Freshwater Biology*, **48**, 2033–2044.
- Persoone, G. & De Pauw, N. (1979). Systems of biological indicators for water quality assessment. In *Biological Aspects of Freshwater Pollution*, ed. O. Ravera, Oxford, Pergamon Press, 39–75.

- Pestana, J.L.T., Alexander, A.C., Culp, J.M., Baird, D.J., Cessna, A.J. & Soares, A.M.V.M. (2009) Structural and functional responses of benthic invertebrates to imidacloprid in outdoor stream mesocosms. *Environmental Pollution*, **157**, 2328–2334.
- Peters, K., Bundschuh, M. & Schäfer, R.B. (2013) Review on the effects of toxicants on freshwater ecosystem functions. *Environmental Pollution*, **180**, 324–329.
- Petersen, R.C. & Cummins, K.W. (1974) Leaf processing in a woodland stream. *Freshwater Biology*, **4**, 343–368.
- Piggott, J.J., Niyogi, D.K., Townsend, C.R. & Matthaei, C.D. (2015) Multiple stressors and stream ecosystem functioning: climate warming and agricultural stressors interact to affect processing of organic matter. *Journal of Applied Ecology*, **52**, 1126–1134.
- Piscart, C., Genoel, R., Dolédec, S., Chauvet, E. & Marmonier, P. (2009) Effects of intense agricultural practices on heterotrophic processes in streams. *Environmental pollution*, **157**, 1011–1018.
- Piscart, C., Navel, S., Maazouzi, C., Montuelle, B., Cornut, J., Mermillod-Blondin, F., Creuze des Chatelliers, M., Simon, L. & Marmonier, P. (2011) Leaf litter recycling in benthic and hyporheic layers in agricultural streams with different types of land use. *Science of The Total Environment*, **409**, 4373–4380.
- Poff, N.L. (1997) Landscape filters and species traits: towards mechanistic understanding and prediction in stream ecology. *Journal of the North American Benthological Society*, **16**, 391–409.
- Pozo, J., Casas, J., Menéndez, M., Mollá, S., Arostegui, I., Basaguren, A., Casado, C., Descals, E., Garcia-Avilés, J., González, J.M., Larranaga, A., Lopez, E., Lusi, M., Moya, O., Pérez, J., Riera, T., Roblas, N. & Salinas, M.J. (2011) Leaf-litter decomposition in headwater streams: a comparison of the process among four climatic regions. *Journal of the North American Benthological Society*, **30**, 935–950.
- Prat, D., Leger, C. & Bojovic, S. (1992) Genetic diversity among *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. populations. *Acta oecologica*, **13**, 469–477.
- Rasmussen, J.J., Baattrup-Pedersen, A., Wiberg-Larsen, P., McKnight, U.S. & Kronvang, B. (2011) Buffer strip width and agricultural pesticide contamination in Danish lowland streams: Implications for stream and riparian management. *Ecological Engineering*, **37**, 1990–1997.
- Rasmussen, J.J., Monberg, R.J., Baattrup-Pedersen, A., Cedergreen, N., Wiberg-Larsen, P., Strobel, B. & Kronvang, B. (2012a) Effects of a triazole fungicide and a pyrethroid insecticide on the decomposition of leaves in the presence or absence of macroinvertebrate shredders. *Aquatic toxicology*, **118/119**, 54–61.

- Rasmussen, J.J., Wiberg-Larsen, P., Baattrup-Pedersen, A., Friberg, N. & Kronvang, B. (2012b) Stream habitat structure influences macroinvertebrate response to pesticides. *Environmental Pollution*, **164**, 142–149.
- Rasmussen, J.J., Wiberg-Larsen, P., Baattrup-Pedersen, A., Monberg, R.J. & Kronvang, B. (2012c) Impacts of pesticides and natural stressors on leaf litter decomposition in agricultural streams. *Science of the Total Environment*, **416**, 148–55.
- Reiss, J., Bridle, J.R., Montoya, J.M. & Woodward, G. (2009) Emerging horizons in biodiversity and ecosystem functioning research. *Trends in Ecology & Evolution*, **24**, 505–514.
- Reyjol, Y., Argillier, C., Bonne, W., Borja, A., Buijse, A.D., Cardoso, A.C., Daufresne, M., Kernan, M., Ferreira, M.T., Poikane, S., Prat, N., Solheim, A.L., Stroffek, S., Usseglio-Polatera, P., Villeneuve, B. & van de Bund, W. (2014) Assessing the ecological status in the context of the European Water Framework Directive: Where do we go now? *Science of the Total Environment*, **497-498**, 332–344.
- Rice, W.R. (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, **43**, 223–225.
- Riipinen, M.P., Davy-Bowker, J. & Dobson, M. (2009) Comparison of structural and functional stream assessment methods to detect changes in riparian vegetation and water pH. *Freshwater Biology*, **54**, 2127–2138.
- Rimet, F., Cauchie, H.M., Hoffmann, L. & Ector, L. (2005) Response of diatom indices to simulated water quality improvements in a river. *Journal of Applied Phycology*, **17**, 119–128.
- Rincón, J., Santelloco, R. (2009) Aquatic fungi associated with decomposing *Ficus* sp. leaf litter in a neotropical stream, *Journal of the North American Benthological Society*, **28**, 416–425.
- Robinson, C.T., Gessner, M.O. & Ward, J. V. (1998) Leaf breakdown and associated macroinvertebrates in alpine glacial streams. *Freshwater Biology*, **40**, 215–228.
- Rosemond, A.D., Benstead, J.P., Bumpers, P.M., Gulis, V., Kominoski, J.S., Manning, D.W.P., Suberkropp, K. & Wallace, J.B. (2015) Experimental nutrient additions accelerate terrestrial carbon loss from stream ecosystems. *Science*, **347**, 318–321.
- Rosemond, A.D., Pringle, C.M., Ramírez, A., Paul, M.J. & Meyer, J.L. (2002) Landscape variation in phosphorus concentration and effects on detritus-based tropical streams. *Limnology and Oceanography*, **47**, 278–289.
- Roussel, H., Chauvet, E. & Bonzom, J.-M. (2008) Alteration of leaf decomposition in copper-contaminated freshwater mesocosms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **27**, 637–44.

- Sandin, L. & Solimini, A.G. (2009) Freshwater ecosystem structure-function relationships: From theory to application. *Freshwater Biology*, **54**, 2017–2024.
- Schäfer, R.B., Bundschuh, M., Rouch, D.A., Szöcs, E., Von Der Ohe, P.C., Pettigrove, V., Schulz, R., Nuggeoda, D. & Kefford, B.J. (2012a) Effects of pesticide toxicity, salinity and other environmental variables on selected ecosystem functions in streams and the relevance for ecosystem services. *Science of the Total Environment*, **415**, 69–78.
- Schäfer, R.B., Caquet, T., Siimes, K., Mueller, R., Lagadic, L. & Liess, M. (2007) Effects of pesticides on community structure and ecosystem functions in agricultural streams of three biogeographical regions in Europe. *Science of the Total Environment*, **382**, 272–285.
- Schäfer, R.B., von der Ohe, P.C., Rasmussen, J.J., Kefford, B.J., Beketov, M.A., Schulz, R. & Liess, M. (2012b) Thresholds for the effects of pesticides on invertebrate communities and leaf breakdown in stream ecosystems. *Environmental Science & Technology*, **46**, 5134–42.
- Schmid, P., Kohler, M., Gujer, E., Zennegg, M. & Lanfranchi, M. (2007) Persistent organic pollutants, brominated flame retardants and synthetic musks in fish from remote alpine lakes in Switzerland. *Chemosphere*, **67**, 16–21.
- Schwarzenbach, R.P., Escher, B.I., Fenner, K., Hofstetter, T.B., Johnson, C.A., von Gunten, U. & Wehrli, B. (2006) The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science*, **313**, 1072–1077.
- Shannon, C.E. (1948) A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal*, **27**, 153–162.
- Shiklomanov, I.A. (1993) World fresh water resources. *Water in crisis* (ed P.H. Glick), pp. 13–24. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
- Shiklomanov, I.A. & Rodda, J.C. (2003) *World Water Resources at the Beginning of the 21st Century*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Shinn, C., Dauba, F., Grenouillet G., Guenard G. & Lek, S. (2009) Temporal variation of heavy metal contamination in fish of the river Lot in southern France. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72**, 1957–1965.
- Silva-Junior, E.F., Moulton, T.P., Boëchat, I.G. & Gücker, B. (2014) Leaf decomposition and ecosystem metabolism as functional indicators of land use impacts on tropical streams. *Ecological Indicators*, **36**, 195–204.
- Sladeczek, V. (1973). System of water quality from the biological point of view. *Archiv für Hydrobiologie–BeiheftErgebnisse der Limnologie*, **7**, 1–218.

- Smith, P., Ashmore, M.R., Black, H.I.J., Burgess, P.J., Evans, C.D., Quine, T.A., Thomson, A.M., Hicks, K. & Orr, H.G. (2013) The role of ecosystems and their management in regulating climate, and soil, water and air quality. *Journal of Applied Ecology*, **50**, 812–829.
- Soininen, J. (2007) Environmental and spatial control of freshwater diatoms - review. *Diatom Research*, **22**, 473–490.
- Statzner, B., Bis, B., Dolédec, S. & Usseglio-Polatera, P. (2001) Perspectives for biomonitoring at large spatial scales: a unified measure for the functional composition on invertebrate communities in European running waters. *Basic and Applied Ecology*, **2**, 73–85.
- Statzner, B., Hoppenhaus, K., Arens, M.F. & Richoux, P. (1997) Reproductive traits, habitat use and templet theory: a synthesis of world-wide data on aquatic insects. *Freshwater Biology*, **38**, 109–135.
- Stoddard, J.L., Larsen, D.P., Hawkins, C.P., Johnson, R.K. & Norris, R.H. (2006) Setting Expectations for the Ecological Condition of Streams: the Concept of Reference Condition. *Ecological Applications*, **16**, 1267–1276.
- Suberkropp, K. & Wallace, J.B. (1992) Aquatic hyphomycetes in insecticide-treated and untreated streams. *Journal of the North American Benthological Society*, **11**, 165–171.
- Tachet, H., Richoux, P., Bournaud, M. & Usseglio-Polatera, P. (2010) Invertébrés d'eau douce : Systématique, biologie, écologie. CNRS Editions.
- Tank, J.L., Rosi-Marshall, E.J., Griffiths, N.A., Entekin, S.A. & Stephen, M.L. (2010) A review of allochthonous organic matter dynamics and metabolism in streams. *Journal of the North American Benthological Society*, **29**, 118–146.
- Taylor, B.R. & Chauvet, E. (2014) Relative influence of shredders and fungi on leaf litter decomposition along a river altitudinal gradient. *Hydrobiologia*, **721**, 239–250.
- Thompson, M.S.A., Bankier, C., Bell, T., Dumbrell, A.J., Gray, C., Ledger, M.E., Lehmann, K., McKew, B.A., Sayer, C.D., Shelley, F., Trimmer, M., Warren, S.L. & Woodward, G. (2015) Gene-to-ecosystem impacts of a catastrophic pesticide spill: testing a multilevel bioassessment approach in a river ecosystem. *Freshwater Biology*, **61**, 2037–2050.
- Tiegs, S.D., Langhans, S.D., Tockner, K. & Gessner, M.O. (2007) Cotton strips as a leaf surrogate to measure decomposition in river floodplain habitats. *Journal of the North American Benthological Society*, **26**, 70–77.
- Tison, J., Park, Y.-S., Coste, M., Wasson, J.G., Ector, L., Rimet, F. & Delmas, F. (2005) Typology of diatom communities and the influence of hydro-ecoregions: a study on the French hydrosystem scale. *Water research*, **39**, 3177–88.

- Tolkamp, H. H. (1985). Biological assessment of water quality in running water using macroinvertebrates: A case study for Limburg, The Netherlands. *Water Science and Technology*, **17**, 867–78.
- Torrizi, M., Scuri, S., Dell'Uomo, A. & Cocchioni, M. (2010) Comparative monitoring by means of diatoms, macroinvertebrates and chemical parameters of an Apennine watercourse of central Italy: The river Tenna. *Ecological Indicators*, **10**, 910–913.
- Townsend, C.R. & Hildrew, A.G. (1994) Species Traits in Relation To a Habitat Templet for River Systems. *Freshwater Biology*, **31**, 265–275.
- Tranvik, L.J., Downing, J.A., Cotner, J.B., Loiselle, S.A., Striegl, R.G., Ballatore, T.J., Dillon, P., Finlay, K., Fortino, K. & Knoll, L.B. (2009) Lakes and reservoirs as regulators of carbon cycling and climate. *Limnology and Oceanography*, **54**, 2298–2314.
- Truchy, A., Angeler, D.G., Sponseller, R.A., Johnson, R.K. and McKie, B.G. (2015) Linking biodiversity, ecosystem functioning and services, and ecological resilience : towards an integrative framework for improved management. *Advances in Ecological Research*, **53**, 55–96.
- Tsui, C.K.M., Hyde, K.D. & Hodgkiss, I.J. (2001) Effects of glyphosate on lignicolous freshwater fungi of Hong Kong. *Sydowia*, **200**, 167–174.
- Turunen, J., Muotka, T., Vuori, K.-M., Karjalainen, S.M., Rääpysjärvi, J., Sutela, T. & Aroviita, J. (2016) Disentangling the responses of boreal stream assemblages to low stressor levels of diffuse pollution and altered channel morphology. *Science of the Total Environment*, **544**, 954–962.
- Van Dam, H., Mertens, A. & Sinkeldam, J. (1994) A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from The Netherlands. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology*, **28**, 117–133.
- Vanni, M.J. (2002) Nutrient Cycling By Animals in Freshwater Ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **33**, 341–370.
- Vannote, R., Minshall, G., Cummins, K., Sedell, J. & Cushing, C. (1980) The River Continuum Concept. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **37**, 130–137.
- Verneaux, J. (1973) Cours d'eau de Franche-Comté (massif du Jura). Recherches écologiques sur le réseau hydrographique du Doubs - Essai de biotypologie. *Annales Scientifiques de l'Université de Besançon. 3ème Série, Zoologie*, **9**, 1-260.
- Violle, C., Navas, M.-L., Vil, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I. & Garnier, E. (2007). Let the concept of trait be functional! *Oikos*, **116**, 882–892.

- Vitousek, P.M., Mooney, H.A., Lubchenco, J. & Melillo, J.M. (1997) Human Domination of Earth's Ecosystems. *Science*, **277**, 494–499.
- Von der Ohe, P.C. & Goedkoop, W. (2013) Distinguishing the effects of habitat degradation and pesticide stress on benthic invertebrates using stressor-specific metrics. *Science of the Total Environment*, **444**, 480–90.
- Von der Ohe, P.C., De Deckere, E., Prüss, A., Muñoz, I., Wolfram, G., Villagrasa, M., Ginebreda, A., Hein, M. & Brack, W. (2009) Toward an integrated assessment of the ecological and chemical status of European river basins. *Integrated environmental assessment and management*, **5**, 50–61.
- Vörösmarty, C.J., McIntyre, P.B., Gessner, M.O., Dudgeon, D., Prusevich, A., Green, P., Glidden, S., Bunn, S.E., Sullivan, C.A., Liermann, C.R. & Davies, P.M. (2010) Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature*, **467**, 555–561.
- Wagenhoff, A., Townsend, C.R. & Matthaei, C.D. (2012) Macroinvertebrate responses along broad stressor gradients of deposited fine sediment and dissolved nutrients: A stream mesocosm experiment. *Journal of Applied Ecology*, **49**, 892–902.
- Wagenhoff, A., Townsend, C.R., Phillips, N. & Matthaei, C.D. (2011) Subsidy-stress and multiple-stressor effects along gradients of deposited fine sediment and dissolved nutrients in a regional set of streams and rivers. *Freshwater Biology*, **56**, 1916–1936.
- Wallace, J.B., Eggert, S.L., Meyer, J.L. & Webster, J.R. (1999) Effects of Resource Limitation on a Detrital-Based Ecosystem. *Ecological Monographs*, **69**, 409–442.
- Wasson, J.-G., Chandesris, A., Pella, H. & Blanc, L. (2002) *Les hydro-écorégions de France métropolitaine - Approche régionale de la typologie des eaux courantes et éléments pour la définition des peuplements de référence d'invertébrés*. Rapport interne au Cemagref dans le cadre du programme de recherche HYDRECO.
- Wasson, J.-G., Chandesris, A., Pella, H. & Blanc, L. (2004) Les hydro-écorégions: une approche fonctionnelle de la typologie des rivières pour la Directive cadre européenne sur l'eau. *Ingénieries*, **40**, 3–10.
- Wasson, J.G., Chandesris, A., Bautista, A.G., Pella, H. & Villeneuve, B. (2006) Combined Pressures and Geographical Context: Hydro-Ecoregions Framework. *Cemagref REBECCA Project Report*.
- Webster, J.R. & Benfield, E.F. (1986) Vascular plant breakdown in fresh-water ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **17**, 567–594.
- Westoby, M., & Wright, I.J. (2006). Land-plant ecology on the basis of functional traits. *Trends in Ecology and Evolution*, **21**, 261–268.

- Wieder, R.K. & Lang, G.E. (1982) A critique of the analytical methods used in examining decomposition data obtained from litter bags. *Ecology*, **63**, 1636–1642.
- Williamson, C.E., Saros, J.E., Vincent, W.F. & Smol, J.P. (2009) Lakes and reservoirs as sentinels, integrators, and regulators of climate change. *Limnology and Oceanography*, **54**, 2273–2282.
- Woodward, G., Gessner, M.O., Giller, P.S., Gulis, V., Hladyz, S., Lecerf, A., Malmqvist, B., McKie, B.G., Tiegs, S.D., Cariss, H., Dobson, M., Eloise, A., Ferreira, V., Graça, M.A.S., Fleituch, T., Lacoursière, J.O., Nistorescu, M., Pozo, J., Risnoveanu, G., Schindler, M., Vadineanu, A., Vought, L.B.-M. & Chauvet, E. (2012) Continental-scale effects of nutrient pollution on stream ecosystem functioning. *Science*, **336**, 1438–1440.
- Wright, J.F., Moss, D., Armitage, P.D. & Furse, M.T. (1984) A preliminary classification of running-water sites in Great Britain based on macro-invertebrate species and the prediction of community type using environmental data. *Freshwater Biology*, **14**, 221–256.
- Wright, J.F. (2000) An introduction to RIVPACS. In: *Assessing the Biological Quality of Freshwaters: RIVPACS and Other Techniques* (Eds Wright, J.F., Sutcliffe, D.W. & Furse, M.T.), Freshwater Biological Association, Ambleside, 1–24.
- Young, R.G. & Collier, K.J. (2009) Contrasting responses to catchment modification among a range of functional and structural indicators of river ecosystem health. *Freshwater Biology*, **54**, 2155–2170.
- Young, R.G., Matthaei, C.D. & Townsend, C.R. (2008) Organic matter breakdown and ecosystem metabolism: functional indicators for assessing river ecosystem health. *Journal of the North American Benthological Society*, **27**, 605–625.
- Zubrod, J.P., D. Englert, A. Feckler, N. Koksharova, M. Konschak, R. Bundschuh, N. Schnetzer, K. Englert, R. Schulz & M. Bundschuh (2015) Does the current fungicide risk assessment provide sufficient protection for key drivers in aquatic ecosystem functioning? *Environmental Science and Technology*, **49**, 1173–1181.

Annexe

Litter breakdown for ecosystem integrity assessment also applies to streams affected by pesticides

Brosed Magali, Lamothe Sylvain & Chauvet Eric

Hydrobiologia

The International Journal of Aquatic Sciences

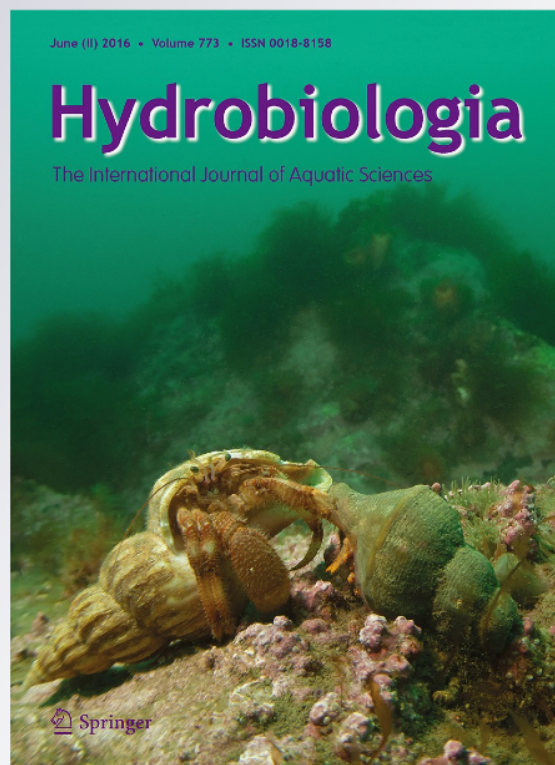
ISSN 0018-8158

Volume 773

Number 1

Hydrobiologia (2016) 773:87-102

DOI 10.1007/s10750-016-2681-2



 Springer

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer International Publishing Switzerland. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

health evaluation. It relies on a variety of biological processes, by focussing on the quantification of fluxes and rates and integrating both a temporal dimension and the activities of organisms at different levels of organization (Bunn & Davies, 2000; Palmer & Febria, 2012). A number of ecosystem-level processes have been proposed for stream bioassessment, encompassing ecosystem metabolism (gross primary production and community respiration), leaf litter breakdown and nutrient cycling (Gessner & Chauvet, 2002). Among these, leaf litter breakdown has generated many studies focused on a variety of functional impairments, for instance, regarding stream water quality, channel hydromorphology and riparian vegetation (e.g. Lecerf & Chauvet, 2008; Kominoski et al., 2011; Woodward et al., 2012; Eloisegi & Sabater, 2013). Leaf litter breakdown is a key process for stream ecosystem sustainability as a driver of matter and energy for the aquatic food web derived from terrestrial sources. By implying both macroinvertebrates and microorganisms, this process results from the activity of a wide variety of organisms with diverse traits and biological requirements and potentially exhibiting differential sensitivity to the functional impairments. Gessner & Chauvet (2002) have proposed to discriminate invertebrate-driven and microbial-driven breakdown to improve robustness and sensitivity of litter breakdown assays.

Detection of pesticides and their transformed products in aquatic ecosystems is difficult, not only due to the diffuse character of this contamination of agricultural origin and their widespread occurrence, particularly that of herbicides, but also to the very low concentrations found in natural waters (most often $<1 \mu\text{g l}^{-1}$). In addition, field studies may fail to determine specific effects of pesticides, simply because they are mixed with confounding factors (e.g. heavy metals; Cheng et al., 1997; Piscart et al., 2011). Therefore, sampling and analysing all ecotoxicologically relevant substances entering a water body are challenging. The assessment is further complicated by the scarcity of data on potential effects of individual (and mixed) compounds on species in the target system. Finally, confounding effects on aquatic communities from other anthropogenic stressors may also co-occur in agricultural areas (e.g. riparian forest clearcutting, stream channelization and nutrient enrichment). On one hand, conventional bioassessment indices for water quality fail to attribute any

observed changes in biological communities to pesticide contamination (e.g. Beketov et al., 2009). On the other hand, a specific indicator based on functional traits of invertebrates, the SPEcies At Risk indicator for pesticides (SPEAR_{pesticide}), has proven its efficiency to detect the effects of pesticide contamination on aquatic taxa (Liess & Von der Ohe, 2005; Schäfer et al., 2007). This indicator uses both physiological and biological traits (sensitivity to toxicants; generation time, dispersal capacity and length of life stages outside the aquatic habitat, respectively) to determine the fraction of the abundance of sensitive taxa in communities. SPEAR_{pesticide} has been shown to be relatively constant over reference sites from different ecoregions and to respond to pesticide stress (Liess & Von der Ohe, 2005; Liess et al., 2008; Von der Ohe & Goedkoop, 2013), while the effects detected by this metric have been shown to translate into losses of regional biodiversity (Beketov et al., 2013). In addition, macroinvertebrates may be influenced by pesticides in their physiological and behavioural activity, not only through exposure to the water phase but also via food uptake. As an illustration, insecticide exposure at field relevant concentrations has been shown to cause feeding inhibition of mayflies and oligochaetes (Alexander et al., 2007). Feeding inhibition in *Gammarus* subjected to short-term pulse exposure of a pesticide mixture may be strongly detrimental to the energy transfer along the food chain in the aquatic ecosystem (Bundschuh et al., 2013).

In contrast to individual or community scales, no metrics have been applied to assess the impact of pesticides on ecosystem-level processes. Meta-analyses revealed that leaf breakdown tends to be more sensitive to pesticide contamination than other functional endpoints, such as gross primary production and ecosystem respiration (Schäfer et al., 2012a; Peters et al., 2013). Individual studies that have examined litter breakdown reported contrasting results about the origin of loss in process rate, depending on whether it was mostly related to a decrease in the activity of macroinvertebrate (Schäfer et al., 2007, 2012b) or microbial (Rasmussen et al., 2012a) decomposers. A recent meta-analysis has shown that streams with very low nutrient concentrations were more sensitive to nutrient enrichment than streams exhibiting medium to high concentrations (Ferreira et al., 2015). While nutrients may be limiting in oligotrophic waters where even low nutrient increments may stimulate leaf

decomposers, particularly aquatic fungi, nutrient saturation occur in eutrophic rivers, often in interference with compounds with detrimental effects such as pesticides and heavy metals, resulting either in the absence of positive influence of nutrients or in a substantial abatement of breakdown rates (Woodward et al., 2012). A similar saturation pattern is not expected with pesticides as their concentrations in natural waters, even when considering additive effects of various compounds, generally lie by several orders of magnitude below the acute lethal concentrations determined for aquatic organisms such as *Daphnia magna* Straus or green algae (Brock et al., 2006; Schwarzenbach et al., 2006). A unimodal negative relationship between pesticides toxicity and leaf breakdown rate is thus predictable.

Our study was based on a correlative approach where we investigated the relationship of pesticide toxicity with leaf litter breakdown and leaf-associated decomposers in 12 agricultural streams of southwestern France, which were selected along a gradient of pesticide concentrations but otherwise exhibiting similar characteristics. Leaf breakdown was measured using leaf bags with large or fine mesh (FM), allowing to discriminate the contribution of macroinvertebrates and microbial decomposers, respectively. This assessment was performed in late winter, at the end of a year of pesticide monitoring using grab water sampling, with the objective to detect long-term pesticide effects on ecosystem functional endpoints. Concentrations in pesticides were expressed in terms of toxic unit (TU) to model organisms (Backhaus & Faust, 2012). We hypothesized that (1) total breakdown rate was depressed at the most contaminated sites, (2) invertebrate-driven breakdown was more affected than microbial-driven breakdown due to the higher sensitivity of leaf-shredding invertebrates compared to leaf-colonizing fungi in our streams where herbicides dominated and (3) the abundance and activity of macro- and micro-decomposers were consistent with the response of breakdown rate, as their density and activity were assumed to be similarly impacted by pesticide toxicity. Our underlying motivation was to determine the extent to which the information drawn from leaf breakdown and associated parameters is complementary to the dedicated index $\text{SPEAR}_{\text{pesticide}}$, when the objective is to evaluate the functional status of stream ecosystems impaired by pesticides.

Methods

Study sites

Our sites were selected in the Côtéaux Aquitains (southwest of France), a relatively homogeneous European hydroecoregion in terms of geologic substratum (detritic materials), topography (flatland) and climate (Mediterranean and oceanic influences) (Wasson et al., 2002). Agriculture is the dominant landuse with small forest patches and some urban areas being embedded in the landscape. Our 12 surveyed sites corresponded to permanent, second–fourth order streams regularly monitored by the Adour-Garonne Water Agency for water quality, including pesticides concentration. Except for pesticide load, they exhibited similar characteristics, rather typical of lowland agricultural streams (Table 1). None of them was subject to dredging or weed cutting during the study period. Our selection of streams covered a low-to-high range of pesticide toxicity (see below).

Physical and chemical analyses of stream water

All stream water characteristics, including pesticide concentrations but excluding temperature, were obtained from the Adour-Garonne Water Agency database. Physical and chemical characterization was made at several occasions over 1 year (March 2012–March 2013), including in spring when pesticide concentrations were the highest. Determinations comprised pH, conductivity and concentrations of inorganic nutrients (nitrate, nitrite, ammonium and orthophosphate) and dissolved oxygen. Among the 139 pesticides monitored, 30 were detected in our streams including 16 herbicides, 12 fungicides and 2 insecticides. The sum of pesticide concentrations ranged from 0 to $31.11 \mu\text{g l}^{-1}$, and the number of detected pesticides at each site and sampling occasion from 0 to 21 (Table S1). Pesticide toxicity at each site was determined as the maximum TU (mTU) calculated according to the following formula:

$$\text{mTU} = \log \left(\max_{i=1}^n \left(\frac{c_i}{\text{EC50}_i} \right) \right),$$

where c_i is the concentration of pesticide i , EC50_i is the corresponding 48–96 h median effect concentration for a given standard test species and n is the

Table 1 Location and physicochemical characteristics of stream water of the 12 sites ranked according to the increasing pesticide toxicity (mTU_{D. magna})

	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Longitude	43°34'29	43°46'19	43°17'32	43°54'52	43°47'34	43°23'02
Latitude	01°02'18	02°00'02	00°37'51	01°45'59	00°49'03	01°10'25
Stream order	3	3	2	3	3	4
Elevation (m)	149	157	283	185	159	213
Substrata	C, Sa	G, M, P	C, G, P	Si	G	G, P, Sa
Temperature (°C)	8.1 (4.3–12.4)	7.6 (4.8–10.3)	6.5 (2.3–11.3)	5.7 (2.0–9.5)	8.0 (4.6–12.0)	7.7 (3.3–12.9)
pH	8.2 (7.8–8.4)	8.1 (7.9–8.3)	7.9 (7.2–8.7)	7.8 (7.7–7.9)	8.3 (7.8–8.7)	8.0 (7.7–8.4)
Conductivity (μS cm ⁻¹)	523 (79–782)	681 (628–719)	175 (134–227)	577 (534–621)	799 (735–861)	439 (285–685)
[O ₂] (mg l ⁻¹)	8.6 (4.5–13.7)	11.4 (9.1–13.0)	10.4 (7.5–12.2)	9.0 (5.3–12.6)	8.2 (5.5–11.9)	9.9 (6.1–14.1)
[N-NO ₃] (mg l ⁻¹)	1.05 (0.41–1.72)	9.70 (6.5–14.45)	0.81 (0.23–2.71)	1.47 (0.11–5.13)	8.76 (1.6–15.47)	1.72 (0.45–5.87)
[N-NO ₂] (mg l ⁻¹)	0.02 (0.02–0.04)	0.03 (0.02–0.05)	<0.01 (<0.01–0.01)	<0.01 (<0.01–0.02)	0.02 (0.02–0.03)	0.02 (<0.01–0.03)
[N-NH ₄] (mg l ⁻¹)	0.07 (0.04–0.12)	0.03 (0.02–0.04)	0.04 (0.04–0.04)	0.03 (<0.01–0.05)	0.03 (<0.01–0.04)	0.10 (0.04–0.32)
[P-PO ₄] (mg l ⁻¹)	0.03 (0.03–0.04)	0.02 (<0.01–0.04)	0.02 (0.02–0.02)	0.02 (<0.01–0.03)	0.03 (<0.01–0.04)	0.03 (0.02–0.05)
mTU _{D. magna}	−5.60	−5.05	−4.84	−4.77	−4.64	−3.92
sTU _{D. magna}	−5.20	−4.83	−4.46	−4.44	−4.49	−3.72
mTU _{algae}	−3.66	−4.89	−0.43	−2.14	−3.68	−0.53
sTU _{algae}	−3.59	−4.82	−0.43	−2.14	−3.52	−0.51
SPEAR _{pesticide}	56.24	44.50	47.14	53.88	45.38	37.99
	S7	S8	S9	S10	S11	S12
Longitude	43°38'48	43°41'53	43°33'57	43°39'04	44°02'40	43°55'26
Latitude	01°29'02	00°02'40	01°52'55	−00°07'23	00°58'10	01°21'46
Stream order	4	4	4	4	3	4
Elevation (m)	137	108	192	133	105	89
Substrata	G, P, Si	C, G, Sa	B, C, P, Sa	P	G, P	C, P
Temperature (°C)	7.1 (3.3–11.2)	7.5 (3.7–12.3)	7.3 (3.7–10.1)	7.9 (3.6–13.0)	7.1 (3.0–11.6)	6.2 (2.8–9.8)
pH	7.8 (7.0–8.5)	8.1 (7.8–8.6)	7.8 (7.4–8.0)	7.9 (7.2–8.5)	7.9 (7.35–8.4)	7.9 (7.6–8.3)
Conductivity (μS cm ⁻¹)	609 (285–826)	573 (467–641)	632 (114–803)	485 (301–588)	697 (442–853)	926 (659–1,126)
[O ₂] (mg l ⁻¹)	7.8 (3.9–11.8)	6.7 (0.8–8.9)	8.9 (7.6–11.1)	8.8 (4.8–13.2)	8.9 (4.9–13.1)	8.8 (5.4–11.2)
[N-NO ₃] (mg l ⁻¹)	2.53 (0.68–5.42)	2.47 (0.23–5.04)	3.63 (0.63–10.55)	5.42 (2.71–7.68)	2.61 (0.83–5.69)	2.76 (1.13–4.06)
[N-NO ₂] (mg l ⁻¹)	0.14 (0.05–0.22)	0.07 (0.02–0.17)	0.05 (<0.01–0.12)	0.03 (0.01–0.06)	0.02 (<0.01–0.06)	0.02 (<0.01–0.04)
[N-NH ₄] (mg l ⁻¹)	0.93 (0.20–3.27)	0.24 (0.04–1.09)	0.09 (<0.01–0.3)	0.07 (0.02–0.22)	0.04 (0.04–0.04)	0.10 (0.04–0.16)
[P-PO ₄] (mg l ⁻¹)	0.77 (0.05–1.27)	0.05 (0.03–0.08)	0.09 (<0.01–0.16)	0.05 (0.02–0.14)	0.05 (0.03–0.1)	0.27 (0.23–0.33)
mTU _{D. magna}	−3.54	−3.33	−3.14	−2.80	−2.48	−1.81
sTU _{D. magna}	−2.95	−3.19	−3.06	−2.50	−2.30	−1.74
mTU _{algae}	−0.76	0.15	−1.75	0.65	0.80	−0.66

Table 1 continued

	S7	S8	S9	S10	S11	S12
sTU _{algae}	−0.33	0.18	−1.32	0.65	0.81	−0.48
SPEAR _{pesticide}	30.35	21.56	22.34	54.02	16.82	7.52

Dominant substrata consist of *C* clay, *Sa* sand, *G* gravel, *M* mud, *P* pebble, *Si* silt and *B* boulder. Water temperatures correspond to mean and range (in parentheses) values over the 21 days of leaf litter exposure. For pH, conductivity and concentrations in dissolved oxygen and inorganic nutrients, values refer to mean and range (in parentheses) values from March 2012 to March 2013. Maximum toxic unit and sum of toxicity unit maxima for *Daphnia magna* and algae together with SPEAR_{pesticide} at each site are indicated

S1 Boulouze, *S2* Agros, *S3* Gimone, *S4* Tescou, *S5* Orbe, *S6* Touch, *S7* Sausse, *S8* Petit Midour, *S9* Girou, *S10* Bergon, *S11* Ayroux, *S12* Rieu-Tort

number of pesticides detected in the site (Backhaus & Faust, 2012; cf. Table S1). Due to the logarithmic transformation, TUs over different sites were within a relatively narrow range, e.g. from −5 or lower from the lowest contaminated site up to −1 or higher from the most contaminated site, with a TU of 1 meaning that the observed pesticide concentration is 10 times higher than the median effect concentration for that pesticide and the standard species considered. Alternatively, pesticide toxicity at each site was expressed as the sum of TUs (sTUs; Liess & Von der Ohe, 2005):

$$\text{sTU} = \log \left(\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{\text{EC50}_i} \right).$$

Standard test species were selected among the closest organisms to those involved in the ecosystem function investigated in this study, i.e. *D. magna* (TU_{*D. magna*}) for invertebrate decomposers and diverse algae for microbial ones (TU_{algae}; University of Hertfordshire, 2013).

Leaf litter breakdown

In autumn 2012, alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) leaves were collected just after abscission from a riparian zone within the same European hydroecoregion. Leaves were air-dried for 7 days, weighed in batches of approximately 4 g (3.96–4.04 g) and enclosed in coarse mesh (CM, 9 mm opening) and FM (0.5 mm opening) bags (15 × 20 cm). Initial dry mass of leaf sample was determined by using a correction coefficient obtained from eight additional batches of 4 g dried at 105°C for 48 h.

In each stream, six experimental units consisting of one CM bag and one FM bag were anchored in the

streambed in mid-February 2013. This corresponded to a period where agricultural lands (mostly devoted to the production of cereals and oleaginous plants) were often free of cultures, with pesticides, especially herbicides, being mainly applied from early spring until late summer. Boulders were added to maintain the litterbags at the stream bottom. The six experimental units were placed at a distance of >5 m from each other by selecting comparable conditions of exposure (e.g. depth and substratum) within stream riffles (=blocks) whenever possible. Riffles were preferred to pools in order to optimize fungal colonization and avoid the risk of anoxia in leaf packs resulting from fine sediment deposition. Temperature was continuously monitored in each stream using temperature loggers (HOBO UA-001-64, Bourne, MA, USA). After 21 days of exposure, leaf bags were removed cautiously, e.g. in limiting the loss of leaf-associated invertebrates, and stored in a cool box during transport to the laboratory.

Leaf litter from FM bags was gently washed under tap water to remove sediments, and ten leaf discs per sample were cut from different leaves avoiding the central vein. Five out of the ten discs were used immediately to induce sporulation of aquatic hyphomycetes and the other five discs were stored at −20°C for later fungal biomass estimation. The remaining leaves were dried at 105°C for 48 h and weighed (±0.01 g).

Leaf litter from CM bags was gently washed and leaf-associated macroinvertebrates were collected on a 500 µm sieve and stored in ethanol (70% vol/vol). Leaves were dried to constant mass at 105°C for 48 h and weighed (±0.01 g). The ash-free dry mass (AFDM) was extrapolated from aliquots of ground dry litter (0.25 ± 0.02 g) burnt at 550°C for 3 h and weighted to determine the ash content.

Leaf-associated microorganisms and macroinvertebrates

Ergosterol concentration was used as a proxy of leaf-associated fungal biomass (Gessner & Chauvet, 1993). Lipids were extracted from sets of five leaf discs by heating (80°C for 30 min) in 0.8% (mass/vol) KOH-methanol, purified by solid-phase extraction [Oasis HLB 3 cm³ (60 mg) extraction cartridge, Waters, Milford, MA, USA], and quantified at 282 nm and 33°C using high-performance liquid chromatography on a C₁₈ column with methanol as the mobile phase (Gessner, 2005). Ergosterol was converted to fungal biomass using a conversion factor of 5.5 mg ergosterol g⁻¹ AFDM (Gessner & Chauvet, 1993), and biomass expressed as mg g⁻¹ leaf AFDM.

For each sample, sporulation was induced from the set of five leaf discs introduced into 100-ml Erlenmeyer flasks with 20 ml of filtered stream water (GF/C, 1.2 µm pore size, Whatman, Maidstone, UK) placed on an orbital shaker at 12°C. After 48 h of incubation, the conidial suspensions together with rinsing water were adjusted to 40 ml in 50 ml polypropylene tubes and fixed with 5 ml of 37.5% formaldehyde. Aliquots of conidial suspensions were filtered (Millipore SMWP, 5 µm pore size, Billerica, MA, USA) and stained with 0.05% (mass/vol) Trypan blue in 60% lactic acid, with at least 200 conidia per replicate being identified and counted under the microscope at 100–400× (Gessner et al., 2003) using identification keys of Chauvet (1990) and Gulis et al. (2005). Leaf discs were dried at 105°C and weighted, and the sporulation rate was expressed as the number of conidia produced per µg⁻¹ leaf AFDM day⁻¹.

Invertebrates were identified to the family level and assigned to functional feeding groups according to Tachet et al. (2010). Taxa were considered as shredders when their diet was at least composed of 20% of coarse particulate organic matter. The relative abundance of shredder taxa and shredder taxa richness was calculated. Abundance was expressed as number of individuals g⁻¹ leaf AFDM and taxa richness and number of taxa per sample. In addition, the abundance of SPEcies At Risk of being impacted by chronically pesticide contamination (SPEAR_{pesticide}) was computed for each site using the freely available online SPEAR calculator (<http://www.systemecology.eu/spear>).

Data analysis

Exponential leaf breakdown rate (k) for each bag was derived from the decay model (Wieder & Lang, 1982) according to the formula: $k = -\ln(M_t/M_0)/t$, where M_0 is the initial AFDM, M_t is the AFDM remaining, and t is the exposure time (in days). Total (k_{total}) and microbial-driven (k_{microbe}) breakdown rates were calculated from CM and FM bags, respectively. Invertebrate-driven breakdown rate ($k_{\text{invertebrate}}$) was calculated from the difference between leaf AFDM remaining in CM and FM bags at each experimental unit. The $k_{\text{total}}/k_{\text{microbe}}$ ratio was used to evaluate shifts in the relative contribution of shredders and microorganisms to leaf breakdown (Gessner & Chauvet, 2002).

A Pearson correlation matrix taking into account the leaf litter breakdown rates, abundance and richness of total invertebrates and shredders, fungal biomass, conidial production and taxa richness, SPEAR_{pesticide}, and the expressions of pesticides contamination (mTU and sTU for both *D. magna* and algae) together with ammonium as a potentially deleterious compound (cf. Lecerf et al., 2006) was tested. Abundance of both total invertebrates and shredders was logarithmically transformed. Correlations were done using R (3.1.3 version). The significance threshold was set at $P < 0.05$.

Results

Pesticides

Our sites exhibited a wide gradient of pesticide concentrations as expressed in TUs (Table 1). Boulouze (S1) and Agros (S2) were the less contaminated sites, and Rieu-Tort (S12) and Ayroux (S11) the most contaminated sites, depending on considering toxicity to *D. magna* or algae, respectively. Over all sites, the range of pesticide contamination was wider considering algae (mTU_{algae}: -4.89 to 0.80) than *D. magna* (mTU_{*D. magna*}: -5.60 to -1.81; Table S1). At each site, mTU_{algae} was higher than mTU_{*D. magna*}, with the Gimone (S3) site exhibiting the largest discrepancy (-0.43 and -4.84, respectively). Values of the sTUs and their patterns among sites were very similar to those of mTU for both algae and *Daphnia*.

The herbicides acetochlor (chloroacetamide) and, to a lesser extent, oxadiazon (oxadiazole), isoproturon (urea) and diuron (phenylurea) were clearly the most important compounds, i.e. resulting in the highest values of mTU_{algae} (Table S1). The highest $mTU_{D. magna}$ values were due to the carbamate insecticide carbaryl, followed by the herbicide isoproturon.

Leaf litter breakdown rates

Five out of the 144 leaf bags deployed at our 12 stream sites [Boulouze (S1): one FM bag, Touch (S7) and Rieu-Tort (S12): one FM and one CM bag] could not be retrieved after 21 days. In CM bags, 43.3–66.1% of the initial leaf litter mass was retrieved after 21 days. This translated into total breakdown rates (k_{total}) ranging from $0.0198 \pm 0.0014 \text{ day}^{-1}$ (mean $\pm$ SE; Rieu-Tort, S12) to $0.0413 \pm 0.0058 \text{ day}^{-1}$ (Boulouze, S1, Fig. 1A). In FM bags, remaining leaf litter ranged from 59.9 to 71.0% corresponding to microbial-driven breakdown rates ($k_{microbe}$) of $0.0247 \pm 0.0023 \text{ day}^{-1}$ (Girou, S9) and $0.0163 \pm 0.00005 \text{ day}^{-1}$ (Agros, S2), respectively. As a result, invertebrate-driven breakdown rates ($k_{invertebrate}$) ranged from $0.0009 \pm 0.0004 \text{ day}^{-1}$ (Rieu-Tort, S12) to $0.0144 \pm 0.0023 \text{ day}^{-1}$ (Agros, S2), corresponding to 98–74% of initial litter mass remaining after 21 days, which underlined the almost null breakdown driven by invertebrates at the former site. Both k_{total} and $k_{invertebrate}$ exhibited a decrease along the gradient of pesticide toxicity ($mTU_{D. magna}$) with linear relationships being significant ($r^2 \geq 0.25$, $P < 0.0001$), whereas $k_{microbe}$ showed no clear trend (Fig. 1A). The increase in pesticide toxicity thus coincided with a sharp decrease of the total to microbial-driven breakdown rate ratio, with the linear relationship being highly significant ($r^2 = 0.30$, $P < 0.0001$; Fig. 1B). Similarly, significant patterns were also found for breakdown rates expressed in degree-day (data not shown).

Leaf-associated decomposers

The fungal biomass associated with the remaining leaf litter at day 21 ranged from 54.5 ± 7.1 (Tescou, S4) to $164.0 \pm 9.6 \text{ mg g}^{-1} \text{ leaf AFDM}$ (Gimone, S3) (mean $\pm$ SE), and conidial production of aquatic hyphomycetes from 0.32 ± 0.04 (Agros, S2) to 2.99 ± 2.08 conidia $\mu\text{g}^{-1} \text{ leaf AFDM day}^{-1}$ (Sausse, S7; mean $\pm$ SE)

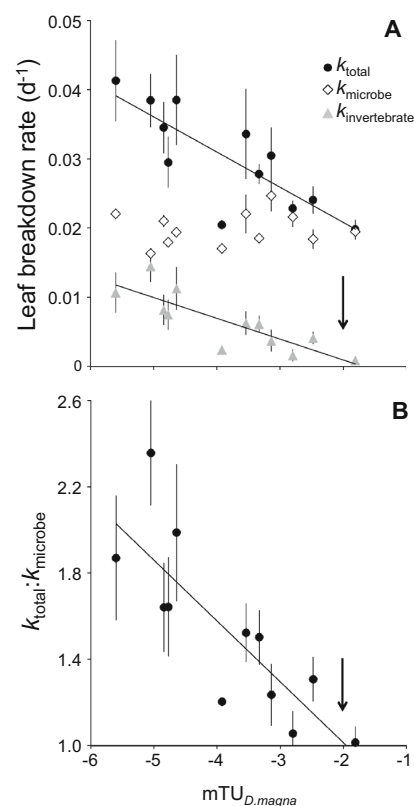


Fig. 1 **A** Total, microbial-driven and invertebrate-driven leaf breakdown rates (mean $\pm$ SE, $n = 6$) along the gradient of maximum toxic units for *Daphnia magna* encountered in the 12 sites. **B** Total-microbial-driven breakdown rate ratio (mean $\pm$ SE, $n = 6$) along the gradient of maximum toxic units for *Daphnia magna*. The linear regressions were based on all six experimental units per stream. Parameters of the linear regression for total breakdown rate are $y = -0.0051x + 0.0051$, $r^2 = 0.25$, $P < 0.0001$. Invertebrate-driven breakdown rate: $y = -0.0031x - 0.0032$, $r^2 = 0.31$, $P < 0.0001$. Total-microbial-driven breakdown rate ratio: $y = -0.2709x + 0.5204$, $r^2 = 0.30$, $P < 0.0001$. The linear regression for microbial-driven breakdown rate was not significant. The arrow indicates the threshold defined by the European Union as the EC_{50} of *Daphnia* divided by an assessment factor of 100 (EEC, 1991)

(Table S2). While the fungal taxa richness was around 12 species per stream (range 9–16), four of them occurred in all sites, i.e. *Alatospora acuminata* Ingold, *Flagellospora curvula* Ingold, *Tetracladium marchalianum* De Wild. and *Lemonniera aquatica* De Wild. (Table S2). Three of these species dominated the conidial production, with an average contribution of 35.8% (± 6.4 , SE) for *A.*

acuminata, 27.4% (± 6.5) for *F. curvula* and 18.6% (± 3.9) for *T. marchalianum*.

The mean ($\pm$ SE) abundance of invertebrates from CM bags was 59.3 ± 11.1 individuals g^{-1} leaf AFDM, with the minimum occurring at both Ayroux (S11; 18.4 ± 3.4) and Girou (S9; 18.4 ± 4.4) and the maximum being 135.9 ± 77.7 at Boulouze (S1), i.e. the second and fourth most contaminated sites and the less contaminated site regarding toxicity to *Daphnia*, respectively (Table S3). The mean invertebrate taxa richness per site was 15 with values ranging between 8 (Rieu-Tort, S12, the most contaminated site) and 26 (Gimone, S3, the third less contaminated site). Taxa belonged to five classes (Arachnida, Clitellata, Insecta, Gastropoda and Malacostraca), with insect larvae being largely dominant. Asellidae was the only family for Malacostraca as Hydrachnidae was for Arachnida. Gastropoda was represented by Hydrobiidae and Physidae, and Clitellata by Glossiphoniidae, Oligochaeta and Planorbidae. Chironomidae was the most abundant family, contributing in average ($\pm$ SE) to $69.7 \pm 6.8\%$ of the total invertebrates [from $20.7 \pm 6.4\%$ at Gimone (S3) to $96.2 \pm 13.2\%$ at Rieu-Tort (S12)]. Baetidae was the only other taxa present in all sites, even though it only contributed to $3.2 \pm 1.3\%$ of the total on average.

The mean ($\pm$ SE) abundance of shredders was 9.3 ± 6.1 individuals g^{-1} leaf AFDM, ranging from 0.4 ± 0.2 to 75.2 ± 49.7 at Rieu-Tort (S12) and Boulouze (S1), i.e. the most and less contaminated sites, respectively. In average ($\pm$ SE), shredders accounted for $10.7 \pm 4.5\%$ of the total invertebrates [$3.2 \pm 2.4\%$ at Rieu-Tort (S12) to $46.2 \pm 5.1\%$ at Boulouze (S1)]. Shredders were only dominant at Boulouze (S1), with Nemouridae individuals accounting for $51.1 \pm 34.3\%$ of the total invertebrates (see Table S3 for more information). Consistently, the mean individual abundance from invertebrate families at risk for pesticide (SPEAR_{pesticide}) ranged from 56.2 (Boulouze, S1) to 7.5 (Rieu-Tort, S12).

Among-parameters correlations

Both k_{total} and $k_{\text{invertebrate}}$ were significantly and negatively correlated with $\text{mTU}_{D. magna}$ (Fig. 1A) and $\text{mTU}_{\text{algae}}$ ($r \leq -0.77$, $P \leq 0.003$; Table 2). The ratios $k_{\text{total}}/k_{\text{microbe}}$ (Fig. 1B) and $k_{\text{invertebrate}}/k_{\text{microbe}}$ (data not shown) significantly decreased along the $\text{TU}_{D. magna}$ contamination. Both k_{total} and $k_{\text{invertebrate}}$

were positively correlated with shredder abundance ($r \geq 0.71$, $P \leq 0.010$). Shredder taxa richness was significantly related to $k_{\text{invertebrate}}$ ($r = 0.72$, $P = 0.009$), and the relationship was close to be significant with k_{total} ($r = 0.54$, $P = 0.068$). Invertebrate and shredder abundances were also negatively affected by TUs for *D. magna* ($\text{mTU}_{D. magna}$ and $\text{sTU}_{D. magna}$; $r \leq -0.75$, $P \leq 0.005$) and shredder taxa richness and abundance were negatively correlated to TUs for algae ($\text{mTU}_{\text{algae}}$ and $\text{sTU}_{\text{algae}}$; $r \leq -0.60$, $P \leq 0.040$). No significant correlation was observed between mTUs and k_{microbe} , neither with other variables related with aquatic hyphomycetes, i.e. fungal biomass and conidial production rate (Table S3). However, positive correlations between TUs for algae and conidial production rate occurred ($\text{mTU}_{\text{algae}}$ and $\text{sTU}_{\text{algae}}$; $r \geq 0.53$, $P \leq 0.077$, Table 2), the non-significance being explained by the high conidial production rate at Orbe, a poorly contaminated site.

SPEAR_{pesticide} was strongly and negatively correlated to TUs related to *D. magna* ($\text{mTU}_{D. magna}$ and $\text{sTU}_{D. magna}$; $r \leq -0.76$, $P \leq 0.004$, Table 2), and positively correlated to invertebrate and shredder taxa richness as well as invertebrate and shredder abundances ($r \geq 0.66$, $P \leq 0.018$, Table 2). SPEAR_{pesticide} was not correlated with breakdown rates, but discarding a site (Bergon: S10) led to significant correlations with total and invertebrate-driven breakdown rates ($r = 0.70$, $P = 0.017$; $r = 0.73$, $P = 0.012$, respectively). Finally, no correlation was found between ammonia concentration and any response variable (Table 2).

Discussion

The rate of alder leaf breakdown in our streams was strongly affected by pesticide contamination, supporting our main hypothesis. Not only the lowest and highest concentrations expressed as TUs (for *D. magna*) coincided with the highest and lowest breakdown rates, respectively, but this pattern was also consistent along the wide gradient of pesticide concentrations found in our 12 streams. Overall, these findings were consistent with previous results by Schäfer et al. (2007), even though their 2.4-fold reduction in breakdown rate reported from farmland streams in Western France was higher than the 2.1-

Table 2 Correlation matrix between response variables (means of the six experimental units for each stream), toxicity parameters and ammonium concentration, with Pearson correlation coefficient (bottom left) and *P*-values (top right) being displayed

	k_{total}	$k_{\text{microbial}}$	$k_{\text{invertebrate}}$	Mycelial biomass	Conidial production rate	Fungal taxa richness	Invertebrate taxa richness	Shredder taxa richness
k_{total}		0.557	<0.001	0.214	0.559	0.455	0.412	0.068
$k_{\text{microbial}}$	0.19		0.474	0.350	0.213	0.590	0.410	0.303
$k_{\text{invertebrate}}$	0.91	−0.23		0.500	0.247	0.702	0.223	0.009
Mycelial biomass	0.39	0.30	0.22		0.622	0.385	0.129	0.742
Conidial production rate	−0.19	0.39	−0.36	0.16		0.980	0.803	0.264
Fungal taxa richness	−0.24	−0.17	−0.12	−0.28	−0.01		0.829	0.690
Invertebrate taxa richness	0.26	−0.26	0.38	0.46	0.08	−0.07		0.009
Shredder taxa richness	0.54	−0.32	0.72	0.11	−0.35	−0.13	0.72	
Invertebrate abundance ^a	0.64	0.01	0.59	0.52	0.06	−0.51	0.64	0.55
Shredders abundance ^a	0.76	0.11	0.71	0.37	−0.45	−0.38	0.28	0.63
SPEAR _{pesticide}	0.52	−0.01	0.51	0.32	−0.07	−0.24	0.67	0.66
sTU _{D. magna}	−0.80	0.17	−0.84	−0.39	0.42	0.21	−0.6	−0.72
sTU _{algae}	−0.76	0.18	−0.84	−0.01	0.56	0.25	−0.26	−0.64
mTU _{D. magna}	−0.81	0.13	−0.84	−0.42	0.36	0.26	−0.59	−0.72
mTU _{algae}	−0.77	0.13	−0.82	0.00	0.53	0.26	−0.22	−0.60
[N-NH ₄]	0.06	0.26	−0.09	−0.04	0.53	−0.03	−0.32	−0.33
	Invertebrate abundance ^a	Shredders abundance ^a	SPEAR _{pesticide}	sTU _{D.magna}	sTU _{algae}	mTU _{D.magna}	mTU _{algae}	[N-NH ₄]
k_{total}	0.026	0.004	0.086	0.002	0.004	0.001	0.003	0.847
$k_{\text{microbial}}$	0.972	0.724	0.966	0.604	0.574	0.691	0.696	0.416
$k_{\text{invertebrate}}$	0.043	0.010	0.088	0.001	0.001	0.001	0.001	0.783
Mycelial biomass	0.081	0.241	0.310	0.210	0.982	0.173	0.994	0.900
Conidial production rate	0.863	0.142	0.832	0.177	0.060	0.256	0.077	0.078
Fungal taxa richness	0.089	0.227	0.462	0.520	0.429	0.415	0.406	0.916
Invertebrate taxa richness	0.026	0.370	0.017	0.041	0.411	0.042	0.496	0.309
Shredder taxa richness	0.063	0.027	0.018	0.009	0.026	0.009	0.040	0.301
Invertebrate abundance ^a		0.013	<0.001	0.003	0.081	0.001	0.100	0.804
Shredders abundance ^a	0.69		0.007	0.005	0.009	0.003	0.011	0.523
SPEAR _{pesticide}	0.88	0.73		0.004	0.119	0.002	0.155	0.490
sTU _{D. magna}	−0.78	−0.75	−0.76		0.003	<0.001	0.005	0.445
sTU _{algae}	−0.52	−0.71	−0.47	0.78		0.005	<0.001	0.390
mTU _{D. magna}	−0.82	−0.78	−0.79	0.99	0.75		0.008	0.629

Table 2 continued

	Invertebrate abundance ^a	Shredders abundance ^a	SPEAR _{pesticide}	sTU _{D.magna}	sTU _{algae}	mTU _{D.magna}	mTU _{algae}	[N-NH ₄]
mTU _{algae}	−0.50	−0.70	−0.44	0.76	1.00	0.72		0.491
[N-NH ₄]	−0.08	−0.21	−0.22	0.24	0.27	0.16	0.22	

Bold cases indicate significant correlations

^a Denotes logarithmic transformation

fold decrease observed in our streams. The higher reduction in Schäfer et al.'s study could however be explained by their slightly wider range in TUs (mTU_{D. magna}: −5.0 to −0.42), and specifically by their higher extension towards higher toxicity (−0.42) compared to those occurring in our SW French streams (mTU_{D. magna}: −5.6 to −1.8). Interestingly, our total breakdown rates for alder leaf litter (0.0198–0.0413 day^{−1}) also fit with the range reported by Schäfer et al. (2007) for the same leaf species in French streams (0.008–0.067 day^{−1}) with our range again being narrower, illustrating the relative constancy of this endpoint when measured over comparable conditions, i.e. agricultural and lowland streams.

If a mTU_{D. magna} threshold of −3.5 is used to discriminate streams affected by pesticide input from unaffected ones (Schäfer et al., 2007), then half of our streams were impacted, resulting in a total breakdown rate average reduction of 22% in those streams. Nevertheless such a reduction, although close to the first threshold of 25% proposed in Gessner & Chauvet (2002), does not provide the highest evidence of pesticide impact on leaf breakdown. Applying the same mTU_{D. magna} threshold to invertebrate-driven breakdown rate led to a 58% reduction of the function rate, a high value identical to that reported in Schäfer et al. (2007), indicating a severe functional impairment of the ecosystem (Gessner & Chauvet, 2002). The loss of invertebrate diversity due to pesticide contamination was reported at regional scale in Germany and France both at species and family level (e.g. with a loss of up to 42% of the recorded taxonomic pool) by Beketov et al. (2013). Here, by relying on leaf-associated invertebrates, we also show a strong depletion of both shredder taxa richness and abundance, which in our most contaminated stream represented 60 and 0.5% of the values from the less contaminated stream, respectively. The decrease in shredders contribution to the invertebrate community,

directly translating into reduced leaf breakdown rate, was remarkably consistent along our contamination gradient (Table S3).

A major feature of our streams impaired by pesticides was the shift from leaf breakdown co-driven by microbial and invertebrate decomposers in non-impacted streams to the control by microbial decomposers only in impacted ones. Similarly, Piscart et al. (2011) reported unaltered rates of microbial-driven breakdown of alder leaf litter in benthic habitats of two streams affected by farming and vineyard and contaminated by pesticides and metals, in contrast with invertebrate-driven breakdown, which was severely impacted. Apart from the case where one decomposer type is specifically targeted (e.g. invertebrates by insecticides), very few examples, where one type of decomposer is affected by a stressor, while the other remains unchanged, are reported in the literature. In the most documented case, e.g. nutrient enrichment of stream water, the response of decomposers in leaf litter breakdown is not unimodal. Fungi tend to be stimulated and invertebrates unchanged under low–moderate nutrient enrichment (Ferreira et al., 2006), while high eutrophication leads to unaffected or decreased fungal activity and strongly depressed invertebrate contribution (Baldy et al., 2007; Woodward et al., 2012). Compensatory contributions of both decomposer types resulting in unaltered total breakdown rates have been reported for the clearance of woody riparian vegetation in the European streams (Hladysz et al., 2010). In the present study, the response of both microbial and invertebrate decomposers over the whole pesticide gradient was remarkably unimodal. At least for invertebrates, this is supported by the constant decrease in both abundance and numbers of taxa with increasing pesticide toxicity, resulting in their gradually lower involvement in leaf breakdown. These effects were observed across various situations where pesticides were present in

mixtures of compounds differing in identity, type, concentration and toxicity. Even though it is difficult to draw any conclusion from such naturally complex conditions, these patterns suggest a potentially high sensitivity of invertebrates to the three pesticide types (herbicide, insecticide and fungicide) prevailing in our streams. When considering effects on litter-associated insect taxa, like the midges Chironomidae, our records suggest that insecticides mixtures were even more toxic than determined on the standard species *D. magna*. As an example, the EC₅₀ of imidacloprid for *Chironomus tentans* Fabricius (3.4 µg l⁻¹, ECOTOX database) was 27,070 times lower than for *D. magna*, potentially resulting in higher TUs than indicated in Table 1 for four of our streams [Sausse (S7), Bergon (S10), Ayroux (S11), and Rieu-Tort (S12)]. Similarly, relying on the lowest reported EC₅₀ of carbaryl, i.e. the pesticide that determined the highest TU for *D. magna* in our study [−1.81, Rieu-Tort (S12)], for *C. tentans* (1.6 µg l⁻¹, ECOTOX database), would lead to an even higher mTU (−1.20) for invertebrates in this stream.

The higher sensitivity of invertebrates can be due to the conjunction of direct (i.e. exposure to toxicant) and indirect (i.e. feeding on contaminated mycelia and leaf matter) effects like documented in Flores et al. (2014). Actually, our experimental design did not allow to discriminate the consequences of shredder taxa loss and altered feeding activity, both of which potentially resulting in depressed leaf consumption. If the drastic decrease in shredder abundance at our contaminated sites could, per se, explain most of the reduction of litter fragmentation, an inhibition of the feeding activity of shredders that survived pesticide effects cannot be precluded. Bundschuh et al. (2013) reported that the amphipod *Gammarus fossarum* Koch when briefly exposed to pesticide mixture at field relevant concentrations, i.e. with the same order of magnitude as those occurring in our streams, exhibited a 35% decreased feeding rate on alder leaf litter (low exposure scenario). A stonefly, *Pteronarcys comstocki* Smith, showed a feeding rate on alder leaves impaired by 27% in outdoor streams, due to low-concentration pulses of the insecticide imidacloprid (Pestana et al., 2009). Similarly, although not related to pesticide but cadmium exposition, increasing concentrations of this stressor resulted in decreased alder leaf mass loss and decreased feeding by a caddisfly shredder, *Sericostoma vittatum* Rambur, and a midge collector,

Chironomus riparius Meigen (Campos et al., 2014). Importantly, *C. riparius* was reported to consume alder leaves in the absence of shredders, and thus to switch from collector to shredder feeding mode. Such sublethal effects with direct impact on leaf processing rate may have occurred in our study, where chironomids dominated invertebrate assemblages, especially in the most contaminated streams. The extent of which the depressed feeding activity of shredders in our contaminated sites contributed to the observed reduced breakdown rate however remains difficult to quantify, given the mixture of potentially inhibiting compounds complicated by the interactions among leaf consumers. Such an inhibitory effect, synergistically combined with the altered feeding activity caused by a contaminated leaf resource (Bundschuh et al., 2013; Flores et al., 2014), is however susceptible to occur in the frequently encountered situations where pesticide toxicity do not compromise invertebrate survival.

In contrast, fungal decomposers appear to be tolerant to a wide range of molecule types and concentrations. In particular, leaf-associated fungi are poorly sensitive to insecticides (e.g. Dalton et al., 1970), at concentrations where invertebrate detritivores are strongly if not totally repressed (Suberkropp & Wallace, 1992; Kreutzweiser et al., 2009; Thompson et al., 2015). Based on the toxicity to the used standard test organisms, herbicides were the predominant pesticides in our streams. Mecoprop was found to negatively affect leaf-associated biomass of an aquatic hyphomycete species (Bermingham et al., 1998), but this effect occurred at concentrations at least >1000 times higher than those occurring in our streams (Table S1). Two herbicides, paraquat and 2,4-DB, did not inhibit the growth of three aquatic hyphomycetes at concentrations below 10 mg l⁻¹ (Chandrashekar & Kaveriappa, 1989). Freshwater hyphomycetes appear to be relatively tolerant to glyphosate (the second most frequent pesticide in our streams). Fungicides generally produced effects on fungal activity and leaf breakdown at concentrations lower than the other pesticides, but these concentrations were again found to be higher than those in our agricultural streams (Chandrashekar & Kaveriappa, 1989). In contrast with our study, Rasmussen et al. (2012b) reported a 50% reduction in microbial leaf breakdown rate in streams affected by a mixture of pesticides comprising fungicides at relatively high toxicity levels. However, this result relied

on reference streams located in forested areas versus impacted streams in agricultural areas, thus differing from our study all based on the agricultural streams. We cannot thus preclude that background levels of toxicants (as well as other stressors) occurred even in our less impacted streams, which are normally not present in forested streams. An additional factor of discrepancy in Rasmussen et al. (2012a) is the nature of leaf litter, beech, a refractory species compared to the labile alder. Refractory leaf species are often reported to exacerbate the response to stressors (e.g. Lecerf et al., 2005). Leaf-associated microorganisms in Rasmussen et al. (2012a) were limited in assimilable carbon resource, which could have made them more sensitive to pesticide contamination leading to lower k_{microbe} in contaminated streams. Moreover, due to their slower breakdown, the exposure of beech leaf litter in the contaminated stream was longer, further enhancing the response to contamination. Artigas et al. (2012) reported impaired structure and functioning of leaf-associated microbial communities due to tebuconazole, a fungicide also found in our streams but at concentrations ca. 50 lower (Table S1). Our streams contained four compounds (azoxystrobin, carben-dazim, epoxiconazole and tebuconazole), which, based on the same extrapolation as in Rasmussen et al. (2012a) for fungicide toxicity to aquatic fungi (Dijksterhuis et al., 2011), exhibited moderate toxicity to fungi within a relatively narrow range across our sites ($\text{mTU}_{\text{fungi}}$: -2.53 to -2.09). These intermediate values are consistent with the apparently unaltered fungal activity in our study, being further supported by a plausibly higher resistance of both structure and functioning of aquatic hyphomycete to fungicides compared to non-microbial communities (Maltby et al., 2009). In addition, the absence of effects on fungal decomposers may simply result from our study period, i.e. late winter, as fungicides are predominantly applied during spring and summer (e.g. Fernández et al., 2015) most likely resulting in the strongest effects during that time, combined with a possible higher resilience of aquatic fungi due to their short life-cycle. Nevertheless, in the absence of extensive data on aquatic hyphomycete sensitivity to fungicides, it must be pointed out that standard algae toxicity tests and even the existing fungal data in the literature (Dijksterhuis et al., 2011; aquatic fungi, but not aquatic hyphomycetes) may not reflect fungicide toxicity to leaf-associated fungal decomposers and

should be used with caution. As an illustration, a recent study showed microbial endpoints related to leaf litter breakdown to be drastically more sensitive towards fungicides than standard algae toxicity tests (Zubrod et al., 2015). Relying on total fungicide concentrations instead of $\text{mTU}_{\text{algae}}$ did not however result in any significant correlation against microbial/fungal endpoints of our dataset (data not shown). In contrast to the apparently low fungal sensitivity, the invertebrates that ingest mycelia exposed to pesticides generally show much more depressed activity and survival. This phenomenon is exacerbated by compensatory mechanisms when shredders increase their consumption of leaves due to reduced nutritional quality caused by lower leaf-associated microbial biomass (Rasmussen et al., 2012c). In our streams, however, no depressed biomass of fungal decomposers was observed and a slight stimulation of fungal reproductive activity was even detected, which may indirectly result from depressed grazing by leaf-associated macroinvertebrates. In addition, an influence of modified fungal community structure, i.e. modified nutritional resource for shredders (Gonçalves et al., 2014), cannot be precluded. The higher abundance of *F. curvula*, a highly palatable species, together with the lower abundance of *L. aquatica* and *T. marchalianum*, two unpalatable species, in the most contaminated streams (Table S2) would tend to nutritionally compensate for the unfavourable environment. All these suggest that the deleterious effects on invertebrate decomposers were more related to their direct exposure to pesticides than affected by trophic cascades.

While microbial-driven breakdown was unaffected by our gradient of pesticides, this lack of sensitivity was apparently further supported by the absence of correlation between TUs and both leaf-associated fungal biomass and conidial production rate. Correlation of conidial production rate with both $\text{mTU}_{\text{algae}}$ and $\text{sTU}_{\text{algae}}$ in our study was however close to be significant ($P = 0.077$ and 0.060 , respectively), with the positive relationships showing that the reproductive activity of fungi tended to be stimulated by an increased pesticide toxicity to algae. The same stimulatory effect of various toxicants, sometimes at high concentrations, on conidial production rate has been reported in the literature, e.g. with copper (Roussel et al., 2008). This has generally been attributed to the lower competition for substrate and/or lower predation

by invertebrates (Bärlocher, 1980). Both mechanisms may have been involved here. Some herbicides were present at high levels in our streams (e.g. acetochlor, mTU_{algae} : 0.80), most probably inducing a lower development of algae (Morin et al., 2010) and a decreased competition with fungi in their colonization of leaf blades. Besides, the strongly depressed abundance of shredders (together with other functional feeding groups such as scrapers) in our most contaminated streams may have led to a reduced pressure on the development of reproductive structures and conidial release from leaf surfaces. Consistently with this hypothesis, the dramatic reduction in invertebrate abundance led to an increased conidial production by aquatic hyphomycetes in the manipulated stream reaches that received the insecticide methoxychlor (Suberkropp & Wallace, 1992). In microcosm studies, aquatic hyphomycetes even show enhanced growth at low insecticide concentrations, i.e. values however exceeding by several orders of magnitude the concentrations found in the present study. The same stimulation has been reported with other pesticides (e.g. herbicide; Tsui et al., 2001) as well as other toxicants, suggesting that fungi may use them as sources for their metabolism. Nevertheless, it must be stressed that these stimulatory effects were unlikely on fungal biomass, whereas they probably affected reproductive activity, and they did not translate into enhanced microbial-driven breakdown rate.

In their review, Peters et al. (2013) concluded that the reduction in leaf breakdown due to toxicants was generally more pronounced in studies when invertebrate occurred compared to those where microorganisms were the only decomposers. The imbalance between leaf litter decomposers was markedly evident in our streams where the abatement in invertebrates' involvement along the pesticide gradient was not paralleled by a drop in microbial contribution. The loss of invertebrates' contribution was not compensated by an increased activity of microorganisms. It must be emphasized that leaf-associated bacterial activity was not assessed in our study and differential responses of bacteria and fungi, which may eventually result in stable microbial-driven breakdown, cannot be ruled out. Bacterial leaf decomposers are generally reported to occur at late decomposition stages (Baldy et al., 2007), and thus the interference of bacteria with fungi or other decomposers was unlikely and bacterial contribution to leaf processing probably marginal

during our experimental period. As a consequence of the unbalanced decomposers response, $k_{total}/k_{microbe}$ and $k_{invertebrate}/k_{microbe}$ ratios were found to be particularly appropriate to describe the functional impairment. This was also supported by the very high correlation between these ratios and TUs in our streams. Detecting changes in relative contribution of decomposers in ecosystem function even in cases of apparently unaltered rate (i.e. when the activities of decomposer types are compensated each other) strongly argue for the application of such metrics in stream health monitoring.

The effects of pesticides on leaf decomposers and breakdown rates were similarly pronounced when toxicity was expressed in cumulative (sTU) and peak (mTU) terms. Consistently with previous findings (e.g. Von der Ohe et al., 2009), this suggests that one pesticide drove most of the TUs even though the pre-eminently toxic pesticides differed among our streams (data not shown). Overall this may imply a simply additive effect of the various pesticides, as supported by results on fungicide/insecticide combined effect on leaf-associated fungi and shredder (Flores et al., 2014). Again, using proper tests involving leaf-associated fungal decomposers, especially when considering both direct and indirect effects to higher trophic level, i.e. shredders (Zubrod et al., 2015), may lead to a more realistic picture of fungicide toxicity. Interestingly, $SPEAR_{pesticide}$ was also strongly related to pesticide contamination (Liess & Von der Ohe, 2005) with the identification to family level being sufficient to detect impact (Beketov et al., 2013), which gives credit to insights into the functional structure of macroinvertebrate assemblages with regard to toxic effects. Breakdown rates and $SPEAR_{pesticide}$ were, however, not correlated as in Schäfer et al. (2007). This lack of correlation was due to a single site, Bergon (S10), which exhibited diversified macroinvertebrate assemblages on leaf litter (Table S3), despite its heavy contamination resulting in the second highest value of $SPEAR_{pesticide}$ in our dataset. Moreover, the consideration of invertebrates associated with decomposing leaves in our study, and not the whole invertebrate community presumably more representative of the exposure to pesticides (Schäfer et al., 2007), may explain the (slight) discrepancy between both studies. Indeed, while both breakdown rates and $SPEAR_{pesticide}$ calculated from litterbags responded to pesticide

contamination measured in our sites, this finding should be taken with caution since both metrics can be influenced by confounding factors like morphological habitat degradation (Bunzel et al., 2013) or other anthropogenic disturbances (Hagen et al., 2006; Englert et al., 2015). It remains that the correlation of both metrics with pesticide contamination strongly suggests that pesticides were the main stressors in our agricultural streams. In particular, ammonium, which was potentially suspected to contribute to toxicity towards invertebrates in farmland streams was not correlated with decreased breakdown rates, although concentrations at some sites [e.g. Sausse (S8)] could have been deleterious to leaf-shredding invertebrate taxa (Lecerf et al., 2006). Unlike the $SPEAR_{pesticide}$ index, a stressor-specific metric that has been demonstrated to be invaluable in situations of pesticide contamination, leaf breakdown rates respond to a wide range of chemical stressors including pesticides and other contaminants, point and diffuse pollutions as well as hydromorphological, biological and other environmental disturbances (Webster & Benfield, 1986; Gessner & Chauvet, 2002). In contrast to isolated studies on single compounds and target organisms, which fail to reproduce realistic situations, such a functional approach based on litter breakdown, an integrative ecosystem-process involving a variety of non-target organisms at different trophic levels, is particularly appropriate to evaluate ecologically relevant impacts, i.e. immediate and long-term effects of low concentrations of chemical mixtures usually present in the natural environment. In addition, we found that the impairment of the ecosystem functioning occurred along a range of pesticide concentrations all below the threshold defined by the European Union as the EC_{50} of *Daphnia* divided by an assessment factor of 100 (EEC, 1991; cf. arrow in Fig. 1), confirming that such an approach is not sufficiently sensitive to reveal ecosystem dysfunctioning (Peters et al., 2013). Our work has stressed the importance of disentangling microbial- and invertebrate-driven breakdown rates as ratios of total to microbial-driven breakdown rates were here the most pertinent metric to detect the ecosystem functioning impairment. Future research should evaluate whether this metric is similarly discriminant when using other leaf species and for other stressors, together with the relevance of other ecosystem processes, possibly involving other

non-target organisms, to assess the effect of pesticide contaminations.

Acknowledgments We thank two anonymous reviewers for their helpful comments. We are very grateful to Didier Lambrigt and Robert Fernandez for ergosterol determination and field assistance and to Margaux Saüt and coworkers from the Adour-Garonne Water Agency for providing water chemistry data. This work was financially supported by the CIFRE PhD Plan of the French Association for Research and Technology, the Adour-Garonne Water Agency, Asconit Consultants and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

References

- Alexander, A. C., J. M. Culp, K. Liber & A. J. Cessna, 2007. Effects of insecticide exposure on feeding inhibition in mayflies and oligochaetes. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26: 1726–1732.
- Artigas, J., J. Majerholc, A. Foulquier, C. Margoum, B. Volat, M. Neyra & S. Pesce, 2012. Effects of the fungicide tebuconazole on microbial capacities for litter breakdown in streams. *Aquatic Toxicology* 122–123: 197–205.
- Backhaus, T. & M. Faust, 2012. Predictive environmental risk assessment of chemical mixtures: a conceptual framework. *Environmental Science and Technology* 46: 2564–2573.
- Baldy, V., V. Gobert, F. Guérol, E. Chauvet, D. Lambrigt & J.-Y. Charcosset, 2007. Leaf litter breakdown budgets in streams of various trophic status: effects of dissolved inorganic nutrients on microorganisms and invertebrates. *Freshwater Biology* 52: 1322–1335.
- Bärlocher, F., 1980. Leaf-eating invertebrates as competitors of aquatic hyphomycetes. *Oecologia* 47: 303–306.
- Beketov, M. A., K. Foit, R. B. Schäfer, C. A. Schriever, A. Sacchi, E. Capri, J. Biggs, C. Wells & M. Liess, 2009. $SPEAR$ indicates pesticide effects in streams – comparative use of species- and family-level biomonitoring data. *Environmental Pollution* 157: 1841–1848.
- Beketov, M. A., B. J. Kefford, R. B. Schäfer & M. Liess, 2013. Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 11039–11043.
- Bermingham, S., P. Fisher, A. Martin, M. Marriott & H. Lappin-Scott, 1998. The effect of the herbicide mecoprop on *Heliscus lugdunensis* and its influence on the preferential feeding of *Gammarus pseudolimnaeus*. *Microbial Ecology* 35: 199–204.
- Brock, T. C., G. H. Arts, L. Maltby & P. J. Van den Brink, 2006. Aquatic risks of pesticides, ecological protection goals, and common aims in European Union legislation. *Integrated Environmental Assessment and Management* 2: 20–46.
- Bundschuh, M., J. P. Zubrod, P. Klemm, D. Elsaesser, C. Stang & R. Schulz, 2013. Effects of peak exposure scenarios on *Gammarus fossarum* using field relevant pesticide mixtures. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 95: 137–143.
- Bunn, S. E. & P. M. Davies, 2000. Biological processes in running waters and their implications for the assessment of ecological integrity. *Hydrobiologia* 422(423): 61–70.

- Bunzel, K., M. Kattwinkel & M. Liess, 2013. Effects of organic pollutants from wastewater treatment plants on aquatic invertebrate communities. *Water Research* 47: 597–606.
- Campos, D., A. Alves, M. F. L. Lemos, A. Correia, A. M. V. M. Soares & J. L. T. Pestana, 2014. Effects of cadmium and resource quality on freshwater detritus processing chains: a microcosm approach with two insect species. *Ecotoxicology* 23: 830–839.
- Carlisle, D. M. & W. H. Clements, 2005. Leaf litter breakdown, microbial respiration and shredder production in metal-polluted streams. *Freshwater Biology* 50: 380–390.
- Chandrashekar, K. R. & K. M. Kaveriappa, 1989. Effect of pesticides on the growth of aquatic hyphomycetes. *Toxicology Letters* 48: 311–315.
- Chauvet, E., 1990. Hyphomycètes aquatiques du sud-ouest de la France. *Gaussenia* 6: 3–31.
- Cheng, Z. L., P. Andre & C. Chiang, 1997. Hyphomycetes and macroinvertebrates colonizing leaf litter in two Belgian streams with contrasting water quality. *Limnetica* 13: 57–63.
- Dalton, S. A., M. Hodgkinson & K. A. Smith, 1970. Interactions between DDT and river fungi. *Applied Microbiology* 20: 662–666.
- Dijksterhuis, J., T. Van Doorn, R. Samson & J. Postma, 2011. Effects of seven fungicides on non-target aquatic fungi. *Water, Air, and Soil Pollution* 222: 421–425.
- ECOTOX Database. US Environmental Protection Agency [available on internet at http://cfpub.epa.gov/ecotox/ecotox_home.cfm].
- EEC, 1991. Council Directive of 15 July 1991 Concerning the Placing of Plant Protection Products on the Market (91/414/EEC).
- Elosegi, A. & S. Sabater, 2013. Effects of hydromorphological impacts on river ecosystem functioning: a review and suggestions for assessing ecological impacts. *Hydrobiologia* 712: 129–143.
- Englert, D., J. P. Zubrod, R. Schulz & M. Bundschuh, 2015. Variability in ecosystem structure and functioning in a low order stream: implications of land use and season. *Science of the Total Environment* 538: 341–349.
- Fernández, D., K. Voss, M. Bundschuh, J. P. Zubrod & R. B. Schäfer, 2015. Effects of fungicides on decomposer communities and litter decomposition in vineyard streams. *Science of the Total Environment* 533: 40–48.
- Ferreira, V., V. Gulis & M. A. S. Graça, 2006. Whole-stream nitrate addition affects litter decomposition and associated fungi but not invertebrates. *Oecologia* 149: 718–729.
- Ferreira, V., B. Castagneyrol, J. Koricheva, V. Gulis, E. Chauvet & M. A. S. Graça, 2015. A meta-analysis of the effects of nutrient enrichment on litter decomposition in streams. *Biological Reviews* 90: 669–688.
- Flores, L., Z. Banjac, M. Farré, A. Larrañaga, E. Mas-Martí, I. Muñoz, D. Barceló & A. Elosegi, 2014. Effects of a fungicide (imazalil) and an insecticide (diazinon) on stream fungi and invertebrates associated with litter breakdown. *Science of the Total Environment* 476–477: 532–541.
- Gessner, M. O., 2005. Ergosterol as a measure of fungal biomass. In Graça, M. A. S., F. Bärlocher & M. O. Gessner (eds), *Methods to Study Litter Decomposition*. Springer, Dordrecht: 189–195.
- Gessner, M. O. & E. Chauvet, 1993. Ergosterol-to-biomass conversion factors for aquatic hyphomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 502–507.
- Gessner, M. O. & E. Chauvet, 2002. A case for using litter breakdown to assess functional stream integrity. *Ecological Applications* 12: 498–510.
- Gessner, M. O., F. Bärlocher & E. Chauvet, 2003. Qualitative and quantitative analysis of aquatic hyphomycetes in streams. In Tsui, C. K. M. & K. D. Hyde (eds), *Freshwater Mycology*. Fungal Diversity Press, Hong Kong: 127–157.
- Gonçalves, A. L., E. Chauvet, F. Bärlocher, M. A. S. Graça & C. Canhoto, 2014. Top-down and bottom-up control of litter decomposers in streams. *Freshwater Biology* 59: 2172–2182.
- Gulis, V., L. Marvanová & E. Descals, 2005. An illustrated key to the common temperate species of aquatic hyphomycetes. In Graça, M. A. S., F. Bärlocher & M. O. Gessner (eds), *Methods to Study Litter Decomposition*. Kluwer Academic, Dordrecht: 153–167.
- Hagen, E. M., J. R. Webster & E. F. Benfield, 2006. Are leaf breakdown rates a useful measure of stream integrity along an agricultural landuse gradient? *Journal of the North American Benthological Society* 25: 330–343.
- Hladysz, S., S. D. Tiegs, M. O. Gessner, P. S. Giller, G. Rîșnoveanu, E. Preda, M. Nistorescu, M. Schindler & G. Woodward, 2010. Leaf-litter breakdown in pasture and deciduous woodland streams: a comparison among three European regions. *Freshwater Biology* 55: 1916–1929.
- Kominoski, J. S., L. B. Marczak & J. S. Richardson, 2011. Riparian forest composition affects stream litter decomposition despite similar microbial and invertebrate communities. *Ecology* 92: 151–159.
- Kreutzweiser, D. P., D. G. Thompson & T. A. Scarr, 2009. Imidacloprid in leaves from systemically treated trees may inhibit litter breakdown by non-target invertebrates. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 1053–1057.
- Lecerf, A. & E. Chauvet, 2008. Diversity and functions of leaf-decaying fungi in human-altered streams. *Freshwater Biology* 53: 1658–1672.
- Lecerf, A., M. Dobson, C. K. Dang & E. Chauvet, 2005. Riparian plant species loss alters trophic dynamics in detritus-based stream ecosystems. *Oecologia* 146: 432–442.
- Lecerf, A., P. Usseglio-Polatera, J.-Y. Charcosset, D. Lambrigt, B. Bracht & E. Chauvet, 2006. Assessment of functional integrity of eutrophic streams using litter breakdown and benthic macroinvertebrates. *Archiv für Hydrobiologie* 165: 105–126.
- Liess, M. & P. C. Von der Ohe, 2005. Analyzing effects of pesticides on invertebrate communities in streams. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 954–965.
- Liess, M., R. B. Schäfer & C. A. Schriever, 2008. The footprint of pesticide stress in communities-species traits reveal community effects of toxicants. *Science of the Total Environment* 406: 484–490.
- Maltby, L., T. C. M. Brock & P. J. Van Den Brink, 2009. Fungicide risk assessment for aquatic ecosystems: importance of interspecific variation, toxic mode of action, and exposure regime. *Environmental Science and Technology* 43: 7556–7563.
- Morin, S., S. Pesce, A. Tlili, M. Coste & B. Montuelle, 2010. Recovery potential of periphytic communities in a river

- impacted by a vineyard watershed. *Ecological Indicators* 10: 419–426.
- Palmer, M. A. & C. M. Febria, 2012. The heartbeat of ecosystems. *Science* 336: 1393–1394.
- Pascoal, C., F. Cássio & P. Gomes, 2001. Leaf breakdown rates: a measure of water quality? *International Review of Hydrobiology* 86: 407–416.
- Pestana, J. L. T., A. C. Alexander, J. M. Culp, D. J. Baird, A. J. Cessna & A. M. V. M. Soares, 2009. Structural and functional responses of benthic invertebrates to imidacloprid in outdoor stream mesocosms. *Environmental Pollution* 157: 2328–2334.
- Peters, K., M. Bundschuh & R. B. Schäfer, 2013. Review on the effects of toxicants on freshwater ecosystem functions. *Environmental Pollution* 180: 324–329.
- Piscart, C., S. Navel, C. Maazouzi, B. Montuelle, J. Cornut, F. Mermillod-Blondin, M. Creuze des Chatelliers, L. Simon & P. Marmonier, 2011. Leaf litter recycling in benthic and hyporheic layers in agricultural streams with different types of land use. *Science of the Total Environment* 409: 4373–4380.
- Rasmussen, J. J., P. Wiberg-Larsen, A. Baattrup-Pedersen, R. J. Monberg & B. Kronvang, 2012a. Impacts of pesticides and natural stressors on leaf litter decomposition in agricultural streams. *Science of the Total Environment* 416: 148–155.
- Rasmussen, J. J., P. Wiberg-Larsen, A. Baattrup-Pedersen, N. Friberg & B. Kronvang, 2012b. Stream habitat structure influences macroinvertebrate response to pesticides. *Environmental Pollution* 164: 142–149.
- Rasmussen, J. J., R. J. Monberg, A. Baattrup-Pedersen, N. Cedergreen, P. Wiberg-Larsen, B. Strobel & B. Kronvang, 2012c. Effects of a triazole fungicide and a pyrethroid insecticide on the decomposition of leaves in the presence or absence of macroinvertebrate shredders. *Aquatic Toxicology* 118–119: 54–61.
- Reyjol, Y., C. Argillier, W. Bonne, A. Borja, A. D. Buijse, A. C. Cardoso, M. Daufresne, M. Kernan, M. T. Ferreira, S. Poikane, N. Prat, A.-L. Solheim, S. Stroffek, P. Usseglio-Polatera, B. Villeneuve & W. van de Bund, 2014. Assessing the ecological status in the context of the European Water Framework Directive: where do we go now? *Science of the Total Environment* 497–498: 332–344.
- Roussel, H., E. Chauvet & J.-M. Bonzom, 2008. Alteration of leaf decomposition in copper-contaminated freshwater mesocosms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27: 637–644.
- Schäfer, R. B., T. Caquet, K. Siimes, R. Mueller, L. Lagadic & M. Liess, 2007. Effects of pesticides on community structure and ecosystem functions in agricultural streams of three biogeographical regions in Europe. *Science of the Total Environment* 382: 272–285.
- Schäfer, R. B., M. Bundschuh, D. A. Rouch, E. Szöcs, P. C. Von der Ohe, V. Pettigrove, R. Schulz, D. Nugegoda & B. J. Kefford, 2012a. Effects of pesticide toxicity, salinity and other environmental variables on selected ecosystem functions in streams and the relevance for ecosystem services. *Science of the Total Environment* 415: 69–78.
- Schäfer, R. B., P. C. Von der Ohe, J. Rasmussen, B. J. Kefford, M. A. Beketov, R. Schulz & M. Liess, 2012b. Thresholds for the effects of pesticides on invertebrate communities and leaf breakdown in stream ecosystems. *Environmental Science and Technology* 46: 5134–5142.
- Schwarzenbach, R. P., B. I. Escher, K. Fenner, T. B. Hofstetter, C. A. Johnson, U. von Gunten & B. Wehrli, 2006. The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science* 313: 1072–1077.
- Suberkropp, K. & J. B. Wallace, 1992. Aquatic hyphomycetes in insecticide-treated and untreated streams. *Journal of the North American Benthological Society* 11: 165–171.
- Tachet, H., P. Richoux, M. Bournaud & P. Usseglio-Polatera, 2010. *Invertébrés d'eau douce: systématique, biologie, écologie*. CNRS Editions, Paris. 600 pp.
- Thompson, M. S. A., C. Bankier, T. Bell, A. J. Dumbrell, C. Gray, M. E. Ledger, K. Lehmann, B. A. McKew, C. D. Sayer, F. Shelley, M. Trimmer, S. L. Warren & G. Woodward, 2015. Gene-to-ecosystem impacts of a catastrophic pesticide spill: testing a multilevel bioassessment approach in a river ecosystem. *Freshwater Biology*. doi:10.1111/fwb.12676.
- Tsui, C. K. M., K. D. Hyde & I. J. Hodgkiss, 2001. Effects of glyphosate on lignicolous freshwater fungi of Hong Kong. *Sydowia* 200: 167–174.
- University of Hertfordshire, 2013. The Pesticide Properties Database (PPDB). Agriculture and Environment Research Unit (AERU), University of Hertfordshire: 2006–2013.
- Von der Ohe, P. C. & W. Goedkoop, 2013. Distinguishing the effects of habitat degradation and pesticide stress on benthic invertebrates using stressor-specific metrics. *Science of the Total Environment* 444: 480–490.
- Von der Ohe, P. C., E. De Deckere, A. Prüss, I. Muñoz, G. Wolfram, M. Villagrasa, A. Ginebreda, M. Hein & W. Brack, 2009. Toward an integrated assessment of the ecological and chemical status of European river basins. *Integrated Environmental Assessment and Management* 5: 50–61.
- Wasson, J.-G., A. Chandesris, H. Pella & L. Blanc, 2002. Les hydro-écorégions de France métropolitaine approche régionale de la typologie des eaux courantes et éléments pour la définition des peuplements de référence d'invertébrés. Cemagref report, 190 pp.
- Webster, J. R. & E. F. Benfield, 1986. Vascular plant breakdown in fresh-water ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics* 17: 567–594.
- Wieder, R. K. & G. E. Lang, 1982. A critique of the analytical methods used in examining decomposition data obtained from litter bags. *Ecology* 63: 1636–1642.
- Woodward, G., M. O. Gessner, P. S. Giller, V. Gulis, S. Hladysz, A. Lecerf, B. Malmqvist, B. G. McKie, S. D. Tiegs, H. Cariss, M. Dobson, A. Eloegi, V. Ferreira, M. A. S. Graça, T. Fleituch, J. O. Lacoursière, M. Nistorescu, J. Pozo, G. Risnoveanu, M. Schindler, A. Vadineanu, L. B.-M. Vought & E. Chauvet, 2012. Continental-scale effects of nutrient pollution on stream ecosystem functioning. *Science* 336: 1438–1440.
- Zubrod, J. P., D. Englert, A. Feckler, N. Koksharova, M. Kon-schak, R. Bundschuh, N. Schnetzer, K. Englert, R. Schulz & M. Bundschuh, 2015. Does the current fungicide risk assessment provide sufficient protection for key drivers in aquatic ecosystem functioning? *Environmental Science and Technology* 49: 1173–1181.

TITLE:

Evaluation of the functional integrity of lotic ecosystems in southwestern France

ABSTRACT:

The aim of this thesis was to document, at regional scale (SW France), the application of litter decomposition and associated metrics as a proxy of functional integrity of stream ecosystems. The Introduction exposed the underlying arguments, mainly relying on (1) the importance of this ecosystem process, which provides most carbon sources to the aquatic food web, and (2) the need to complement the structural metrics routinely used in biomonitoring schemes by a functional component.

Chapter I dealt with the capacity, by using litter decomposition, to discriminate the effects of pesticides from other stressors in 12 agricultural streams selected along a contamination gradient. The decomposition rate was twice as low in the most contaminated site compared with the less contaminated one, and the relationship was monotonous along the gradient. Only the activity of invertebrate decomposers was affected, translating into the switch from a decomposition co-dominated by invertebrates and microorganisms in the less contaminated sites to a process only achieved by microorganisms in the most contaminated ones. Taxonomic richness and density of invertebrate decomposers together with a specific indicator based on invertebrate traits followed the same trends as the invertebrate-driven decomposition rate, kinvertebrate, while fungal biomass, sporulation rate and taxonomic richness remained unaffected. Consequently, the presence of pesticides compromised leaf breakdown, as microbial decomposers did not compensate for the invertebrate decomposers decline. This occurred while pesticides concentrations even in the most contaminated stream were under the European Union's Uniform Principles thresholds for targeted species. This study showed that litter breakdown, particularly the ratio of total to microbial-driven breakdown rate, is a pertinent proxy to assess the functional integrity of pesticide-contaminated streams.

Chapter II compared the biological evaluation, as routinely undertaken in monitoring schemes from structural indicators based on invertebrates (IBGN and I2M2) and diatoms (BDI), with the functional indication based on litter decomposition. No correlation was found between structural and functional indicators on 58 streams, whereas the 3 structural indicators were strongly correlated each other. Redundancy analysis showed a negative relationship between ktot or kinvertebrate and the proportion of cultures in the riparian corridor, while kmicrobial responded to the same environmental parameters (substratum coarseness, temperature) as structural indicators. The lack of correlation between invertebrate-based structural metrics and kinvertebrate suggested that disturbances, depending on their nature and/or intensity, differentially impair community composition and community activity in organic matter processing.

In the view of proposing functional metrics, **Chapter III** concerned the distribution patterns of decomposition parameters on our study sites together with reference sites from the literature. Strong links were detected between decomposers community, decomposition rate and environmental settings, as exemplified by positive correlations between ktot or kinvertebrate and detritivores abundance, kmicrobial and fungal biomass or sporulation rate, and the ratios ktot/kmicrobial or kinvertebrate/kmicrobial and the abundance of decomposers. We propose a rating grid of stream ecosystem functional quality crossing two entries, ktot and kinvertebrate/kmicrobial. At the regional scale, this grid shows that litter decomposition is more affected in its invertebrate component than in the microbial one.

The Discussion exposes the main results in context and opens to perspectives, particularly about the question of reference sites. In conclusion, our results strongly argue for a crossed evaluation of ecological quality of running waters, as formalized by a chart with structure × fonction double entry.

KEYWORDS: decomposition of plant litter; river; evaluation of anthropogenic impacts; functional integrity; ecological assessment

AUTEUR : **Magali Brosed**

TITRE: **Evaluation de l'intégrité fonctionnelle des écosystèmes lotiques du sud-ouest de la France**

DIRECTEUR DE THESE : **Eric Chauvet**

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : **Amphithéâtre Concorde (U4), mardi 14 juin 2016**

RESUME FRANÇAIS :

L'évaluation écologique des cours d'eau ne prend pas en compte les différents processus qui y sont réalisés, faute d'indicateur disponibles. L'objectif de cette thèse a été de documenter l'utilisation de la décomposition des litières végétales d'origine terrestre comme indicateur de l'intégrité fonctionnelle des rivières de plaine et de piedmont suivies par l'Agence de l'Eau Adour-Garonne.

Partie 1. Sur une douzaine de sites suivis pour la pollution par les pesticides, le taux de décomposition est divisé par deux entre le site le moins et le plus contaminé, entraînant le passage d'une décomposition co-assurée par les invertébrés et les microorganismes dans les sites les moins contaminés à un processus réalisé seulement par les microorganismes dans les sites les plus contaminés, compromettant le processus dans les rivières les plus contaminées. Cette altération est observée à des concentrations en pesticides pourtant inférieures aux seuils fixés par l'Union Européenne.

Partie 2. Sur 58 sites qui maximisent l'amplitude des classes de qualité écologiques, l'absence de corrélation observée entre les indices biologiques basés sur les invertébrés (IBGN, I2M2) et les diatomées (IBD) et le processus de décomposition suggère que les perturbations, selon leur nature et/ou leur intensité, altèrent différenciellement la composition des communautés et les activités de transformation de la matière organique.

Partie 3. Une grille d'évaluation de la qualité fonctionnelle des rivières croisant deux variables, k_{total} et le ratio $k_{invertébré}/k_{microbien}$ est proposée à partir de 84 sites de suivi et de sites de référence tirés de la bibliographie. Cette grille montre qu'à l'échelle régionale, le processus de décomposition est plus affecté dans sa composante liée à l'activité des invertébrés qu'à celle liée aux microorganismes. En suivant les critères d'évaluation de la Directive Cadre sur l'Eau, cette grille d'évaluation met en évidence que seulement 28 % des sites étudiés atteindraient un bon état fonctionnel.

Cette thèse a permis de documenter la réflexion menée sur le développement d'indicateurs fonctionnels et plaide pour l'inclusion de la décomposition des litières végétales dans l'évaluation écologique par une approche croisée, telle que formalisée par un graphique structure x fonction à double entrée.

MOTS CLES : **décomposition des litières végétales ; rivière ; impacts anthropiques ; intégrité fonctionnelle ; évaluation écologique**

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : **Ecologie Fonctionnelle**

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

EcoLab - Laboratoire écologie fonctionnelle et environnement (UMR 5245 CNRS-UPS-INPT), Bât. 4R1 - Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse.