



HAL
open science

Effets des changements environnementaux sur le fonctionnement des ruisseaux de tête de bassin versant

Alice Gossiaux

► **To cite this version:**

Alice Gossiaux. Effets des changements environnementaux sur le fonctionnement des ruisseaux de tête de bassin versant. Sciences de l'environnement. Université de Lorraine, 2019. Français. NNT : 2019LORR0260 . tel-02558265

HAL Id: tel-02558265

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02558265>

Submitted on 29 Apr 2020

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Laboratoire Interdisciplinaire des
Environnements Continentaux (LIEC)
UMR 7360 CNRS Université de Lorraine
Campus Bridoux, rue du Général Delestraint
Metz

Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie des
Ressources Naturelles (SiReNa n°607)
Campus ARTEM – Mines Nancy
2, rue Léonard de Vinci
Nancy

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

Spécialité : Écotoxicologie, Biodiversité, Écosystèmes

Alice GOSSIAUX

Effets des changements environnementaux
sur le fonctionnement des ruisseaux de tête
de bassin versant

Sous la direction de François GUÉROLD et Pascal POUPIN

Soutenance prévue le 29 novembre 2019 au LIEC, Metz

Jury :

François GUÉROLD, Professeur, LIEC, UMR CNRS 7360, Université de Lorraine, Metz	Directeur
Pascal POUPIN, Maître de conférences, LIEC, UMR CNRS 7360, Université de Lorraine, Metz	Co-directeur
Virginie BALDY, Professeur, IMBE, UMR CNRS 7263, IRD 237, Aix-Marseille Université, Marseille	Rapporteur
Cristina CANHOTO, Professeur, MARE, Université de Coimbra, Coimbra, Portugal	Rapporteur
Urania CHRISTAKI, Professeur, LOG, UMR 8187, Université du Littoral Côte d'Opale, Wimereux	Examineur
Eric CHAUVET, Directeur de recherches, EcoLab, UMR5245, Université Paul Sabatier, Toulouse	Examineur

A tous les amoureux de la nature

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier très chaleureusement mes chers directeurs, François Guérol et Pascal Poupin, **pour m'avoir** offert un sujet de thèse passionnant, un cadre **de confiance et d'ouverture d'esprit à mes idées**, à mes interrogations et à mes doutes, mais aussi une grande autonomie dans les tâches scientifiques **qui m'étaient confiées**.

Je voudrais aussi remercier Philippe Wagner, mon partenaire de terrain et guide des Vosges, **pour m'avoir si souvent accompagnée, indépendamment des conditions** (météorologiques ou autres), sur ce vaste et magnifique terrain de jeu. Ces sorties **avec toi étaient des bouffées d'oxygène pur**, confidences et réflexions philosophiques incluses, tellement bénéfiques pour l'esprit.

Je tiens également à exprimer toute ma gratitude à Eric Chauvet, sans qui cette thèse **n'aurait pas vu le jour, pour** sa disponibilité, ses encouragements et sa bienveillance envers moi tout au long de **l'ANR FunctionalStreams**, auquel ce fut un honneur de participer. Un grand merci **d'avoir accepté de faire partie** de mon jury.

Mes plus vifs remerciements vont également aux trois femmes qui ont accepté de faire partie de mon jury : à Urania Christaki, pour ses conseils avisés et son soutien lors de mon comité de suivi ; à Cristina Canhoto, pour son accueil **d'exception** à Coimbra, les moments toujours joyeux de chacune de nos rencontres ; et à Virginie Baldy, dont **j'espère éveiller la curiosité** sur mes travaux et être à la hauteur des attentes.

Un grand merci à **Laure Giambérini pour m'avoir accueilli** au sein du LIEC, ainsi **qu'aux différentes** personnes croisées au laboratoire. En particulier : Baba Camara, Michael Danger, Vincent Felten, Martin Laviale, Philippe Rousselle (merci pour les sorties astro !), Jean-François Poinstaint, Simon Devin, Sandrine Pain-Devin, Delphine Aran, Bénédicte Sohm, Etienne Morhain, Danielle Pauly, Clément Bojic, Philippe Usseglio-Polatéra, Elisabeth Gross, Florence Manoury-Danger, Elise Billoir, Davide Vignati et Eric Battaglia. Un tout grand merci à Maryline Georgen, pour **s'être occupée de moi comme une** maman-poule au labo, à Romuald Charpentier pour avoir pris le relai, et à Nathalie Nauer pour son sourire et ses petites attentions au quotidien.

Mes remerciements vont également à **toute l'équipe d'EcoLab**, en particulier Franck Gilbert, Eric Chauvet, Jérémy Jabiol, Régine Saur, Sylvain Lamothe, Didier Lambrigtot et Thibaut Rota pour leur accueil chaleureux lors de mes visites plus ou moins longues dans leur laboratoire à Toulouse.

Jérémy, merci mille fois **de m'avoir, tel le lapin blanc d'un célèbre dessin animé,** entraîné dans le **monde merveilleux des spores d'hyphomycètes aquatiques** formolées. Quelle chance que tu débarques au LIEC, ah je comprends pourquoi Titi

était si triste ! **Je n'ai jamais pris sa place de chouchou** (Saboteur !), même en apportant du brownie presque toutes les semaines, mais **j'ai quand même pris l'avantage** sur la distance entre bureaux. **Et j'en ai bien profité** : « Jérem, café ? » et puis une fois en bas : « **Au fait, j'ai une question...** » (Saboteuse ^^). **Merci d'avoir été si souvent là pour moi, un peu comme un troisième encadrant de thèse avec qui on fait des blagues graveleuses. Mon seul regret, le jukebox bloqué sur Dutronc ^^.**

A big thanks to the international conferences buddies, Scott for the guided tour of Detroit, Hal, Cody and Tori for the coffees, and André, Andi and Fanny for the amazing nights in Bilbao.

*Un grand merci aux copains du labo : Chaton, Fannouille, 6-6-6, Alonzizié, Saboteur!, Crecre, Max, Wikipéden, Nanou, toujours prêts à aider, et tout particulièrement Boule(s) **d'acier**, Migwel, Boobsié, Momo, Raviol, Milouse, TiteTige, Patate, Céline, Bouquy, Jen et Mamad, pour le soutien inconditionnel, les balades en forêt, en ville ou en voiture, avec sur les épaules un sac à dos, un sac de courses, une valise ou un **canap'**, et pour tous les moments de folie vécus ensemble. **J'en** garde des souvenirs inoubliablement doux.*

***Enfin, je voudrais remercier du fond du cœur** les copains venus de loin, à qui **l'augure de Metz n'a pas fait peur, et qui sont venus découvrir la vérité sur cette ville géniale** : Mon Potit, E. Brouillet, Pij, Poopette, Vomito et LN. Et à ceux qui ont raté leur chance pour venir : ChtiTroll, Ben & Baiott. Un grand merci à ma famille, Mams, Chloé et Oriane **que j'ai bercé doucement jusqu'à l'endormissement en parlant de ma thèse & Doutchy** (le seul survivant à cette vague soporifique) ; à mes grands-parents pour leur soutien ; à **ma marraine d'être venue me voir et** à ma Tante Tessa, pour leur intérêt concernant mes « découvertes », mes réflexions et le partage de discussions enrichissantes.*

Et bien sûr, ma dernière pensée est pour toi, ma petite étoile ☆

RÉSUMÉ

Dans le contexte actuel des changements environnementaux, de nombreuses pressions **menacent le fonctionnement et l'intégrité** des milieux naturels. Parmi ces pressions, **l'augmentation des températures et les modifications de la disponibilité des nutriments sont au cœur des préoccupations**, en particulier concernant les **écosystèmes aquatiques d'eau douce**. Pour les ruisseaux de tête de bassin versant, qui sont des écosystèmes fragiles dont le fonctionnement est déterminant pour les masses **d'eau situées à l'aval**, les conséquences de ces changements sont primordiales à anticiper afin de prévoir des mesures de gestion et de conservation de ces milieux qui rendent de nombreux services écosystémiques. Le fonctionnement de **ces cours d'eau** repose principalement sur la **décomposition de matière organique d'origine allochtone, qui constitue l'apport majeur de carbone** des réseaux trophiques benthiques. Dans une moindre mesure, la production primaire y est représentée par les organismes autotrophes du biofilm.

En utilisant différentes approches (microcosmes, mésocosmes, *in natura*), les travaux de cette thèse visent **d'abord** à comprendre comment les compartiments microbiens et macro-invertébrés, **impliqués dans le fonctionnement des cours d'eau de tête de bassin, réagissent à l'augmentation des températures**, puis tentent d'en démêler les effets conjoints de la modification de la disponibilité en nutriments, de la saisonnalité, **de l'identité des espèces** et des interactions biotiques sous-jacentes.

Les résultats obtenus lors de cette thèse démontrent que la température et les nutriments ont des effets complexes—potentiellement faibles, non-linéaires et parfois opposés aux résultats de la littérature—sur les processus de décomposition des litières dans les cours **d'eau. De plus, ces travaux soulignent l'importance** de considérer les effets saisonniers et la dynamique temporelle pour mieux appréhender les processus mesurés en milieux naturels ou semi-naturels. **Enfin, l'identité** des espèces (litières, micro- et macro-organismes), leur rôle dans la communauté (groupes fonctionnels) et leurs interactions (antagonistes, facilitatrices) jouent un rôle clef dans la variabilité des réponses observées, **en modulant, par exemple, l'importance de la voie brune et verte** dans le fonctionnement de ces systèmes.

Finalement, la variabilité des effets **de l'augmentation de la température et de la disponibilité en nutriments sur le fonctionnement des cours d'eau de tête de bassin versant, fortement liée au contexte et au niveau d'organisation** biologique, ouvre de nombreuses perspectives de recherche, et notamment dans le cadre des sciences participatives.

Mots-clefs : changements environnementaux – température – nutriments – ruisseaux – décomposition des litières – production primaire – hyphomycètes aquatiques – macro-invertébrés – fonctionnement des écosystèmes – saisons – interactions

ABSTRACT

In the current context of environmental changes, many pressures threaten the functioning and integrity of natural environments. Among these pressures, concerns about increasing temperatures and changes in nutrients availability are rising, particularly for freshwater aquatic ecosystems. The consequences of these changes on headwater streams, which contribute to downstream water bodies and provide many ecosystem services, are essential to anticipate in order to plan management and conservation measures. Headwater streams functioning is mainly based on the decomposition of allochthonous organic matter, which is the major carbon input for benthic food webs. To a lesser extent, primary production is represented by the autotrophic organisms of biofilm.

Using different approaches (microcosms, mesocosms, *in natura*), this thesis aims at understanding how microbial and macro-invertebrate compartments, involved in the functioning of headwater streams, react to temperature increases, and at disentangling the combined effects of nutrients availability changes, seasonality, species identity and underlying biotic interactions.

The results of this thesis demonstrate that temperature and nutrients have complex effects on stream litter decomposition processes (potentially weak, non-linear and sometimes opposed to the results of the literature). In addition, these studies highlight the importance of taking seasonal effects and temporal dynamics into account in order to improve the understanding of the measured processes in natural or semi-natural environments. Finally, species identity (litter, micro and macro-organisms), species roles in the community (functional groups) and interactions among them (antagonists, facilitators) play a key role in the variability of observed responses, by modulating, for example, the importance of the brown and green pathways in the functioning of these systems.

Finally, the variability of the effects of temperature increase and nutrient availability on the functioning of headwater streams, which is strongly linked to the context and level of biological organization, leads to many research opportunities, and in particular for citizen science.

Keywords: environmental changes – temperature – nutrients – streams – leaf-litter decomposition – primary production – aquatic hyphomycetes – macro-invertebrates – ecosystem functioning – seasons – interactions

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	9
LISTE DES TABLES	13
INTRODUCTION.....	16
A. CONTEXTE	16
A.1. <i>Changements environnementaux</i>	16
A.2. <i>Augmentation globale de la température et effets sur la biodiversité</i>	18
A.2.1. Conséquences pour les écosystèmes	21
A.2.2. Conséquences pour les écosystèmes aquatiques	22
A.3. <i>Modification des apports azotés: de la production à la contamination des écosystèmes</i>	23
A.3.1. Importance et rôle de l'azote pour la vie	23
A.3.2. Azote réactif : production, transport et dépôts	23
A.3.3. Conséquences pour les écosystèmes	26
B. LES MILIEUX AQUATIQUES D'EAU DOUCE : DES MILIEUX MENACÉS.....	27
B.1. <i>Les cours d'eau de tête de bassin versant : des modèles adéquats pour l'évaluation des effets des perturbations anthropiques</i>	27
B.2. <i>Fonctionnement des cours d'eau de tête de bassin versant : la décomposition des litières allochtones</i>	28
B.2.1. La décomposition de la matière organique allochtone	29
B.2.2. Les acteurs de la décomposition	30
B.3. <i>Un processus clef sensible à plusieurs niveaux</i>	31
B.3.1. Flux de matière et d'énergie : cycle du carbone, réseaux trophiques.....	31
B.3.2. Influence des facteurs biotiques et abiotiques	32
C. OBJECTIFS ET PLAN DE THESE	34
CHAPITRE 1	42
<i>Abstract</i>	43
<i>Introduction</i>	44
<i>Material and methods</i>	46
<i>Results</i>	50
<i>Discussion</i>	58
<i>References</i>	62
<i>Supplementary online material</i>	68
CHAPITRE 2	74
<i>Abstract</i>	75
<i>Introduction</i>	76
<i>Material and methods</i>	77
<i>Results</i>	81
<i>Discussion</i>	89
<i>References</i>	91
CHAPITRE 3	98
<i>Abstract</i>	99
<i>Introduction</i>	101
<i>Material and methods</i>	104
<i>Results</i>	112
<i>Discussion</i>	122

References	130
Supplementary online material	135
DISCUSSION	140
A. LES PROCESSUS FONCTIONNELS DES ECOSYSTEMES AQUATIQUES FACE AUX FLUCTUATIONS DES CONTRAINTES ABIOTIQUES	140
A.1. <i>La décomposition microbienne (in natura et en mésocosmes)</i>	140
A.2. <i>La décomposition totale (mésocosmes)</i>	141
A.3. <i>Interactions des décomposeurs avec le biofilm phototrophe</i>	143
B. FACTEURS POTENTIELS A L'ORIGINE DES DIVERGENCES DE RESULTATS	146
B.1. <i>Contrôle des contraintes de température et de disponibilité en nutriments en milieu naturel</i>	146
B.2. <i>Contrôle des contraintes de température et de disponibilité en nutriments en milieu artificiel</i> ...	154
B.3. <i>Maîtrise des variables biotiques</i>	157
C. VERS UNE MEDIATION SCIENTIFIQUE	163
C.1. <i>L'expérimentation de décomposition en sacs à litières : un lien possible entre le grand public et le milieu de la recherche</i>	164
C.2. <i>Initiatives menées dans le cadre de l'ANR Functional Streams</i>	166
C.3. <i>Perspectives de développement (Comment instaurer un réseau fonctionnel ?/ Comment palier aux difficultés ?)</i>	168
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	170
REFERENCES	176
ANNEXES	186
ANNEXE 1 – ARTICLE EN COLLABORATION [ENCADRÉ 1]	187
Abstract	188
Introduction	189
Material and methods	190
Results	193
Discussion	196
References	198
ANNEXE 2 – ARTICLE EN COLLABORATION [ENCADRE 2]	200
Abstract	201
Introduction	203
Material & methods	206
Results	211
Discussion	217
References	219
ANNEXE 3 – COMPARAISON DES APPROCHES MICROSCOPIQUE ET MOLECULAIRE POUR L'IDENTIFICATION DES ESPECES FONGIQUES ASSOCIEES AUX LITIERES	224
ANNEXE 4 – POSTER PEDAGOGIQUE COLLABORATIF	225

LISTE DES FIGURES

Introduction

Figure 1. Résumé de certains des aspects prévus du changement climatique et quelques exemples de leurs effets probables sur différents niveaux de biodiversité. TSD: Détermination **thermodépendante du sexe**. **Modifié d'après** Bellard et al. 2012

Figure 2. Courbe moyenne théorique de performance thermique des ectothermes. CTmin et CTmax correspondent aux températures critiques minimales et maximales, T_{opt} à la température optimale, et E_a à l'énergie d'activation du taux métabolique.

Figure 3. Quantités mondiales de création d'azote réactif (Nr) total (en rouge), issu des procédés Haber Bosch (en vert), de la fixation biologique des cultures (en bleu) et des combustions fossiles (en orange) en TgN an⁻¹. **D'après** Galloway et al. 2003 ; Galloway et al. 2008 et IPCC 2014

Figure 4. Dépassement de la charge critique en eq ha⁻¹ a⁻¹ **d'azote en 2010 en Europe**. La charge critique est définie comme la plus forte concentration d'azote au-dessous de laquelle aucun effet néfaste n'a été observé sur les aspects structurels et fonctionnels des écosystèmes. Modifié depuis EEA (2010).

Figure 5. **Etapas de la décomposition des litières, sous l'action des micro-organismes et des macro-invertébrés** au cours desquelles les litières sont au cycle du carbone et au transfert **d'énergie dans les réseaux trophiques aquatiques**. **Adapté d'après** Chauvet & Guérolde 2015

Chapitre 1

Figure 1.1 Water temperature at the four sites (ordered by increasing distance along the stream reach) across the two study periods. Each boxplot represent 1344 temperature observations collected during the experiments (central line is median; plus sign is mean; box top and bottom are first and third quartiles; whiskers are confidence limits). Sites with the same letter do not differ significantly (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$)

Figure 1.2 Mean fungal biomass \pm SE associated with alder leaf discs incubated at the four sites along the temperature gradient across the two study periods after 21 d. Lines represent regressions with mean temperature (dashed for spring, $R^2=0.26$; solid for winter, $R^2=0$). **Points with the same letter do not differ significantly (Tukey's HSD test)**

Figure 1.3 Mean sporulation rate \pm SE of aquatic hyphomycetes associated with alder leaf discs incubated at the four sites along the temperature gradient across the two study periods after 21 d. Lines represent regressions with mean temperature (dashed for spring, $R^2=0.18$; **solid for winter, $R^2=0.36$**). **Points with the same letter do not differ significantly (Tukey's HSD test)**

Figure 1.4 Percentage contribution of aquatic hyphomycete species to total sporulation rate (a) and NMDS (b) ordination diagram based on fungal communities assessed from conidia released from alder leaf discs during 7, 14, 21 and 28 days of immersion at the four sites along the negative temperature gradient in spring 2016 and winter 2017

Figure 1.5 Mean chlorophyll-a concentration \pm SE after 28 days of immersion at the four sites along the temperature gradient across the two study periods. Lines represent regressions with mean temperature (dashed for spring, $R^2=0.67$; solid for winter, $R^2=0.38$). Points with the same letter do not differ **significantly (Tukey's HSD test)**

Figure S1.1 Temporal dynamics of fungal biomass associated with alder leaf discs incubated at the four sites along the negative temperature gradient. Values are averages \pm SE

Figure S1.2 Temporal dynamics of sporulation rate of aquatic hyphomycetes associated with alder leaf discs incubated at the four sites along the negative temperature gradient. Values are averages \pm SE

Figure S1.3 Percentage mean contribution to total sporulation rate of aquatic hyphomycete species associated with alder leaf discs after 7, 14, 21 and 28 days of immersion at the four sites along the negative temperature gradient in spring 2016 and winter 2017

Figure S1.4 Temporal dynamics of biofilm chlorophyll-a concentration on ceramic tiles measured at the four sites along the negative temperature gradient. Values are averages \pm SE

Chapitre 2

Figure 2.1 Water temperature at the four sites (ordered by increasing distance along the stream reach) across the two study periods. Each boxplot represent the temperature data collected every 30 minutes during the 42d experiments ($n=1987$ in spring and $n=2016$ in winter). Central line is median; plus sign is mean; box top and bottom are first and third quartiles; whiskers are confidence limits). Sites with the same letter do not differ significantly (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$)

Figure 2.2 Linear decomposition rates of alder (top, from Gossiaux et al. 2019) and beech (bottom) leaf disks incubated at the four sites along the negative temperature gradient. Values are averages \pm SE. Sites with the same letter do not differ significantly (ANOVA followed by Tukey HSD test; p -value <0.05)

Figure 2.3 NMDS ordination diagram based on fungal biomass (a) and sporulation rates (b) associated with alder and beech discs assessed from mean, standard deviation, maximum and day at which maximum was reached for each variable at the four sites along the negative temperature gradient in spring 2016 and winter 2017. Crosses represent centroids of ellipses and confidence limits are 0.75

Figure 2.4 Percentage contribution of aquatic hyphomycete species to total conidial production associated with alder leaf discs (a) and beech leaf discs (b) during 7, 14, 21 and 28 days and 14, 21 and 42 days of immersion (for alder and beech, respectively) at the four sites along the negative temperature gradient in spring 2016 and winter 2017

Figure 2.5 Temporal dynamics of biofilm chlorophyll-a concentration on ceramic tiles measured at the four sites along the negative temperature gradient during the 42d experiment. Values are averages \pm SE

Chapitre 3

Figure 3.1 (a) Schematic representation and dimensions of an artificial stream used for this experiment. The upstream section (1) receives water from the pump immersed in the drip tray (3). A 250 μ m mesh separate the upstream (1) and the downstream (2) sections to avoid invertebrates drift and keep the downstream section free of invertebrates. Comparison of the upstream (1) and the downstream (2) sections thus permit to evaluate top-down effects of macro-invertebrates on biofilms. (b) Picture of the two successive sections of an artificial stream: an upstream section with invertebrates separated by a 250 μ m nylon mesh from a downstream section without invertebrates.

Figure 3.2 Effects of temperature and water N:P ratios on the temporal dynamics of microbial development and activity: Fungal biomass, measured as ergosterol content per unit of leaf litter biomass (a) and sporulation rates (b) changes through time measured on leaf litter enclosed in fine mesh bags; Changes in upstream (with grazers, panels c-d) and downstream (i.e. grazers excluded, panels e-f) biofilm biomass (in mg AFDM cm⁻², panels c and e) and algal abundance (in μ g chl a cm⁻², panels d and f) through time. Error bars (n=3) correspond to SD except on the panel b (SE)

Figure 3.3 Percentage contribution of the main aquatic hyphomycete species to total conidial production (a) in the four treatments channels for each sampling date (21, 35, and 52 days) and NMDS ordination diagram based on fungal communities assessed from conidia released from hazel leaf disks after 52 days of incubation (b)

Figure 3.4 Effects of temperature and water N:P ratios on leaf litter exponential decomposition rates in fine (a) and coarse (b) mesh bags, primary production (c), and microbial decomposition to primary production ratios (d) measured during the 56 days experiment in the four treatments.

Figure 3.5 Evaluation of the invertebrate consumer impacts on rates of leaf litter decomposition (a; calculated as the ln-transformed ratio of k_{CM} on k_{FM}) and biofilm production (b; calculated as the ln-transformed ratio of biofilm pigments concentration with invertebrates (upstream) on concentration without invertebrates (downstream)) in the four different treatments. Error bars correspond to 95% confidence intervals (IC 95%)

Figure 3.6 Size distribution of gammarids at the beginning of the experiment and after 56 days of experiments in the four different treatments. Dotted line is the initial distribution, solid lines are ambient distributions, and dash lines are heated distributions. Dark and light grey represent treatments with high and low nutrients supply.

Figure S3.1 Water temperature variations in the experimental channels during the 56 days of experiment. Each line represent the temperature recorded in each channel ($^{\circ}$ C), red lines represent heated channels and blue lines ambient channels.

Figure S3.2 Mean NO₃⁻ and PO₄³⁻ concentrations variations in the experimental channels across the 56 days of experiment. Solid circles and squares represent NO₃⁻ and PO₄³⁻ concentrations (mg L⁻¹) in high nutrients channels, whereas hollow circles and squares represent NO₃⁻ and PO₄³⁻ concentrations (mg L⁻¹) in low nutrient channels. Error bars represent SE.

Discussion

Figure 6. Représentation schématique des paramètres du gradient de température (étendue, grain) de nos études *in natura* réalisées au printemps et en hiver (en haut) et exemples de résultats obtenus pour chacune des saisons (en bas).

Figure 7. Tubes et disques de cellulose (à gauche), pénétromètre (à droite)

Figure 8. **Schéma synthétique des caractéristiques (type d'étude, nombre de milieux testés, saison, niveaux de température et de nutriments testés, objets de l'étude, litière utilisée, principaux résultats, rôle dans la mise en place des études et dans la rédaction des publications et place dans la thèse) des différentes approches utilisées durant ce travail de thèse.**

Figure 9. Concentration en chlorophylle-*a* \pm SE du biofilm après 28 jours (en blanc) et après 42 jours (en gris) en fonction de la température.

Annexes

Figure A1.1 Temperature variations across seasons and regions (averaged between streams and over the experiment duration). Variance partitioning indicates the proportion of temperature variation explained by season, region and stream, respectively.

Figure A1.2 Relationships between temperature and decomposition rates in fine mesh bags (a), coarse mesh bags (b) and due to invertebrate activity (c) addressed following Lecerf 2017. Regression lines are Arrhenius regressions and dotted lines decipher the 95% confidence intervals. Activation energies (E_a) are provided with 95% confidence intervals.

Figure A1.3 Variations of decomposer (up: aquatic fungi and down: invertebrate detritivores) density (a, d) and species richness (b, e) along the temperature gradient, and NMDS (c, f) illustrating the variation of species community composition across seasons, regions and streams. Each symbol is the average of 6 replicates (in a, b, d, e), 3 replicates (in c) and 4 replicates (in f). Triangles and circles are streams from the Vosges and Montagne Noire, respectively. White: winter, green: spring, yellow: summer and orange: autumn

Figure A2.1 (a) Relationship between decomposition and respiration in the different organisms. For each organism, the 4 symbols correspond to the different temperature treatments. The slope of the regression between respiration and leaf decomposition rates is given for each organism (a_G : *Gammarus*, a_P : *Potamophylax*, a_S : *Sericostoma*, a_M : micro-organisms) together with the corresponding P-values (b) Variation of the decomposition / respiration ratio along the temperature gradient in the different organisms. Regression lines (dotted if non-significant) are provided together with the P-values of the regression. In (a), horizontal and vertical error bars are SE. To calculate errors associated with the ratio of average decomposition and respiration rates, we used a propagation of uncertainty assuming that the relative error of the ratio equals the sum of the relative errors of leaf decomposition and respiration rates

Figure A2.2 Average (\pm SE, $n = 12$) litter decomposition (a-c) and respiration rates (d-e) along the temperature gradient in microbial communities (a,d), invertebrate single species treatments (b,e), and invertebrate species mixture (c). The regression lines (Lorentzian and Arrhenius model) are provided, with the dotted line indicating non-significant fits

Figure A2.3 Average (\pm SE, $n = 12$) (a) Fungal biomass and (b) N litter concentration along the temperature gradient in different N availability treatments

Figure A2.4 Average (\pm SE, $n = 12$) litter decomposition (a-c) and respiration rates (d) along the N availability gradient in microbial communities (a,d), invertebrate single species treatments (b), and invertebrate species mixture (c). Stars indicate the N treatments for which

the response variable significantly differ from each other for a given decomposer assemblage (TukeyHSD)

Figure A2.5 Detritivore species mixing effect (\pm 95% CI) on leaf consumption rates along the (a) temperature and (b) N availability gradients

Figure A4.1. Poster pédagogique réalisé en collaboration avec Thibaut Rota (doctorant à EcoLab) pour le service éducatif de l'Observatoire Midi-Pyrénées (OMP) et présenté lors du forum des Nouvelles Initiatives en Médiation Scientifique (NIMS).

Figure A4.3 - Détail du poster. Bande dessinée racontant une histoire de décomposition en milieu terrestre. Dessin et colorisation : Thibaut Rota.

Figure A4.2 - Détail du poster. Bande dessinée racontant une histoire de décomposition dans une rivière. Dessin : Alice Gossiaux; colorisation: Thibaut Rota.

LISTE DES TABLES

Chapitre 1

Table 1.1. Water parameters at the four different sites and averaged across the two seasons during the litter decomposition experiments.

Table 1.2. Linear and exponential decomposition rates (d^{-1}) of alder leaf discs incubated at each of the four sites characterized by their mean temperature in both seasons (spring and winter), and coefficient of determination of the regression.

Table 1.3. Summary table of mixed-effects models performed on decomposition rates (28 d), fungal biomass (21 d) and [log-transformed] sporulation rates (21 d) and chlorophyll-*a* concentration (28 d), at each of the four sites in both seasons (spring and winter).

Chapitre 2

Table 2.1. Decomposition rates, fungal biomass (in $mg\ g^{-1}$ AFDM) and sporulation rates (in conidia mg^{-1} AFDM d^{-1}) of aquatic hyphomycetes measured on alder and beech discs incubated at the 4 sites in spring and winter: mean (\pm SD), maximum and number of days at which maximum was reach (in d).

Chapitre 3

Table 3.1 Main physical and chemical water parameters measured in the four treatment channels during the 56 days of experiment ($n=2688$ for temperature; $n=8$ for other parameters).

Table 3.2 Leaf litter and biofilm C:N, N:P and C:P molar ratios and biofilm content in the main Poly Unsaturated Fatty Acids measured on the last date of the experiment (day 56). Values are mean (\pm SD, n=3).

Table 3.3 Mean \pm SD (n=3) length, growth, and mortality of Gammarids and mean \pm SD (n=3) mortality of Ephemeroptera and Trichoptera per treatment

Table S3.1 Weekly concentrations of NO_3^- and PO_4^{3-} and subsequent additions of NO_3^- and PO_4^{3-} to reach the targeted N:P molar ratios of 100 and 33 in the high and low N:P treatments, respectively. Due to the high initial PO_4^{3-} concentrations, NO_3^- were mainly added at the beginning of the experiment. Then, after one week, PO_4^{3-} dropped quickly and PO_4^{3-} inputs were added to maintain a reasonable amount of PO_4^{3-} , NO_3^- additions being adjusted to maintain the targeted N:P ratio. No nutrient addition was done on the last measurement date, systems being sufficiently rich in nutrients at this stage.

Annexes

Table A1.1 P-values from ANOVAs testing for the effects of temperature, season and region, as well as interaction between temperature and these factors on decomposition rates (microbial: k_r , invertebrate-driven: k_{inv} and total: k_c). Temperature is included using the linearized Arrhenius model. % sum of squares are provided. Since we used type I sums of squares, the effects reported for season and region are not influenced by temperature variations among seasons and regions.

Table A1.2 Temperature effect (1st column) and partitioning of the variance (columns 2-4) due to seasonal and spatial (inter and intra-regional) variations in decomposer density, richness and species composition. For decomposers density and richness, temperature effect assessment and variance partitioning were carried out using regression and ANOVA. For community composition, they were carried out using PERMANOVA (see Material & Methods). The temperature column indicates the sign of the temperature effect when significant (otherwise n.s), and the portion of variance explained by temperature for PERMANOVA. All other values are percentage of explained variance, with significant effects identified by a star (otherwise n.s)

Table A2.1 P-values associated with ANCOVA models testing for the effect of temperature, nitrogen treatments and their interaction on microbial and invertebrate processes as well as N and fungal biomass litter content. For microbial and invertebrate processes, the temperature effect was fitted according to the Arrhenius linearized model (see Material & Methods), while for litter N and fungal biomass, a linear relationship was assumed. N treatments were included as a factor. Significant *p* values are given in bold.

Table A2.2 Activation energy (\pm SE) of the Arrhenius models linking respiration and leaf decomposition rates to temperature for the different organisms and levels of biological organization. Significant estimates are given with the symbol *, and non-significant estimates with *n.s.*

Table A3. Comparaison des taxons fongiques **associés aux litières d'aulne immergées au printemps et en hiver dans une source tempérée (chapitre 1) détectés par approche microscopique (identification des conidies d'hyphomycètes aquatiques au microscope) et par approche moléculaire (identification par OTU après séquençage).**

INTRODUCTION

A. CONTEXTE

A.1. Changements environnementaux

Depuis l'apparition de la vie sur terre, il y a environ 3.8 milliards d'années, le fonctionnement de la biosphère se manifeste par des transferts continuels de matière et d'énergie auxquels participent les organismes lorsqu'ils interagissent entre eux et avec le milieu physico-chimique ambiant. Cependant, le milieu physico-chimique de la planète n'a pas toujours été le même et a subi de façon récurrente des changements globaux majeurs (géologiques, climatiques, biogéochimiques) dont certains ont profondément modifié le fonctionnement de la biosphère et conduit à des crises majeures d'extinction d'espèces. Actuellement, de nouveaux changements majeurs sont en cours, mais à l'inverse des changements naturels évoqués précédemment, ces derniers sont dus aux activités de l'Homme et se manifestent avec une rapidité sans précédent (Ripple et al. 2017). La magnitude et l'ampleur de cette empreinte de l'Homme sur la biosphère a conduit récemment certains scientifiques à qualifier d'Anthropocène, l'époque géologique qui depuis la révolution industrielle du XIX^{ème} siècle succéderait à l'Holocène. Qu'il s'agisse d'une métaphore ou d'une véritable période géologique (le débat n'est pas clos), ce néologisme traduit bien la force des changements biogéophysiques en cours générés par l'action de l'Homme sur notre planète.

Ces changements globaux sont au cœur des préoccupations sociétales actuelles, puisqu'ils altèrent profondément les écosystèmes, en affectant leurs caractéristiques biotiques et abiotiques et provoquant en conséquence des modifications de leur fonctionnement et des cycles biogéochimiques auxquels ils participent (Bellard et al. 2012 ; Blois et al. 2013 ; Butchart et al. 2010 ; Harley 2011 ; Thomas et al. 2004). Dans un second avertissement des scientifiques du monde à l'humanité, Ripple et al. (2017) reprennent les préoccupations émises par l'Union of Concerned Scientists en 1992 concernant les dommages actuels, imminents ou potentiels sur la planète Terre impliquant la disponibilité en eau douce, la diminution des ressources marines, les

zones mortes côtières des océans, la perte des forêts, **l'érosion** de la biodiversité, **l'augmentation du CO_{2e}** atmosphérique, **l'augmentation de la température** et la croissance continue de la population humaine. Vingt-cinq ans plus tard, le constat est alarmant : **à l'exception de la stabilisation de la couche d'ozone stratosphérique, la gravité des défis environnementaux auxquels notre société fait face n'a fait qu'augmenter** (Ripple et al. 2017). Ainsi, la croissance rapide et continue de la population (**plus de 7,5 milliards d'habitants en 2019**) constitue le principal moteur de nombreuses menaces écologiques et sociales (Crist et al. 2017), entraînant une augmentation proportionnelle de la demande en énergie, espace, nourriture, biens, services et informations, ainsi que de la production de déchets associée. Ces augmentations multiples **s'accompagnent d'une multitude de phénomènes** dont les conséquences sont **pour certains d'entre eux** désormais mesurables à différentes échelles biologiques, spatiales et temporelles.

Parmi ceux-ci, **les facteurs liés à l'usage et à l'exploitation intensifs des sols et des ressources énergétiques, hydriques et minérales, les modifications des cycles biogéochimiques, la pollution, la fragmentation des habitats, les invasions biologiques et le changement climatique affectent particulièrement les milieux naturels et la biodiversité** (Steffen et al. 2007). Dans ce contexte de changements globaux, la modification des processus de transport et de transformation cyclique des éléments entre les grands réservoirs de la biosphère (ou cycles biogéochimiques) peut avoir des conséquences importantes pour les écosystèmes, **en particulier lorsqu'elle affecte les cycles de l'eau, du carbone, de l'azote et du phosphore, qui sont des éléments essentiels à la vie** (Elser et al. 2007).

Les changements environnementaux ou dérèglements climatiques représentent une des composantes les plus étudiées des changements globaux. Ils sont définis par **des variations de l'état du climat qui peuvent persister pendant des décennies ou plus** (IPCC 2014). **Bien qu'il s'ajoute à la variabilité naturelle du climat observée au cours de périodes comparables, il est aujourd'hui reconnu qu'ils sont** majoritairement une conséquence des activités humaines qui modifient **la composition de l'atmosphère** (UNFCCC 1992). **Cette définition est étayée par les observations récentes d'évènements climatiques particuliers, qui se manifestent à une fréquence et une intensité de plus en plus importantes depuis le début de l'ère industrielle, à différentes échelles spatiales et**

temporelles. Ainsi, **l'augmentation continue** de la température moyenne à la surface du globe **peut également s'accompagner périodiquement** d'épisodes de précipitations intenses, de **l'augmentation de la fréquence d'enregistrement de températures** particulièrement faibles ou élevées, dites « record » et aléatoirement, généralement dans des zones géographiques limitées, **d'évènements climatiques extrêmes** comme par exemple les sécheresses, inondations, tempêtes et ouragans (Easterling et al. 2000).

A.2. Augmentation globale de la température et effets sur la biodiversité

Depuis le début du 21^{ème} siècle, la température de la Terre est déjà plus élevée **d'environ 0,87°C en moyenne par rapport** à la période 1850-1900. Les prévisions **d'augmentation de température** pour 2100 varient entre 0,3 à 4,8 °C supplémentaires selon le scénario considéré (IPCC 2014, 2018). **L'augmentation de la température** constitue une menace sérieuse pour la biodiversité, surtout du fait de sa rapidité, qui **dépasse largement la vitesse d'adaptation de certains organismes** (Visser 2008), se **traduisant à terme par des taux d'extinctions** accrus (Walther et al. 2002). Cette augmentation de température implique une réponse rapide des espèces, en particulier celles qui ont une tolérance thermique restreinte, pouvant se traduire par des changements spatiaux (**disparition d'une zone géographique** ou extension de leur aire de répartition), temporels (décalages dans la phénologie), et de la structure des **communautés (changements d'abondance des espèces dans des communautés locales;** Parmesan & Yohe 2003). Par ailleurs, **l'augmentation moyenne de la température à la surface du globe peut être le résultat d'une augmentation tout au long de l'année**, et au fil des ans, mais également de baisses en hiver et de fortes hausses en été qui peuvent **induire un stress supplémentaire lié à un manque d'eau.**

Face au stress induit par les changements climatiques, les organismes et donc **les communautés n'ont que deux choix pour survivre** : lutter ou fuir (« fight or flight response » ; Cannon 1932 ; Berg et al. 2010). Pour lutter contre ce stress, les organismes **peuvent développer plusieurs formes d'adaptation aux nouvelles** conditions des milieux dans lesquels elles vivent (Fig. 1). Ces adaptations peuvent être

génétiques et/ou physiologiques, ou encore impliquer des modifications de leur phénologie. Dans le cadre du changement climatique, les espèces qui mettent en place des réponses génétiques sont contraintes par la rapidité de ce changement. Ainsi, les organismes concernées sont majoritairement des espèces dont le temps de génération est court, et dont le taux de croissance de population est élevé (Bradshaw & Holzapfel 2006). **Lorsqu'ils ne sont pas capables de développer des adaptations génétiques rapides, les individus subissent directement les pressions qui s'exercent sur le milieu,** ce qui a des conséquences physiologiques plus ou moins importantes. Chez les végétaux, des modifications physiologiques se traduisent principalement en termes de croissance et de productivité (Hughes 2000). Pour les animaux, en particulier les ectothermes qui ont une faible capacité à modifier leur température corporelle, les adaptations peuvent se traduire par des modifications cellulaires (stabilité des protéines et des cellules **membranaires**) **ou à l'échelle individuelle par des changements de leur croissance, de leur reproduction, de leur alimentation, ou de leur comportement (activité, compétitivité).** Enfin, des modifications dans la phénologie des organismes ont été observées au niveau des cycles de vie, de la reproduction ou encore de la croissance (Walther et al. 2002). Ces changements peuvent engendrer une **rupture dans la coordination temporelle d'interactions biotiques cruciales (e.g. pollinisation, relations trophiques).**

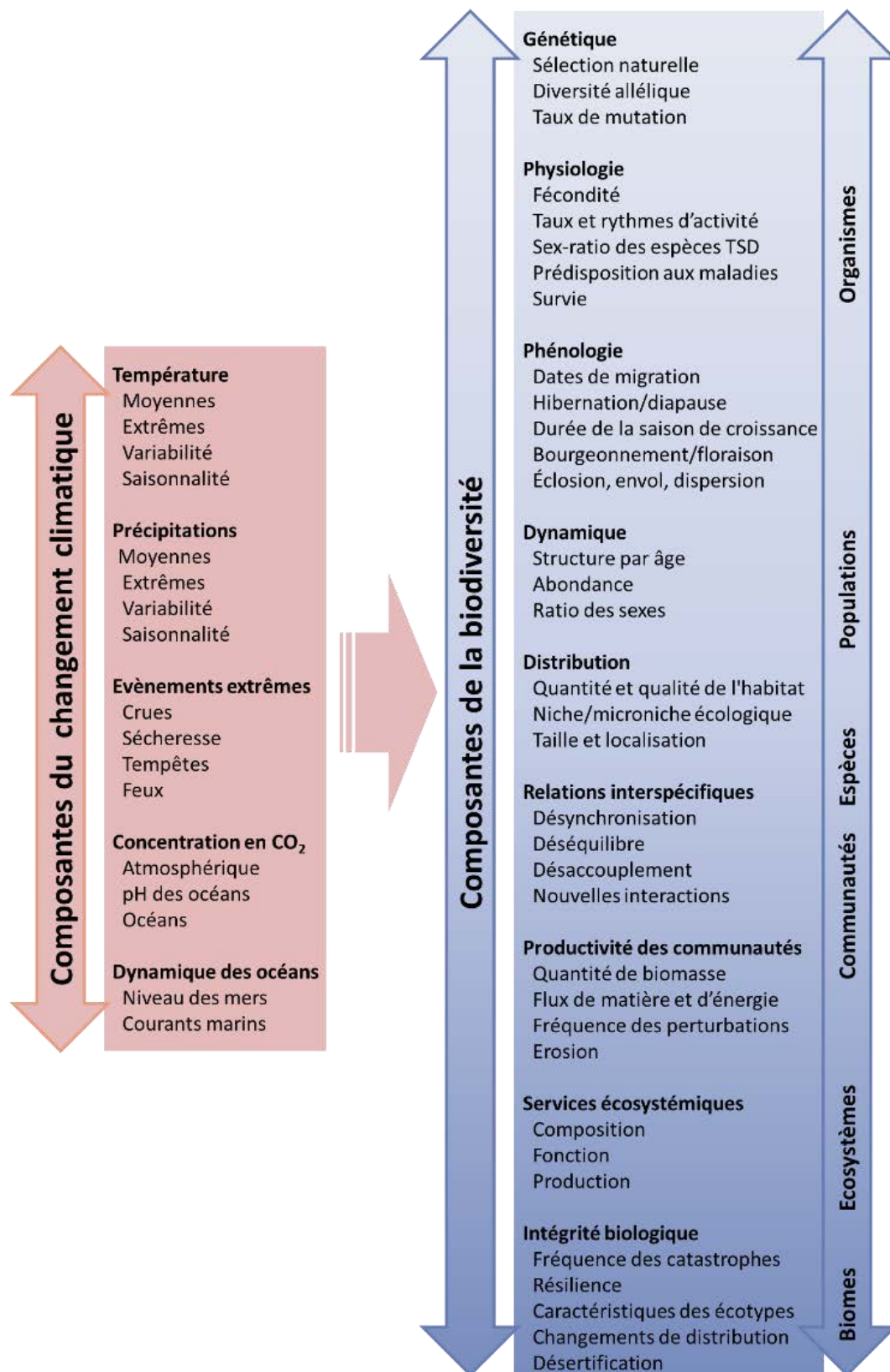


Figure 1. Résumé de certains des aspects prévus du changement climatique et quelques exemples de leurs effets probables sur différents niveaux de biodiversité. TSD: Détermination thermodépendante du sexe. Modifié d'après Bellard et al. 2012

A.2.1. Conséquences pour les écosystèmes

L'augmentation de la température génère des perturbations pour l'ensemble des systèmes (naturels ou anthropisés, océaniques ou continentaux, aquatiques ou terrestres) des différentes régions du globe. Ce réchauffement touche **l'ensemble des** écosystèmes naturels et les communautés animales, végétales et microbiennes qui y sont inféodées. Les écosystèmes sont constitués par des ensembles **d'espèces** organisés et hiérarchisés, qui fonctionnent via des **réseaux d'**interactions complexes. Ils sont généralement dominés par des prédateurs (i.e. carnivores, parasites) dont les proies sont des herbivores, lesquels mangent des producteurs primaires. Toute la base de **l'écosystème est constituée par les** organismes autotrophes chlorophylliens qui fixent le CO₂ et avec **l'énergie lumineuse, de l'eau et des minéraux, élaborent** de la matière organique qui sera transférée dans les réseaux trophiques. **L'impact du changement** climatique touche potentiellement chacune des espèces mais pas nécessairement de la même manière, créant une désorganisation de **l'écosystème** qui fonctionnait, était régulé et stabilisé.

Les ectothermes, dont le métabolisme est dépendant de la température, sont particulièrement sensibles aux changements climatiques, et mieux appréhender leurs réponses à ces changements est essentiel (Berg et al. 2010 ; Terblanche et al. 2004). En effet, ils représentent une grande partie de la biomasse et de la richesse spécifique des écosystèmes et participent activement à leur fonctionnement. Chez les ectothermes, il existe une relation de type exponentielle positive entre le métabolisme et la température. Ces organismes sont sensibles aux variations de température et leur tolérance varie entre la température minimale critique (CTmin), et un optimum thermique (Topt), au-delà duquel les effets de la température sont délétères pour leur physiologie, **jusqu'à une limite de tolérance maximale (CTmax)** (Brown et al. 2004 ; Sinclair et al. 2016). Ces différents paramètres peuvent être décrits par une courbe de performance thermique, pour laquelle le coefficient entre CTmin et Topt constitue ce **que l'on appelle l'énergie d'activation** du taux métabolique (Ea ; Gillooly et al. 2001), qui mesure la sensibilité aux variations de températures entre CTmin et Topt (Fig. 2).

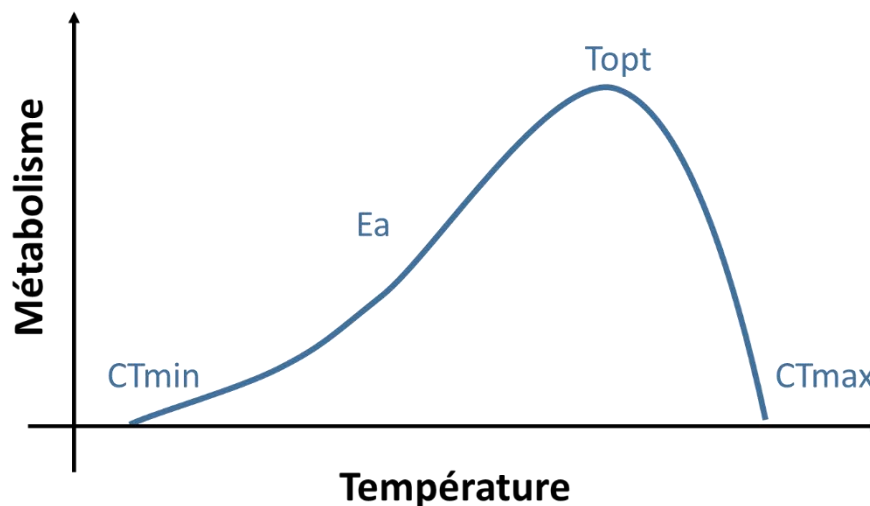


Figure 2. Courbe moyenne théorique de performance thermique des ectothermes. CTmin et CTmax correspondent aux températures critiques minimales et maximales, Topt à la température optimale, et Ea à l'énergie d'activation du taux métabolique.

A.2.2. Conséquences pour les écosystèmes aquatiques

Pour les écosystèmes aquatiques, l'augmentation de la température de l'air se répercute sur la température de l'eau (Pilgrim et al. 1998) et pose une double contrainte aux organismes. Premièrement, elle s'accompagne d'une diminution de la solubilité de l'oxygène, tandis qu'elle entraîne paradoxalement une augmentation de la demande métabolique en oxygène des organismes. Deuxièmement, la physiologie de la majorité des espèces aquatiques est directement influencée par la température, ce qui les rend particulièrement sensibles à son augmentation. En particulier, pour les ectothermes qui sont caractérisés par une capacité de thermorégulation limitée ainsi qu'une sensibilité thermique restreinte (Fig. 2), les changements de leur température corporelle sont donc fortement liés à la température de leur environnement. Cela peut expliquer les marges de tolérance ou de sensibilité thermiques parfois restreintes des individus. Ainsi, leurs préférences thermiques en termes d'habitats coïncident avec les plages de températures optimales à leur performance (activités trophiques, reproduction, déplacement,...). Du fait de ces caractéristiques, les variations de température peuvent avoir des effets importants sur les communautés des écosystèmes aquatiques. Une des conséquences de l'augmentation des températures les plus documentées dans la littérature concerne les changements d'assemblages des communautés (Nelson et al. 2017 ; O'Gorman et al. 2017 ; Jyväsjarvy et al. 2015 ;

Moghadam & Zimmer 2014), pouvant impliquer des modifications de la diversité des différents groupes fonctionnels (Jourdan et al. 2018). Enfin, ces modifications ont des conséquences directes et/ou indirectes sur les processus fonctionnels assurés par ces communautés. Pour les ruisseaux de tête de bassin versant en particulier, de nombreuses études montrent un impact du changement climatique sur les processus de décomposition de la matière organique (Boyero et al. 2011, 2016 ; Ferreira & Chauvet 2011a, 2011b ; Follstad-Shah et al. 2017 ; Santonja et al. 2015 ; ...) et de production primaire dans ces systèmes (Díaz-Villanueva et al. 2011 ; Sabater et al. 2008 ; Woodward et al. 2010 ; Ylla et al. 2014 ; ...).

A.3. Modification des apports azotés: de la production à la contamination des écosystèmes

A.3.1. **Importance et rôle de l'azote pour la vie**

Parallèlement à ces changements climatiques, les activités anthropiques bouleversent également le cycle de l'azote. **L'azote est un élément chimique simple qui est omniprésent dans la biosphère. Il constitue l'un des éléments essentiels à la vie et entre dans la composition de nombreuses molécules telles que les protéines et les acides nucléiques (ADN, ARN, ATP,...). L'atmosphère contient près de 80% d'azote sous forme de gaz inerte (le diazote, N₂). Cette forme d'azote n'est généralement pas utilisable directement par les organismes (excepté par quelques bactéries et archées). L'azote est aussi présent dans l'environnement sous diverses formes (oxydes gazeux (NO, NO₂, N₂O), anions (sels de NO₂⁻, NO₃⁻) et dérivés aminés (NH₃, NH₄⁺, urée), ...).** Ces molécules azotées peuvent être assimilées par les organismes vivants et/ou servir de source d'azote. **Elles sont qualifiées de formes « réactives » d'azote. Les activités humaines (eaux usées, engrais azotés, combustion d'énergies fossiles...) contribuent à augmenter les concentrations en formes « réactives » d'azote et vont donc avoir un impact sur la biosphère.**

A.3.2. Azote réactif : production, transport et dépôts

A l'heure actuelle, les quantités d'azote réactif mises en circulation par les activités humaines ont désormais doublé les quantités naturelles. Plusieurs types d'activités sont à l'origine de la formation et de la libération de ces formes d'azote anthropique dans l'environnement. La plus importante d'entre elles est issue de la production d'ammoniac à partir de l'azote atmosphérique (procédé Haber-Bosch), qui sert notamment à fabriquer des engrais synthétiques depuis les années 1910 (Fig. 3, en vert). Parallèlement, la modification du système de production agricole entraîne également une augmentation indirecte de la synthèse de formes réactives d'azote d'origine biotique (Fig. 3, en bleu), issu des cultures intensives de plantes associées à des bactéries fixatrices d'azote (légumineuses, riz, canne à sucre). Enfin, les énergies fossiles contiennent des traces d'azote qui sont libérées lors de la combustion constituent la troisième source d'azote réactif d'origine anthropique (Fig. 3, en orange).

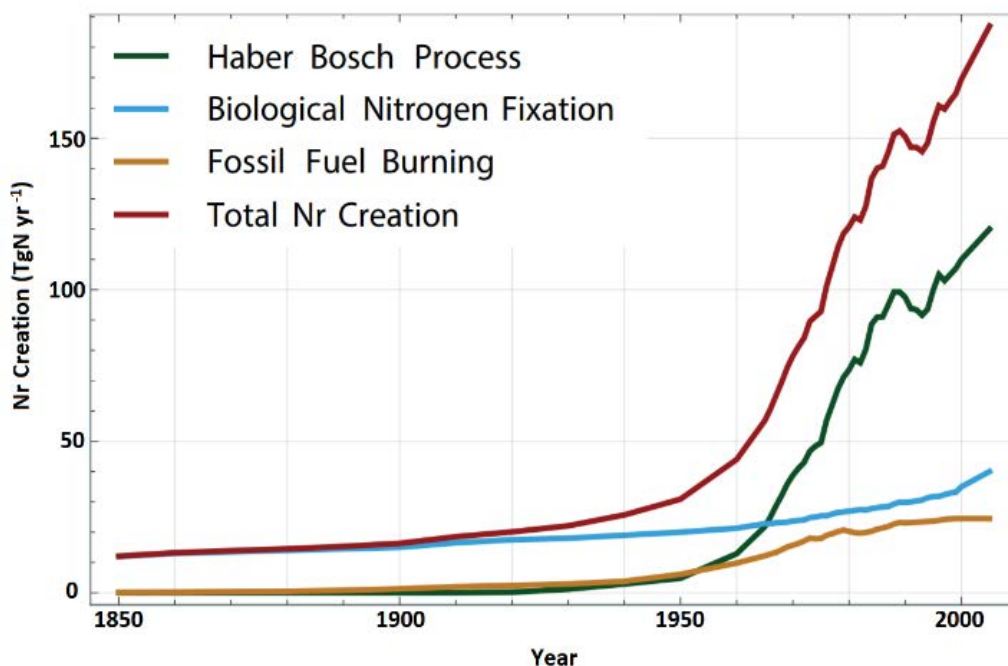


Figure 3. Quantités mondiales de création d'azote réactif (Nr) total (en rouge), issu des procédés Haber Bosch (en vert), de la fixation biologique des cultures (en bleu) et des combustions fossiles (en orange) en TgN an⁻¹. D'après Galloway et al. 2003 ; Galloway et al. 2008 et IPCC 2014

La combustion d'énergies fossiles et la demande en azote des secteurs agricoles et industriels (i.e. agroalimentaire, armement) ne cessent d'augmenter. Cependant, une

large partie de l'azote d'origine anthropique est perdue dans l'air, l'eau et la terre, contaminant ainsi les milieux naturels. Les molécules azotées sont très mobiles dans l'environnement. Les formes gazeuses (NO...) sont véhiculées par le vent sur de grandes distances. Les formes solubles dans l'eau (NO₂, NO₃, NH₄, urée) polluent les cours d'eau, les nappes phréatiques, les sols et les océans. Les perturbations liées à l'augmentation de la concentration en azote touchent donc tous les milieux, mêmes les plus reculés (Galloway et al. 2003). La production mondiale d'azote était estimée à 34 Tg.N.an⁻¹ en 1860. Cette quantité a atteint 100 Tg N an⁻¹ en 1995. Les projections actuelles estiment qu'en 2050, cette valeur sera de 200 Tg N an⁻¹ (Galloway et al. 2008). Néanmoins, ces dépôts sont très inégalement répartis selon les pays. Ces dernières années, en Europe, les dépôts atmosphériques azotés ont diminué grâce aux accords internationaux en matière de pollution atmosphérique (UNECE CLRTAP 1979 ; Protocole de Sofia 1988 ; Protocole de Göteborg 1999). Ces quantités d'azote déposées dépassent encore largement la charge critique d'azote (Erisman et al. 2003 ; Fig. 4).

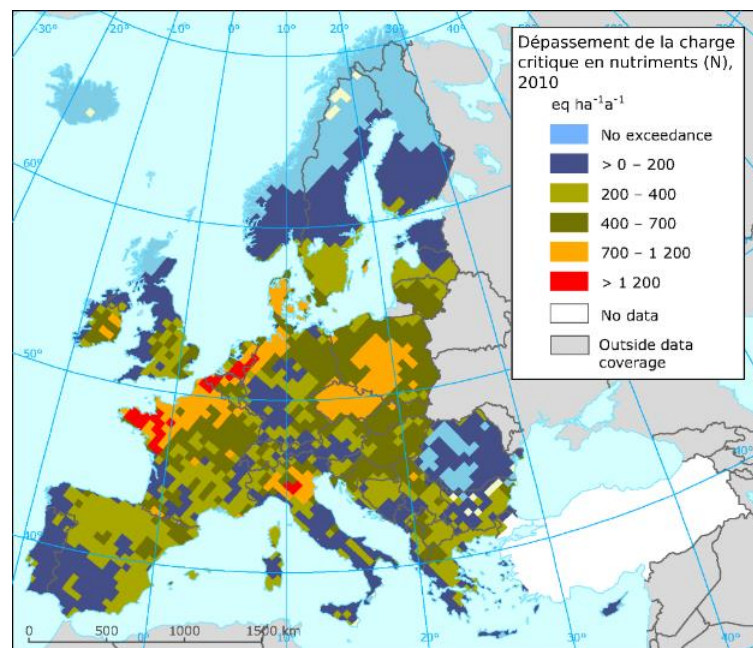


Figure 4. Dépassement de la charge critique en eq ha⁻¹ a⁻¹ d'azote en 2010 en Europe. La charge critique est définie comme la plus forte concentration d'azote au-dessous de laquelle aucun effet néfaste n'a été observé sur les aspects structurels et fonctionnels des écosystèmes. Modifié depuis EEA (2010).

A.3.3. Conséquences pour les écosystèmes

Dans la plupart des milieux aquatiques et terrestres, la production primaire est souvent limitée par **l'azote disponible** (en co-limitation avec phosphore, Vitousek & Howarth 1991). En effet, avec le carbone, ces nutriments jouent un rôle fondamental **dans la constitution de la matière végétale. Ainsi, l'enrichissement en azote d'un écosystème** conduit généralement à une augmentation de la productivité et de la teneur en azote de la végétation. Ce changement peut modifier les interactions biotiques interspécifiques en augmentant la compétition pour la lumière et les ressources et **conduire à l'exclusion de certaines espèces** (Payne et al. 2013). Ainsi, en enrichissant les milieux, les apports azotés (dont font partie les dépôts) peuvent avoir des effets néfastes sur la biodiversité, la structure et les fonctions des écosystèmes (Galloway et al. 2003). **L'excédent d'azote joue un rôle majeur dans l'eutrophisation des milieux** aquatiques et terrestres, et cause mondialement une détérioration de la qualité des eaux douces mais également littorales. Dans **les écosystèmes aquatiques d'eau douce, l'ajout d'azote** peut poser trois problèmes environnementaux majeurs : *(i)* **l'augmentation** de la concentration en protons dans les milieux peu tamponnés, et donc une acidification de ces systèmes, *(ii)* la stimulation de la prolifération des producteurs **primaires, entraînant un phénomène d'eutrophisation des milieux et ses effets** délétères associés (e.g. hypoxie), et *(iii)* **lorsqu'il atteint des niveaux toxiques, l'azote** peut également conduire à une forte érosion de la biodiversité de ces milieux (Camargo & Alonso 2006 ; Francoeur 2001 ; Jarvie et al. 2018 ; Smith 2003). Dans des cas **extrêmes un excès d'azote peut contribuer à l'apparition de « dead zones »** dans certaines régions côtières de la planète (Diaz & Rosenberg 2008).

L'augmentation de la température et des modifications des apports azotés, en raison de leur ubiquité, sont particulièrement préoccupants et représente une menace pour les écosystèmes. Sala et al. (2000) ont identifié le changement climatique et les **apports azotés comme étant deux des trois causes majeures de l'érosion de la biodiversité au niveau mondial à l'horizon 2100. La troisième cause importante est liée** aux changements d'usage des sols. Dès lors, il semble difficile, voire illusoire, **à l'heure actuelle, d'étudier des milieux « vierges »** de toute contamination anthropique afin de **décrire au mieux leur état naturel originel, c'est-à-dire** avant leur modification par

l'Homme. Ainsi, ce constat **complique l'évaluation des effets *in situ* d'un ou plusieurs facteurs cibles sur les écosystèmes** puisque d'autres pressions peuvent entrer en compte dans cette évaluation, **et que les changements globaux s'accélèrent.** Dès lors, il est essentiel de faire un état des lieux actuel afin de pouvoir mesurer les conséquences des activités anthropiques futures sur les milieux naturels et de définir le plus rapidement des mesures à prendre concernant leur protection.

B. LES MILIEUX AQUATIQUES D'EAU DOUCE : DES MILIEUX MENACÉS

Les **milieux aquatiques d'eau douce** figurent parmi les écosystèmes les plus menacés. **Bien qu'ils ne représentent qu'une infime proportion** des ressources en eau de la planète, celle-ci est essentielle pour de nombreuses espèces, dont **l'Homme.** Leur dégradation a de lourdes conséquences notamment en terme de services **écosystémiques qu'ils** procurent (Vörösmarty et al. 2010). Face à cette menace, plusieurs initiatives réglementaires ont été mises en place pour protéger et restaurer les **écosystèmes d'eau douce** comme la **Clean Water Rule (CWR, 2015)** aux Etats-Unis et la **Directive Cadre sur l'Eau (DCE, 2000)** au sein de **l'Union Européenne.** En Europe, l'objectif de la DCE consiste à **atteindre le « bon état »** chimique et/ou écologique de toutes les masses d'eau continentales (e.g. fleuves, rivières, ruisseaux, lacs, étangs, nappes phréatiques) et côtières.

B.1. **Les cours d'eau de tête de** bassin versant : des modèles **adéquats pour l'évaluation des effets des perturbations anthropiques**

Dans les zones tempérées, les cours d'eau drainant des têtes de bassin versant représentent plus de 70% du linéaire du réseau hydrographique (Lowe & Likens 2005). Partout présents dans nos paysages, ils assurent un certain nombre de fonctions importantes **et rendent des services écosystémiques qui, jusqu'à un récent passé,** ont été trop souvent ignorés. En témoigne par exemple en France, le très faible nombre de **stations de mesure situées sur les petits cours d'eau.** Pourtant, ils ont une influence

majeure sur la totalité du réseau hydrographique, **puisqu'ils se situent en amont des cours d'eau d'ordre supérieurs, avec qui ils ont une connectivité importante** (River Continuum Concept, Vannote et al. 1980 ; Strahler 1952). Les ruisseaux de tête de bassin versant **participent à la fois à la quantité et à la qualité de l'eau des masses d'eau situées à l'aval** (Alexander et al. 2007), mais contribuent également aux transferts de biodiversité vers le reste du système fluvial (Meyer et al. 2007). **Lorsqu'ils ne sont pas altérés, les cours d'eau de tête de bassin versant** jouent un rôle déterminant dans **l'acquisition de la qualité des masses d'eau situées à l'aval dont ils** soutiennent les étiages et régulent les débits (Alexander et al. 2007), pourvoient des captages en eau de qualité, servent de zone de reproduction pour de nombreuses espèces et souvent de refuge pour différences espèces qui présentent un intérêt patrimonial et/ou halieutique (Meyer et al. 2007). **Enfin, ils hébergent des assemblages originaux d'espèces** qui leur sont strictement inféodés.

Situés en plaine et dans des milieux ouverts, ils sont particulièrement **vulnérables aux activités agricoles, à l'urbanisme et l'industrie. En montagne et en forêt**, ils sont généralement moins concernés par les impacts agricoles, industriels et urbains mais sont néanmoins soumis aux effets des dépôts atmosphériques et au réchauffement. **La dégradation des cours d'eau de tête de bassin versant et de leur connectivité** aux écosystèmes situés en aval constitue une **menace pour l'intégrité biologique** de tout le réseau hydrographique (Meyer et al. 2007). De par leurs caractéristiques (e.g. petite taille, sensibilité, position dans le réseau hydrographique) et leur fonctions, ces cours souvent forestiers représentent des écosystèmes intéressants à étudier.

B.2. **Fonctionnement des cours d'eau de tête de bassin versant** : la décomposition des litières allochtones

Les **cours d'eau** forestiers de tête de bassin, sont caractérisés par un ombrage important, des températures plus faibles et souvent une vitesse de courant plus élevée. **La végétation rivulaire, l'altitude et la topographie liées au relief** ont une forte influence sur ces milieux. **La production primaire autochtone y est faible mais l'apport de détrit**us allochtones est importante (Minshall 1978 ; Vannote et al. 1980). Ces détrit

qui proviennent de la forêt environnante, dépassent ainsi largement la production **primaire autotrophe au sein de ces cours d'eau** (Wallace et al. 1997). Ils constituent ainsi la **principale source de matière et d'énergie** pour les réseaux trophiques, contribuant très fortement aux flux de carbone du système (Vannote et al. 1980 ; Moore et al. 2004). **Cette particularité, contrastant avec les cours d'eau d'ordre supérieur** (Cummins et al. 1983), leur confère un fonctionnement original, basé sur **l'hétérotrophie** (Cummins 1974 ; Fisher & Likens 1973). Dans ces systèmes où la production primaire est limitée à une faible activité du biofilm, la décomposition des litières constitue un processus écosystémique intégratif, qui implique de nombreux organismes, structure les réseaux trophiques aquatiques et participe aux cycles biogéochimiques (Follstad-Shah et al. 2017 ; Gessner et al. 1999 ; Wallace et al. 1997).

B.2.1. La décomposition de la matière organique allochtone

Les feuilles représentent une part importante des litières. Leur décomposition implique différents (sous)processus qui se superposent au moins partiellement (Fig. 5). Le lessivage, qui se produit généralement lors des premières heures **d'immersion des litières et correspond à la libération dans l'eau** des composés solubles subsistant dans les feuilles après abscission. Simultanément, des micro-organismes décomposeurs colonisent les feuilles, se développent et grâce à des activités exoenzymatiques libèrent dans le milieu des particules organiques fines (FPOM). La biomasse mycélienne augmente la palatabilité des litières pour les consommateurs invertébrés déchetiers qui fragmentent les feuilles et libèrent également dans le milieu des FPOM sous la forme de fèces et pseudo-fèces (Cuffney et al. 1990 ; Gessner et al. 1999). Les FPOM produites par les microorganismes et les déchetiers sont **ensuite consommées par d'autres organismes, soit prélevées directement dans la colonne d'eau par les macro-invertébrés filtreurs, ou lorsqu'elles se déposent sur les substrats par les macro-invertébrés collecteurs**. Finalement, tous ces macro-invertébrés représentent des ressources alimentaires potentielles pour des prédateurs (e.g. autres macro-invertébrés, poissons, ...).

Par leur respiration, les acteurs de la décomposition participent directement et pour partie à la minéralisation du carbone. Prise dans son ensemble, la transformation de la matière organique provenant des feuilles met donc en jeu de nombreux

organismes, à différents niveaux du réseau trophique détritique (Webster & Benfield 1986). La décomposition des litières qui représente une étape importante dans le cycle du carbone constitue donc un processus-clé du fonctionnement de ces écosystèmes (Benfield 2006 ; Minshall 1967).

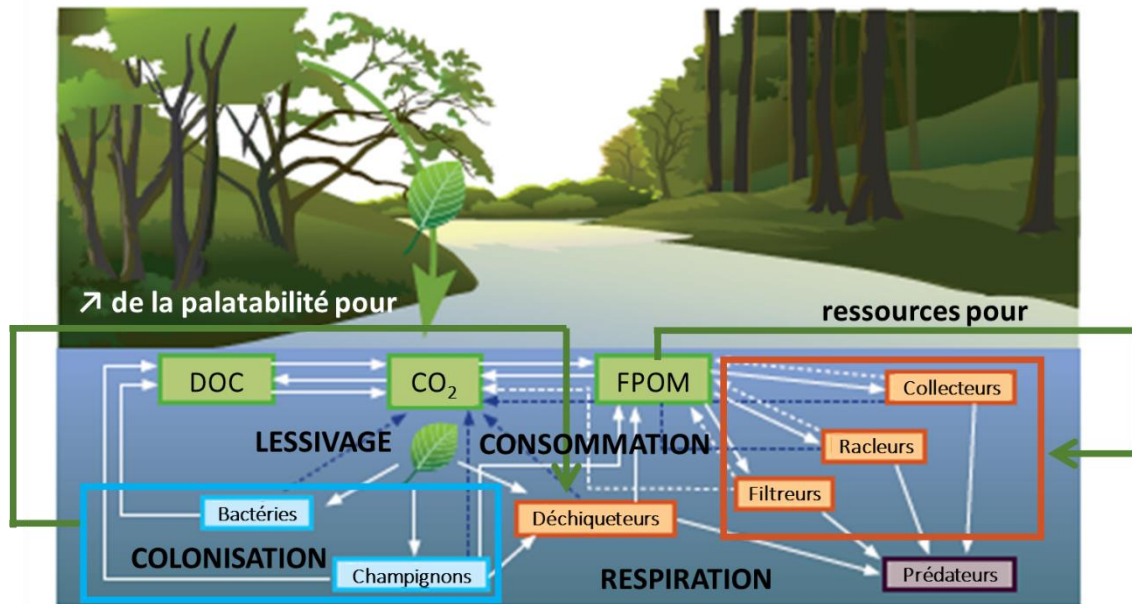


Figure 5. **Etapes de la décomposition des litières, sous l'action des micro-organismes et des macro-invertébrés au cours desquelles les litières sont au cycle du carbone et au transfert d'énergie dans les réseaux trophiques aquatiques.** Adapté d'après Chauvet & Guérol 2015

B.2.2. Les acteurs de la décomposition

Au cours de ce processus, le conditionnement microbien des litières est fondamental pour les étapes suivantes. Parmi les micro-organismes décomposeurs impliqués, des champignons, les hyphomycètes aquatiques, représentent les principaux acteurs microbiens de la décomposition, tandis que la contribution des bactéries **ne prend de l'importance qu'à des stades avancés de la décomposition** (Baldy et al. 1995). Les hyphomycètes aquatiques colonisent les litières en libérant des spores (ou conidies) dans la colonne d'eau. Celles-ci sont morphologiquement adaptées au **transport hydraulique et à l'adhésion aux surfaces foliaires** (Dang et al. 2007). Une fois fixées sur les litières, les conidies germent, et le mycélium ainsi produit se développe à **l'intérieur de la matrice** foliaire. Pour les hyphomycètes aquatiques, les litières représentent à la fois un habitat et des ressources nutritives. Les activités des

hyphomycètes aquatiques au sein de la feuille permettent la dégradation de polymères structuraux, même les plus réfractaires, **en produisant une variété d'exo-enzymes cellulaires** (Arsuffi & Suberkropp 1984 ; Chamier & Dixon 1982). La colonisation des litières par les hyphomycètes aquatiques entraîne alors un ramollissement des feuilles, indispensable à leur consommation ultérieure par les macro-invertébrés. Par ailleurs, **comme ils puisent également des nutriments (N, P) dans la colonne d'eau pour les incorporer à leur biomasse** (Gulis et al. 2006), ils **contribuent aussi à l'enrichissement des feuilles, tout en consommant le carbone qu'elles contiennent**. Les activités des hyphomycètes aquatiques modifient les litières de manière structurelle et chimique (Suberkropp & Arsuffi 1984), et augmentent la qualité de celles-ci. Les litières colonisées représentent une ressource particulièrement nutritive et favorisent leur consommation par les macro-invertébrés benthiques décomposeurs (Arsuffi & Suberkropp 1984). Ceux-ci prennent en charge la troisième étape de la décomposition de la matière organique allochtone. Ils appartiennent en majorité au groupe fonctionnel trophique des décheteteurs (Merritt & Cummins 1996), qui comporte une **grande diversité de larves d'insectes et de crustacés**. Les détritiques, et en particulier les litières, constituent une part importante de leur régime alimentaire, **qu'ils consomment spécifiquement ou de manière plus opportuniste**.

B.3. Un processus clef sensible à plusieurs niveaux

B.3.1. **Flux de matière et d'énergie** : cycle du carbone, réseaux trophiques

La décomposition des litières implique donc un grand nombre d'organismes aquatiques, qui permettent le transfert de matière et d'énergie au sein des réseaux trophiques. Elle constitue donc un processus écosystémique fondamental et participe aux cycles biogéochimiques. **Les éléments tels que le carbone, l'azote et le phosphore** contenus dans les litières en provenance des milieux terrestres sont incorporés à la biomasse fongique, bactérienne et animale des organismes qui les dégradent, puis aux **prédateurs qui s'en nourrissent**. Les écosystèmes aquatiques et en particulier les ruisseaux de tête de bassin versant jouent un rôle important de puits de carbone. **L'implication des nombreux organismes des réseaux trophiques détritiques en fait**

également un processus clef **sensible aux facteurs biotiques et abiotiques**. Ainsi, **l'étude de la décomposition peut permettre d'évaluer le bon fonctionnement écologique des cours d'eau de tête de bassin versant, en particulier pour mettre en évidence les effets** des multiples pressions exercées par les changements globaux sur ces écosystèmes. Le **maintien des conditions environnementales nécessaires à la survie et à l'activité de ces organismes** est essentiel pour assurer un processus de décomposition, et donc un fonctionnement de ces écosystèmes satisfaisant. Par ailleurs, la qualité et la quantité **des intrants foliaires peuvent également influencer la vitesse de l'utilisation de ces ressources** par les organismes.

B.3.2. Influence des facteurs biotiques et abiotiques

Généralement considérés comme toute forme de matière organique morte (i.e. nécromasse), les détritiques peuvent être de nature variée, et comprennent notamment différents types de tissus végétaux, de tissus animaux, de microbes morts, de fèces, ainsi que les produits sécrétés, excrétés ou éliminés par les organismes (e.g. exsudats **et lexiatiats, matière organique dissoute, ...**) (Moore et al. 2004). Cependant, dans ces écosystèmes, la nécromasse est majoritairement dominée par les feuilles mortes, qui intègrent **massivement les cours d'eau de tête de bassin versant au moment de l'abscission** (Benfield 2006), ou plus progressivement par des apports latéraux le reste **de l'année** (Benfield 1997). Bien que la quantité et la phénologie des entrées de litières **dans les cours d'eau soient deux facteurs importants dans le contrôle de leur décomposition**, de nombreux autres paramètres peuvent également entrer en jeu. Par exemple, la qualité initiale des ressources (litières) est également un facteur influençant la vitesse de décomposition des feuilles (Melillo et al. 1984). Les litières peuvent être classées en fonction de leur qualité : des litières pauvres (ou de faible qualité ou récalcitrantes) aux litières riches (ou de plus haute qualité). Ces dernières sont caractérisées par une complexité biochimique faible (i.e. contenant peu de lignine) et un contenu en nutriments plus élevé, notamment en azote (Kaushik & Hynes 1971). La vitesse de décomposition des litières étant liée à leur qualité (Suberkropp et al. 1976), leurs contenus en lignine et en nutriments peuvent être utilisés comme prédicteurs de la vitesse de décomposition des essences (Lecerf et al. 2007). Pour une même essence, la vitesse de décomposition peut également être impactée par les

facteurs physico-**chimiques de l'eau** (e.g. **température, pH**, éléments minéraux, polluants) et biotiques du milieu (e.g. structure et diversité des communautés de décomposeurs).

Par exemple, l'acidification des cours d'eau est connue pour diminuer drastiquement la vitesse de décomposition des litières. Une augmentation de la température et des apports en nutriments peut entraîner une accélération de la vitesse de décomposition, ce qui conduirait à une diminution du stockage du carbone dans les écosystèmes aquatiques. Finalement, selon cette hypothèse, la diminution du stockage du carbone **induite par l'augmentation de la température** participerait également au réchauffement climatique formant alors une boucle de rétroaction. Cependant, **l'influence** (accélération ou inhibition de la décomposition) de la température et des nutriments **fait encore l'objet de débats au sein de la communauté scientifique, n'aboutissant pas à l'heure actuelle à un consensus**, en partie à cause de la difficulté à **maîtriser l'ensemble** de ces facteurs en milieu naturel.

Les résultats des différentes études *in situ* concernant les effets de la température sur la décomposition des litières sont souvent divergents et peuvent dépendre de nombreuses conditions environnementales. Par exemple, dans une étude menée à deux saisons (automne et hiver) **au sein de trois cours d'eau de tête de bassin versant**, Rowe et al. (1996) **indiquent que d'autres facteurs, et en particulier le pH, ont eu plus d'influence sur les variations de taux de décomposition** que les différences de **régime thermique de ces cours d'eau**. Fenoy et al. (2016) rapportent un rôle prépondérant de la température sur la décomposition comparé au pH et à la **concentration ionique de l'eau, mais en interaction avec la chimie** de la litière. Dans la majorité des cas, cependant, les auteurs soulignent que la vitesse de décomposition **n'est pas influencée seulement par la température, mais que d'autres facteurs entrent en jeu** de manière plus ou moins importante (Graça et al. 2001 ; Martínez et al. 2014).

Les teneurs en nutriments des feuilles ou de l'eau ont également reçu une attention particulière. De nombreuses études se sont intéressées à la réponse des taux de décomposition aux variations des concentrations en nutriments dans les **cours d'eau** (Gulis & Suberkropp 2003 ; Pascoal et al. 2003 ; Ferreira et al. 2006 ; Noel et al. 2016). **Dans les cours d'eau de tête de bassin versant, généralement oligotrophes, l'ajout de nutriments (N,P) peut augmenter la biomasse fongique et la diversité des hyphomycètes aquatiques associées aux litières** (Suberkropp 1995 ; Sridhar &

Bärlocher 2000 ; Gulis & Suberkropp 2003 ; Gulis et al. 2008), et ainsi augmenter la vitesse de décomposition.

Enfin, des études en mésocosmes et en microcosmes ont montré que **l'ajout de nutriments**, combiné avec une augmentation de température, pouvait avoir des effets synergétiques sur la vitesse de décomposition des litières (Ferreira & Chauvet 2011b), affectant la composition des communautés microbiennes (Moghadam & Zimmer 2016) **et l'activité des décomposeurs fongiques** (Fernandes et al. 2014). En milieu naturel, cependant, les effets des changements environnementaux (température, nutriments) **peuvent être extrêmement variables, et ne permettent pas toujours d'observer un lien clair entre la température et la concentration en nutriments (N, P) et l'activité et la structure des communautés de décomposeurs** (Pérez et al. 2018). Afin de mieux comprendre les effets respectifs et combinés de ces deux facteurs des changements globaux **sur le fonctionnement des cours d'eau, il paraît donc indispensable d'intégrer** la complexité naturelle des écosystèmes ainsi que les réponses des différentes communautés naturelles, qui peuvent interagir entre elles et potentiellement moduler ces effets.

C. OBJECTIFS ET PLAN DE THESE

Les objectifs de cette thèse se sont organisés autour de **deux projets au cœur des enjeux écologiques actuels dans lesquels j'ai été impliquée**. Le premier, un projet EC2CO (CNRS) piloté **par François Guérol, portait sur l'utilisation *in natura*** de sources hydrothermales pour évaluer les effets du réchauffement climatique sur le **fonctionnement des cours d'eau de tête de bassin versant**. Dans ce cadre, deux expérimentations ont été menées le long du gradient de température offert par la source de Chaudefontaine, située à Vecoux dans les Vosges. Le second est un projet **financé par l'Agence Nationale de la Recherche, appelé *ANR-FunctionalStreams*** ci-après, porté par Eric Chauvet à Toulouse (EcoLab, CNRS). Les objectifs de ce projet **étaient d'étudier les effets respectifs et combinés de la température et des nutriments sur le fonctionnement écologique des cours d'eau via une approche multi-échelles (*in situ*, mésocosmes, microcosmes)**. Ce second projet **m'a permis de mener une expérimentation en mésocosmes visant à évaluer l'effet de la température (deux**

conditions) et de l'azote (deux conditions) sur le fonctionnement d'écosystèmes aquatiques simplifiés (litières, micro-organismes autotrophes et hétérotrophes et communautés simplifiées de macro-invertébrés). Par ailleurs, j'ai également participé à deux autres expérimentations menées par Jérémy Jabiol, en post-doctorat à Toulouse. La première concernait la décomposition des litières **le long d'un gradient latitudinal de température et de concentrations en azote. Elle a été réalisée au sein d'un ensemble de 12 cours d'eau de tête de bassin versant (6 en Montagne Noire, 6 dans les Vosges)**. La seconde a été réalisée à Toulouse en microcosmes, durant laquelle des disques de feuilles ont été inoculés par des micro-organismes décomposeurs à quatre niveaux de température et quatre niveaux **d'azote**. La vitesse de dégradation de ces disques par les micro-organismes et trois espèces de macro-invertébrés détritivores a ensuite été mesurée **pour chaque combinaison de température et d'azote**. Enfin, la respiration microbienne a été mesurée pour toutes les combinaisons de température et **d'azote, en absence de macro-invertébrés**.

Le présent travail de thèse s'articule autour de deux objectifs de recherche principaux :

1. Evaluer les effets de la température sur les processus **fonctionnels des cours d'eau de tête de bassin versant** en suivant une approche *in natura*
2. Evaluer les effets de la température et des nutriments sur le **fonctionnement écologique des cours d'eau** selon une approche réalisée en mésocosmes

Ces objectifs ont été abordés en trois chapitres, **présentés sous forme d'articles** :

Chapitre 1: *Seasonal variations overwhelm temperature effects on microbial processes in headwater streams: insights from a temperate thermal spring* (Gossiaux et al. 2019, *Aquatic sciences*, 81:30)

Chapitre 2: *What is driving differences between decomposition processes in streams: temperature, season, or leaf-litter type (substrate quality)?* (Gossiaux et al., en préparation)

Chapitre 3: *Temperature and nutrient effects on the relative importance of brown and green pathways for stream ecosystem functioning: a mesocosms approach* (Gossiaux et al., en revision, *Freshwater Biology*)

Ces trois chapitres documentent la réponse des processus de décomposition des litières et de production de biofilm, *in natura* (chapitres 1 et 2) et en mésocosmes (chapitre 3). Les deux premiers **chapitres s'intéressent aux** communautés microbiennes aquatiques présentes le long d'un gradient de température naturel offert par une source tempérée localisée dans les Vosges (4 conditions de température). Ces deux chapitres sont respectivement **issus d'une expérimentation** de décomposition de **litières d'aulne** (*Alnus glutinosa* ; chapitre 1) et de hêtre (*Fagus sylvatica* ; chapitre 2), effectuée à deux saisons (printemps et hiver). Enfin, le troisième chapitre est issu **d'une expérimentation** de décomposition de litières de noisetier (*Corylus avellana* ; chapitre 3) et de production de biofilm réalisée en mésocosmes. Ces milieux contrôlés semi-naturels nous ont permis d'**incorporer une contrainte** de disponibilité en nutriments (2 conditions) supplémentaire à celle de la température (2 conditions). Par ailleurs, dans cette expérimentation, nous avons également suivi une communauté simplifiée de macro-invertébrés (gammare, trichoptères, éphéméroptères). Le but de ces expérimentations était de répondre à trois questions :

1) *En milieux naturels ou semi-naturels (mésocosmes), quels sont les effets d'une élévation modérée de température (+1°C ; +2°C ; +5°C) sur les processus fonctionnels et les communautés aquatiques des cours d'eau de tête de bassin versant ?*

2) *Dans ces milieux complexes, l'influence de la température peut-elle être modulée par la disponibilité en nutriments des milieux ou des ressources ?*

3) *Les interactions entre les différents acteurs des processus fonctionnels des cours d'eau de tête de bassin versant (décomposition des litières et production de biofilm) sont-elles influencées par les différences de température et si oui, comment ?*

Dans un contexte de réchauffement climatique, plusieurs approches permettent d'étudier les réponses des écosystèmes aux variations de température. En général, ces

approches sont basées sur **l'étude de** milieux contrôlés (microcosmes, mésocosmes ou lors de manipulations *in situ*), ou de milieux répartis le long de gradients (latitudinaux, altitudinaux). **D'après la théorie métabolique de l'écologie**, une augmentation de la température induit une augmentation des contraintes énergétiques des organismes (Brown et al. 2004). De plus, la tolérance des organismes à la température est limitée par des optima qui peuvent être différents en fonction des espèces (Sinclair et al. 2016). **L'augmentation de la température** devrait donc impacter les espèces, soit de manière négative, en les empêchant de se développer **lorsque la température s'élève au-delà** de leur plage de tolérance, soit de manière positive, en stimulant leur métabolisme **lorsqu'elle se situe au-deçà** de leur optimum thermique. **L'augmentation de la** température, conjuguée aux différences de tolérance des espèces, peut alors avoir des conséquences importantes sur la composition et les réseaux de relations des communautés, ainsi que sur la diversité des traits fonctionnels qui y sont représentés. *In fine*, ces modifications peuvent affecter le fonctionnement des écosystèmes, et en particulier la décomposition des litières qui représente un processus-clef dans le fonctionnement des **cours d'eau de tête de bassin versant** (Boyero et al. 2016 ; Geraldès et al. 2012).

Dans les **cours d'eau de tête de bassin versant**, la **température de l'eau** est généralement faible. Si ces températures sont comprises dans la plage de tolérance thermique des organismes microbiens qui y vivent, nous avons émis l'hypothèse **qu'une** augmentation modérée de la température pourrait stimuler leur métabolisme **en s'approchant davantage de leur optimum thermique**. Ainsi, nous nous attendions à **ce que l'augmentation de la température** induise une augmentation conjointe de la vitesse de décomposition des litières et de la production de biofilm.

Dans les deux premiers chapitres, notre objectif était d'observer si le gradient naturel de **température présent au sein d'un milieu** unique, une source tempérée, **pouvait permettre d'apporter des éléments de compréhension complémentaires et réalistes** concernant la réponse des processus fonctionnels des écosystèmes aquatiques **à l'augmentation des** températures. Afin de tester l'hypothèse formulée précédemment, nous avons réalisé une expérimentation une première fois au printemps, pendant laquelle **l'étendue du gradient de température était d'environ 1 °C**, puis une seconde fois en hiver, pendant laquelle **l'étendue du gradient** était plus

importante (5°C). Par ailleurs, indépendamment de la température, **l'influence de la saison** sur les processus de décomposition et de production de biofilm, a été testée et discutée au regard de **l'influence de la température** (chapitre 1 ; chapitre 2). Cette séparation en deux chapitres est liée au fait que les résultats concernant la **décomposition de l'aulne** (chapitre 1) étaient plus avancés. Nous avons opté dans un premier temps pour la rédaction **d'une publication ne portant que sur cette essence** afin de satisfaire les critères de publication exigés par l'école doctorale, mais nous sommes conscients que ce choix, pragmatique, **n'est** peut-être pas le plus judicieux.

Enfin, comme les conséquences de la température sur le métabolisme des organismes et le fonctionnement des écosystèmes peuvent varier en fonction des ressources disponibles, les effets de la température et de la saison sur la décomposition des deux types de litière (aulne et hêtre) ont été comparés, et discutés au regard des interactions possibles avec les producteurs primaires du biofilm (chapitre 2).

Dans le troisième chapitre, notre **objectif était d'ajouter une composante de disponibilité en nutriments à l'étude de l'influence de la température sur** les processus de décomposition (processus brun) et de production primaire (processus vert), ainsi que sur les interactions entre ces deux processus. Nous avons mené une étude de 56 jours dans des ruisseaux artificiels (mésocosmes) contenant des litières de noisetier, des décomposeurs microbiens (champignons aquatiques et biofilm), **ainsi qu'**une communauté simplifiée de macro-invertébrés (4 espèces). Deux niveaux de disponibilité en nutriments (sous forme de rapports molaires N:P **de l'eau** ; 33 et 100) et deux niveaux de températures (ambiante et +2 °C) ont été manipulés, chaque traitement étant répété trois fois. La croissance des champignons et du biofilm, ainsi que la décomposition de la litière des feuilles et la production primaire ont été quantifiées. Les impacts des consommateurs invertébrés sur les compartiments bruns et verts (top-down) ont été évalués à l'aide d'exclos, tandis que le contrôle de ces derniers sur les consommateurs (bottom-up) a été évalué par la mesure des profils **stoechiométriques** des ressources et des acides gras, ainsi que par la quantification de la croissance et de la survie des macro-invertébrés. Nous avons principalement émis l'hypothèse que la température de l'eau et les éléments nutritifs entraîneraient une augmentation générale des processus (décomposition des litières et production primaire), mais que l'intensité de ces effets serait largement modulée par les interactions entre les acteurs des processus brun et vert. En outre, nous nous

attendions à ce que la température et les éléments nutritifs influent sur le degré de contrôle des microorganismes par les macro-invertébrés, mais modifient également les contraintes pour les consommateurs en modifiant la qualité des ressources microbiennes (chapitre 3).

Ces trois chapitres, qui concernent mes travaux de recherche, sont accompagnés par une discussion générale. Celle-ci **s'articule autour de** trois points : *i)* **l'influence des perturbations abiotiques liées aux changements globaux (température et nutriments ; seules et combinées) sur les processus fonctionnels des écosystèmes aquatiques**, *ii)* une réflexion sur **les facteurs potentiels à l'origine des résultats obtenus** au cours des **expérimentations menées dans ces trois chapitres ainsi qu'au cours** des deux expérimentations réalisées avec Jérémie Jabiol (**présentés sous forme d'encadrés**) et *iii)* l'utilisation des expérimentations de décomposition des litières **en tant qu'outil de l'évaluation de l'intégrité des masses d'eaux** via des actions de médiation scientifique et de transfert des connaissances vers le grand public.

Enfin, une conclusion générale permettra de lier les points importants issus de ces travaux **et d'en présenter les perspectives**.

CHAPITRE 1

***“Seasonal variations overwhelm temperature effects
on microbial processes in headwater streams:
insights from **a temperate thermal spring**”***

(Gossiaux et al. 2019, *Aquatic Sciences*)

Alice Gossiaux^{1*} | Jérémy Jabiol^{1,2} | Pascal Poupin¹ | Eric Chauvet² | François Guérol¹

¹LIEC – Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, Université de Lorraine, UMR 7360, Avenue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

²Ecolab – Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement, Université de Toulouse, UPS, CNRS, INPT, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France

Abstract

Carbon cycling in headwater streams is mostly driven by the decomposition of allochthonous organic matter, and to a lesser extent by primary production. Quantifying the influence of temperature on these processes is therefore essential to better anticipate the consequences of global warming for stream ecological functioning. In this study, we measured alder litter microbial decomposition and associated fungal biomass and diversity, using leaf discs enclosed in fine-mesh bags along a natural geothermal temperature gradient, in both spring and winter. We monitored the chlorophyll-*a* accrual in biofilms growing on ceramic tiles. The temperature gradient, from upstream to downstream, ranged from 15.3 °C to 14.2 °C in spring and 18.2 °C to 13.2 °C in winter. Autotrophs and heterotrophs exhibited contrasting responses to temperature. The expected positive effect of temperature was actually observed for chlorophyll-*a* accrual only, while an apparent temperature-independence of litter decomposition rate was found. Moreover, temperature effects on heterotrophic and autotrophic organisms depended on the season, with higher litter decomposition rates, sporulation rates, fungal biomass and chlorophyll-*a* in spring, despite a lower mean water temperature than in winter. Together, these results suggest that the influence of temperature remained largely overruled by seasonal effects. This result is likely due to annual variations in light availability, and may involve indirect positive interactions between microbial primary producers and decomposers.

Keywords: decomposition – headwater streams – microbial – seasons – temperature

Introduction

Earth has been undergoing a greater rate of warming over the last century than at any other time during the last 1,000 years (IPCC 2001). Since the nineteenth century, global mean air temperature has increased by ca. 0.75 °C, and is projected to keep increasing by a further 1.1-4.8 °C by 2100 (IPCC 2014). Since air and water temperatures are closely associated, stream water temperature will mirror this increase (Langan et al. 2001; Pilgrim et al. 1998; Stefan and Sinokrot 1993). Due to its fundamental role in biological processes (Friberg et al. 2009; Woodward et al. 2010), higher temperatures trigger various ecological responses. For instance, ecological responses can occur through changes in community dynamics, population density, species distribution and organismal phenology (Durance and Ormerod 2007; Frainer et al. 2017; Walther et al. 2002) and may lead to substantial modifications to ecosystem function.

In forested headwater streams, aquatic food webs are mostly maintained through allochthonous organic matter provided by riparian vegetation, with dead leaves representing the main source of carbon and energy (Benfield 2006). At the bottom of these food webs, aquatic hyphomycetes are the main drivers of microbial leaf-litter decomposition (Bärlocher 1985). Moreover, surface-attached biofilms, composed of diverse heterotrophic and autotrophic micro-organisms (e.g. bacteria, archaea, protozoa, fungi and algae), can also play an important role in stream primary production (Weitzel 1979; Schnurr and Allen, 2015). Both microbial compartments take part in aquatic food webs and contribute substantially to biochemical processes and ecosystem functioning (Besemer 2015; Romaní 2010). As they contribute in opposite ways to the carbon cycle (carbon fixation vs. carbon mineralization) and may have different sensitivities to temperature and seasonal variability, climate change could have critical effects on carbon cycle balance in streams (Song et al. 2018; Yvon-Durocher et al. 2010).

Due to the key ecological position of micro-organisms, many studies focused on the effect of rising temperature on microbially driven decomposition and aquatic hyphomycete communities. Results, though, remain equivocal. For example, Gonçalves et al. (2013) reported no effect of increased temperature on alder leaf microbial decomposition, but a faster microbial decomposition of oak leaves in

microcosms. In contrast, in a global field experiment, Boyero et al. (2011) found an increase of alder microbial decomposition along a latitudinal gradient of temperature. Finally, Ferreira and Canhoto (2015) observed a stimulation of the microbial decomposition of oak in an experimentally warmed stream, but only in winter.

Inconsistencies are likely due, in part, to the use of different strategies to manipulate temperature across studies. To date, most of them were conducted either under controlled laboratory conditions (Dang et al. 2009; Ferreira and Chauvet 2011a, b; Fernandes et al. 2012, 2014; Geraldés et al. 2012; Gonçalves et al. 2013; Martínez et al. 2014; Mas-Martí et al. 2015), *in situ* using large-scale gradients (i.e., latitudinal or altitudinal; Boyero et al. 2011, 2016; Casas et al. 2013; Fenoy et al. 2016; Fleituch 2001; Martínez et al. 2014; Unterseher et al. 2016) or through experimental warming of a stream (Ferreira and Canhoto 2015).

Each of these interesting approaches has its own limitations: from the oversimplification of the systems (e.g. microcosms) to the inability to disentangle the effects of temperature from other abiotic and/or biotic drivers over biogeographic scales. Midway between those opposite strategies, natural geothermal gradients offer a promising approach to study and understand the effects of global warming on stream functioning by isolating temperature from other drivers and by including the complexity of natural systems (O’Gorman et al. 2014).

The main objective of this study was to investigate the effects of water temperature on alder leaf litter decomposition and on primary producers. To this end, we relied on a natural temperature gradient provided by a temperate geothermal spring exiting the ground at 21 °C all year round and progressively cooling downstream through contact with air, and to a lesser extent through inputs of colder runoff water. We replicated the experiment across two seasonal contexts (spring and winter), in order to enlarge the temperature gradient of ca. 1 °C in spring to ca. 5°C in winter. We hypothesized that even small gradients in water temperature would lead (i) to an increase in leaf microbial decomposition (ii) through changes in leaf-associated aquatic hyphomycete communities, and (iii) to an increase of *in situ* algal production. Finally, we expected the effect of temperature to be more apparent in winter for decomposition (Ferreira and Canhoto 2015), because of the wider temperature gradient at this season and in spring for primary production, due to higher solar radiation (Delgado et al. 2017; Olapade and Leff 2005).

Material and methods

Study site and stream characterization

The study was carried out in spring (April-May 2016) and winter (January-February 2017) in Chaudefontaine, a first-order stream fed by a temperate geothermal source, located in Vecoux (Vosges Mountains, north-eastern France; **47°58'01.8"N, 6°39'56.5"E, 540 m a.s.l.**). **The spring outlet exhibits a constant temperature of 21°C** and provides a constant discharge throughout the year. The water of this small forested stream (length = 106 m) cools down from upstream to downstream through contact with air until it reaches a cold second-order stream. The watercourse is surrounded by a mixed coniferous forest mainly composed of silver fir (*Abies alba*), Norway spruce (*Picea abies*), black alder (*Alnus glutinosa*), beech (*Fagus sylvatica*) and underlain by granite. The riverbed of the stream mainly consists of sand and gravel with some cobbles.

The experiments were conducted at four sites, each separated by ca. 20.4 m, chosen along the stream section to capture the widest temperature range and maximize between-sites temperature differences. At each site, water temperature was recorded every 30 min with submerged data loggers (Hobo Pendant UA-001-08, Onset Computer Corp., Massachusetts, USA). The mean difference in water temperature (\pm SD) between sites 1 and 4 was 1.10 ± 0.33 °C in spring and 4.94 ± 1.27 °C in winter (Fig. 1.1).

Water samples (500 mL) from each site were collected on four occasions during the experiments. Stream pH was measured in the laboratory using a microprocessor pH meter (pH 3000, WTW) and acid-neutralizing capacity (ANC) was determined by **Gran's titration. Conductivity was measured with a Metrohm Herisau Conductometer E518** (Herisau, Switzerland) at 25 °C. Concentrations in Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} and K^{+} were determined by atomic absorption spectrophotometry (Aanalyst 100; Perkin Elmer and Varian SpetrAA-300) and concentrations in Cl^{-} , NO_3^{-} , PO_4^{2-} and SO_4^{2-} by ion

chromatography (Dionex 1500i; Sunnyvale, USA; Clivot et al. 2013; Cornut et al. 2012) (Table 1.1).

Leaf conditioning

Leaves of alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.), a common riparian tree species in the area and in Europe, were collected just after abscission in October 2015 and 2016. For each season, 480 discs (diameter 16 mm) were cut from the leaves with a cork-borer, avoiding the central vein, and air-dried in the dark at ambient temperature until needed. Discs were individually weighed (± 0.1 mg) to determine initial dry mass (DM) and enclosed in fine-mesh bags composed of eight rows of five discs (40 discs; bag size: 13 \times 22.8 cm, 0.25 mm mesh). Three bags (*i.e.* replicates) were submerged at each site. At each sampling date, two rows of five discs per replicate bag were sampled (*i.e.*, one row for mass loss estimation and the other one for fungal biomass and diversity measurements), placed in individual ziplock bags containing stream water, and transported to the laboratory in a cooler. The samples were retrieved after 7, 14, 21 and 28 d.

Leaf mass loss

At each sampling date, five discs from each bag were gently washed with distilled water, oven-dried at 60°C for 72 h to constant mass, and weighed (± 0.1 mg) to determine final DM. The discs were then ignited in a muffle furnace at 550 °C for 4 h to determine the ash-free dry mass (AFDM). Three unexposed sets of five discs were used to determine initial leaf AFDM.

Fungal biomass and diversity

To determine sporulation rates and species composition of leaf-associated fungal assemblages, five other discs from each bag were placed in 100-mL Erlenmeyer flasks filled with 20 mL of filtered stream water (glass microfibre GF/F, Whatman; pore size 0.7 μ m) at each sampling date. They were then incubated for 48 h on an orbital shaker

(100 rpm) at 17 °C in the dark. Unfortunately, in spring, remaining masses were insufficient to perform fungal biomass and diversity analyses at 28 d.

After incubation, the discs were removed and frozen at -20 °C before ergosterol content measurement according to Gessner and Newell (2002). Ergosterol was quantified by HPLC (Gessner 2005), and then converted into fungal biomass using a conversion factor of 5.5 µg ergosterol per mg fungal dry mass (Gessner and Chauvet 1993).

Conidial suspensions were poured into 50-mL Falcon tubes, fixed with 2 mL of 37 % formalin, and the final volume was adjusted to 40 mL with distilled water. 250 µL TritonX-100 (0.5 %) was added to the suspension, mixed with a magnetic stirring bar to ensure uniform distribution of conidia, and an aliquot (1-10 mL) of the suspension was filtered through membrane filters (25 mm diameter, pore size 5 µm; Millipore SMWP, Millipore Corporation, MA, USA). Filters were stained with 0.1 % Trypan blue in 60 % lactic acid (Iqbal and Webster 1973), and conidia were identified and counted under a microscope at ×200 magnification (Bärlocher 2005). Sporulation rate was expressed as the number of conidia released per mg leaf AFDM per day, and per mg fungal biomass per day.

Moreover, conidial assemblages from stream water were characterized following the same procedure, based on three filtrations of 100 mL of the stream water from each site and for each season (25 mm diameter, pore size 5 µm; Millipore SMWP, Millipore Corporation, MA, USA).

Chlorophyll-a

At each site, six ceramic tiles (individual upper surface area: 5 × 5 cm) were placed on the stream bed for 28 d. At 7, 14, 21 and 28 d, the overall biomass of benthic algal assemblages colonizing the ceramic tiles was quantified *in situ* using the BenthosTorch (bbe Moldaenke), a fluorometric probe designed for use in the field that has been proven reliable for total chlorophyll-*a* concentration assessments (see Kahlert and McKie 2014). The BenthosTorch was directly applied to the surface of each ceramic tile ensuring that the foam pad around the diodes shaded the biofilms from external light. The overall biomass of benthic algae was expressed as µg chlorophyll-*a* per cm².

Data analysis

Decomposition rates of alder leaf discs (k) were calculated assuming (a) a linear decay, by regression of the linear model $M_t = M_0 - k \times t$ (where M_0 is the initial AFDM, M_t is the AFDM at time t and k is the decomposition rate), and (b) an exponential decay, by linear regression of $\ln(M_t)$ vs incubation time ($M_t = M_0 \times e^{-k \times t}$; Pozo and Colino 1992). Comparison of R^2 of linear and exponential models indicated a slightly better fit of the linear model, in particular in spring (Table 1.2). Although the exponential model is more commonly used in published literature, further analyses thus relied on the linear decomposition rates.

Similar statistical analyses have been performed on fungal biomass and sporulation rates at 21 d, on chlorophyll-*a* concentration at 28 d and on linear decomposition rates (Table 1.3). The effect of season, temperature and interaction between season and temperature on the four variables studied were evaluated using linear mixed-effects models (LME; *nlme-package* in R) with random effects of mesh bags or ceramic tiles (i.e. blocks) identity nested into site. The significance of independent factors in LMEs was evaluated using type “III” or “II” sum of squares (*car-package* in R), depending on the presence of interactions. Indeed, when not significant, the interaction was removed for model simplification. Season, site and block identity were considered as categorical variables, whereas temperature was integrated as a continuous variable in all LME models. The model assumptions (normality and homoscedasticity) were assessed graphically, as well as with Shapiro tests on the residuals. When necessary, dependent variables (sporulation rates and chlorophyll-*a* concentration) were log-transformed in order to achieve normality. Finally, to assess the effect of between-sites differences in both seasons on each variable, linear models were constructed with season and site as categorical variables, then analyzed with ANOVA, and finally followed by Tukey HSD post hoc test ($p < 0.05$).

The possible influence of the distance from the source was analyzed for ambient conidial counts (to represent inocula) before the beginning of the experiment at each site and in each season with Jaccard similarity (J) and Bray-Curtis dissimilarity (BC) coefficients.

During the experiment, variations in fungal assemblages associated with leaf discs were analyzed by nonmetric multidimensional scaling ordination (NMDS) based on Bray-Curtis dissimilarity of each species sporulation rate data. PERMANOVA was performed to test for effects of time, season, temperature and interactions between variables on community assemblages (*RVAideMemoire-package* in R).

Finally, multiple comparison tests after Kruskal-Wallis (*kruskalmc; pgirmess-package* in R) were used to analyze temperature differences between sites.

All statistical analyses were performed with the R software (R Core Team 2017, version 3.4.2.).

Results

Stream water characterization

The mean temperature range was wider in winter than in spring (4.94 ± 1.27 °C and 1.10 ± 0.33 °C respectively, Fig. 1.1). Thus, in winter, mean temperature of the warmest site (S1) was higher than in spring (18.2°C and 15.2°C, respectively), while it was lower at the coldest site (S4; 13.2°C in winter and 14.2°C in spring, respectively). On average, the temperature difference (\pm SD) between two successive sites (S1-S2; S2-S3 and S3-S4) was 0.37 ± 0.09 °C in spring and 1.65 ± 0.37 °C in winter during the 28 d of experiment. It resulted in a global 429-398 degree-days gradient in spring and a 508-307 degree-days gradient in winter. Temperatures were significantly different between all site \times season combinations except for S2-spring and S3-winter (Fig. 1.1).

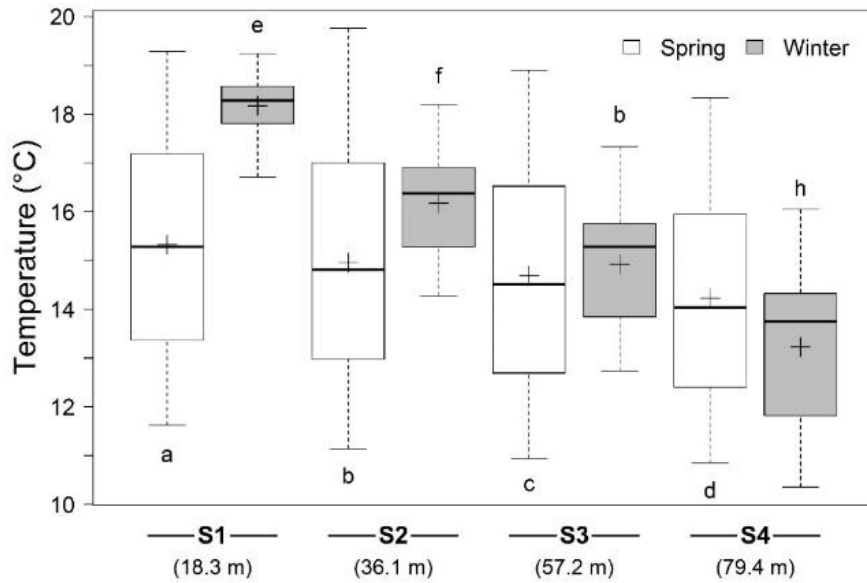


Figure 1.1 Water temperature at the four sites (ordered by increasing distance along the stream reach) across the two study periods. Each boxplot represent 1344 temperature observations collected during the experiments (central line is median; plus sign is mean; box top and bottom are first and third quartiles; whiskers are confidence limits). Sites with the same letter do not differ significantly (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$)

During the experiments, the stream water characteristics remained rather constant through time and did not differ between sites. Water was slightly alkaline and relatively nutrient-poor (Table 1.1) in comparison with other streams of the area (Dangles et al., 2004). Air temperature was higher in spring than in winter (8.52 ± 5.85 °C and -0.17 ± 5.86 °C on average, respectively). Finally, aquatic hyphomycete inocula before the onset of the experiment were very similar between sites in spring ($BC < 0.16$ and $J > 0.9$), with the similarity indices being slightly lower in winter ($BC < 0.34$ and $J > 0.8$).

Table 1.1. Water parameters at the four different sites and averaged across the two seasons during the litter decomposition experiments.

Site	pH	Conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	ANC ($\mu\text{eq L}^{-1}$)	Cl^{-} (mg L^{-1})	NO_3^{-} (mg L^{-1})	SO_4^{2-} (mg L^{-1})	PO_4^{2-} (mg L^{-1})	Ca^{2+} (mg L^{-1})	Mg^{2+} (mg L^{-1})	Na^{+} (mg L^{-1})	K^{+} (mg L^{-1})
S1	7.98 ± 0.03	135.7 ± 13.4	1186 ± 167	1.30 ± 0.50	2.68 ± 0.55	2.14 ± 0.18	0.04 ± 0.04	15.24 ± 1.86	3.61 ± 0.43	5.17 ± 0.21	1.98 ± 0.10
S2	8.01 ± 0.05	135.3 ± 12.9	1195 ± 160	1.32 ± 0.51	2.69 ± 0.55	2.16 ± 0.20	0.03 ± 0.02	15.05 ± 1.88	3.56 ± 0.45	5.15 ± 0.21	1.98 ± 0.10
S3	8.04 ± 0.07	133.3 ± 14.6	1175 ± 162	1.32 ± 0.50	2.65 ± 0.60	2.16 ± 0.20	0.03 ± 0.02	14.91 ± 1.98	3.55 ± 0.48	5.13 ± 0.24	1.94 ± 0.13
S4	8.00 ± 0.08	135.0 ± 12.5	1190 ± 146	1.40 ± 0.57	2.65 ± 0.60	2.28 ± 0.38	0.05 ± 0.03	14.97 ± 1.69	3.55 ± 0.45	5.27 ± 0.28	1.99 ± 0.15

Values are means \pm SD

Decomposition rates

Alder leaf litter lost 83-96 % of its initial AFDM over 28 d in spring and 61-69 % in winter. Whatever the range of temperature observed (1.1 °C in spring and 4.9 °C in winter between sites 1 and 4), linear decomposition rates were not significantly different among the four sites within a season (Table 1.2).

Table 1.2. Linear and exponential decomposition rates (d^{-1}) of alder leaf discs incubated at each of the four sites characterized by their mean temperature in both seasons (spring and winter), and coefficient of determination of the regression.

Seasons	Sites	Mean temperature (°C)	Linear model (d^{-1})		Exponential model (d^{-1})	
			<i>k</i>	R ²	<i>k</i>	R ²
Spring	S1	15.3	0.031 ^b	0.94	0.070 ^{ab}	0.85
	S2	15.0	0.033 ^b	0.94	0.107 ^{ac}	0.71
	S3	14.7	0.031 ^{bc}	0.96	0.084 ^{ab}	0.78
	S4	14.2	0.034 ^b	0.92	0.100 ^{ab}	0.76
Winter	S1	18.2	0.021 ^a	0.91	0.033 ^b	0.96
	S2	16.2	0.021 ^{ac}	0.89	0.034 ^b	0.94
	S3	14.9	0.024 ^{ab}	0.94	0.043 ^{ab}	0.96
	S4	13.2	0.023 ^{ac}	0.96	0.038 ^{ab}	0.92

Treatments with the same letter are not significantly different (TukeyHSD test, $p > 0.05$)

Overall, we observed a strong seasonal effect (Table 1.3; Model 2; Season, $p < 0.0001$) with significantly lower decomposition rates in winter (0.021-0.024 d^{-1}) than in spring (0.031-0.034 d^{-1}). This 1.3 to 1.6-fold lower decomposition in winter occurred independently of temperature differences between winter and spring. Mean water temperature in winter was actually higher for site 1 and 2 (respectively +2.8 °C and +1.2 °C than in spring), but lower for site 4 (-1.0 °C than in spring). By contrast, temperature was similar across seasons on site 3 (0.2 °C higher in winter).

Table 1.3. Summary table of mixed-effects models performed on decomposition rates (28 d), fungal biomass (21 d) and [log-transformed] sporulation rates (21 d) and chlorophyll-*a* concentration (28 d), at each of the four sites in both seasons (spring and winter).

	Decomposition rate			Fungal biomass			Sporulation rate			Chlorophyll- <i>a</i> concentration		
	n = 24			n = 24			n = 24			n = 48		
	Estimate ± SE	X ²	p value	Estimate ± SE	X ²	p value	Estimate ± SE	X ²	p value	Estimate ± SE	X ²	p value
Model 1: lme(X ~ Season + Temperature + Season × Temperature); Type “III” Anova												
Intercept	0.055 ± 0.04	2.40	0.122	277 ± 119	5.41	0.020	16.68 ± 5.76	8.38	0.004	- 46.21 ± 5.67	66.43	<0.0001
Season	- 0.025 ± 0.04	0.48	0.490	- 246 ± 122	4.05	0.044	8.29 ± 5.55	2.23	0.135	40.82 ± 5.82	49.10	<0.0001
Temperature	- 0.002 ± 0.00	0.42	0.517	- 17 ± 9	3.93	0.048	- 0.74 ± 0.42	3.17	0.075	3.17 ± 0.38	68.58	<0.0001
Season × tempera- ture	0.001 ± 0.00	0.18	0.675	17 ± 9	3.64	0.056	0.50 ± 0.40	1.54	0.214	- 2.89 ± 0.39	54.24	<0.0001
Random effect	0.0012			0.0001			0.2896			0.0004		
Marginal R ² / conditional R ²	0.7/0.8			0.4/0.4			0.7/0.8			0.7/0.8		
Model 2: lme(X ~ Season + Temperature); Type “II” Anova												
Season	- 0.010 ± 0.00	53.25	<0.0001	- 13.62 ± 5.74	5.21	0.022	- 1.63 ± 0.24	35.10	<0.0001			
Temperature	- 0.001 ± 0.00	1.19	0.274	- 0.97 ± 1.83	0.28	0.597	- 0.23 ± 0.09	7.16	0.007			
Random effect	0.0012			0.0001			0.0309					
Marginal R ² / conditional R ²	0.7/0.8			0.3/0.3			0.7/0.8					

Degrees of freedom of each independent variable = 1

Significant *p* values are in bold

Fungal biomass and diversity

Temporal dynamics of fungal colonization differed between seasons (Fig. S1.1): while fungal biomass was stationary between 7 and 28 days in winter; it generally reached its highest value at day 21 in spring. After 21 days, average fungal biomass was lower in winter than in spring (26.6 and 41.2 mg g⁻¹ AFDM, respectively; Fig. 1.2). Furthermore, fungal biomass after 21 days decreased with increasing temperature in spring (Fig. 1.2, dashed line regression, $R^2 = 0.26$, $p = 0.05$), while it was not influenced by temperature in winter (Fig. 1.2, solid line regression, $R^2 = 0$, $p = 0.88$). Finally, the influence of the interaction of season and temperature was marginally significant (Table 1.3; Season \times Temperature $p = 0.06$). However, in the model without interaction, a significantly higher fungal biomass (measured at 21 days) was revealed in spring (Table 1.3; Model 2; Season, $p = 0.022$).

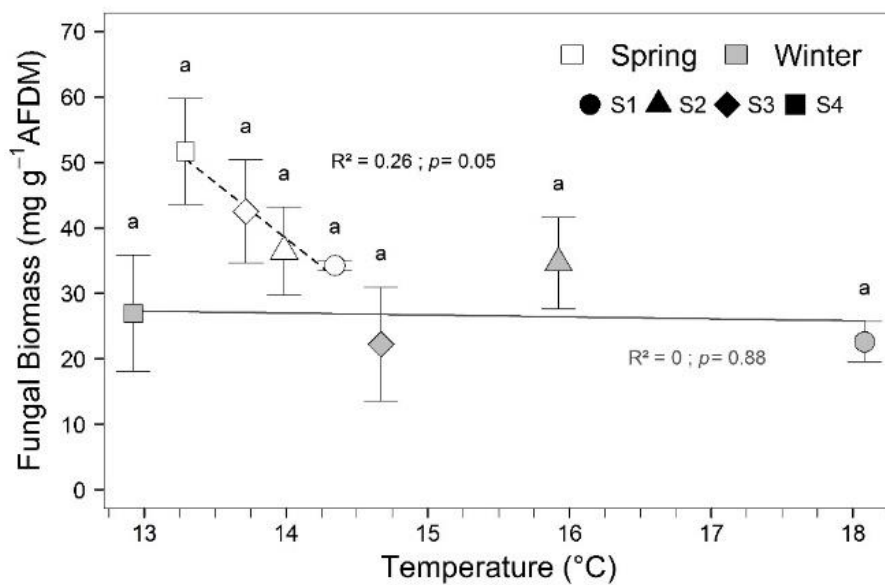


Figure 1.2 Mean fungal biomass \pm SE associated with alder leaf discs incubated at the four sites along the temperature gradient across the two study periods after 21 d. Lines represent regressions with mean temperature (dashed for spring, $R^2=0.26$; solid for winter, $R^2=0$). Points with the same letter do not differ significantly (Tukey's HSD test)

After 21 days (temporal dynamics provided in Fig. S1.2), total sporulation rates of aquatic hyphomycetes associated with alder litter showed a similar response pattern to fungal biomass (Fig. 1.3). Indeed, mean sporulation rate at 21 days was higher in

spring than in winter, despite the wider temperature gradient observed in winter (723 and 135 conidia mg⁻¹ AFDM d⁻¹ in spring and winter, respectively). Sporulation rate decreased with increasing temperature, though more slightly in spring (Fig. 1.3, dashed line regression, $R^2 = 0.18$, $p = 0.09$) than in winter (Fig. 1.3, solid line regression, $R^2 = 0.36$, $p = 0.02$). Our models revealed significant influence of both season and temperature (Table 1.3; Model 2; Season, $p < 0.0001$; Temperature, $p = 0.007$). Furthermore, when expressed as conidia per unit of fungal biomass, sporulation rates were similar in sites below a mean temperature of 15 °C (with an average of 541 ± 74 conidia mg⁻¹ fungal biomass d⁻¹). In sites with higher temperatures, sporulation rates per unit of fungal biomass dropped to 156 ± 51 conidia mg⁻¹ fungal biomass d⁻¹ (data not shown).

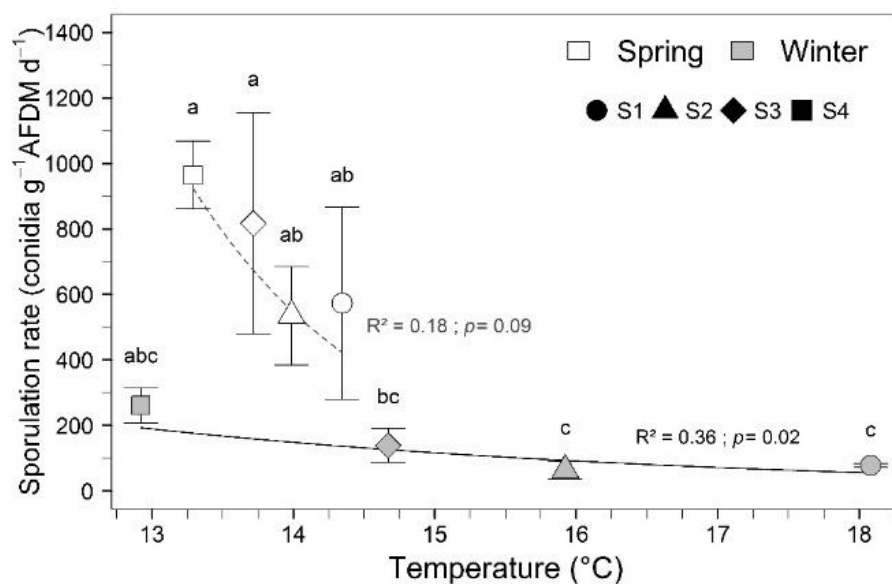


Figure 1.3 Mean sporulation rate \pm SE of aquatic hyphomycetes associated with alder leaf discs incubated at the four sites along the temperature gradient across the two study periods after 21 d. Lines represent regressions with mean temperature (dashed for spring, $R^2=0.18$; solid for winter, $R^2=0.36$). Points with the same letter do not differ significantly (Tukey's HSD test)

Aquatic hyphomycete species richness was similar between seasons and sites, with a total of 18 species observed (Fig. S1.3). The dominant species at all sampling times and sites in both seasons was *Lunulospora curvula*, whose relative contribution to

total sporulation rate was particularly high during early leaf decomposition stages (Fig. 1.4a). On the contrary, a shift between spring and winter occurred in the relative contribution of the second dominant species (*Articulospora tetracladia* in spring, *Clavariopsis aquatica* in winter) (Fig. 1.4a). The NMDS ordination of fungal communities based on sporulation rates (Fig. 1.4b) indicates that time and season had a significant influence on aquatic hyphomycete community structure. PERMANOVA revealed that season (Season, $p = 0.001$) and time (Time, $p = 0.001$), as well as all double interactions of the factors significantly affected community structure (PERMANOVA, Season \times Time, $p = 0.013$; Temperature \times Time, $p = 0.011$; Season \times Temperature, $p = 0.012$).

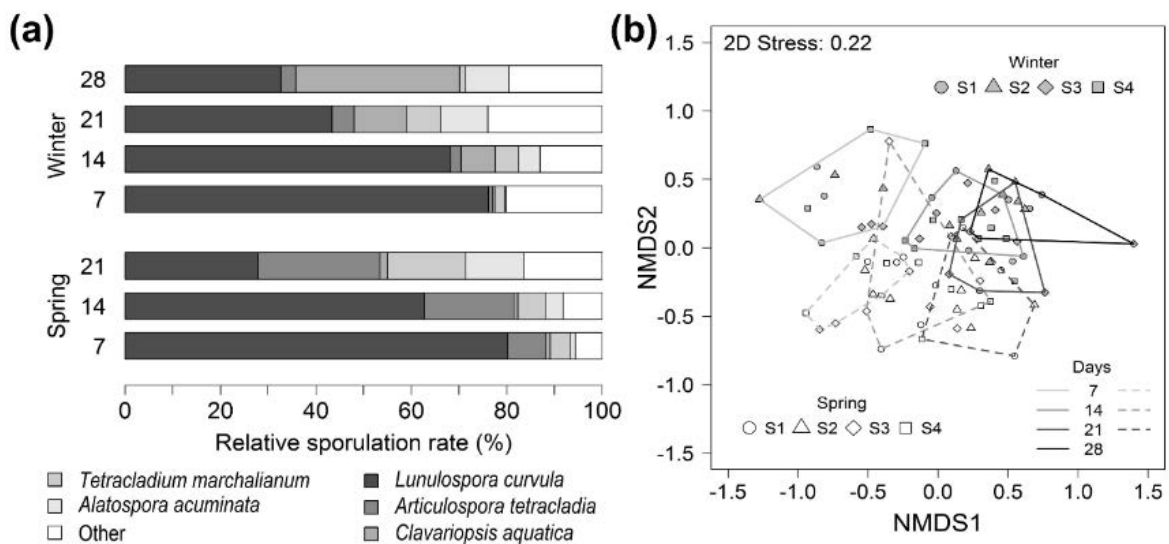


Figure 1.4 Percentage contribution of aquatic hyphomycete species to total sporulation rate (a) and NMDS (b) ordination diagram based on fungal communities assessed from conidia released from alder leaf discs during 7, 14, 21 and 28 days of immersion at the four sites along the negative temperature gradient in spring 2016 and winter 2017

Chlorophyll-a concentration

During the experiment, chlorophyll-a (chl-a) concentration in biofilm on the ceramic tiles increased gradually from 0 to 28 d (Fig.S1.4). After 28 d, mean chl-a concentration was almost 9-fold higher in spring than in winter (Fig. 1.5; 4.53 and 0.52 $\mu\text{g cm}^{-2}$, respectively). However, while an increase of 1 °C in spring led to a 24.7-fold increase in mean chl-a concentrations (Fig. 1.5, dashed line regression, $R^2 = 0.67$, $p < 0.0001$), an increase of 5 °C in winter only led to a 5.3-fold increase (Fig. 1.5, solid

line regression, $R^2 = 0.38$, $p < 0.001$). The interaction of season and temperature had a significant influence on chl-a concentration after 28 days (Table 1.3; Season \times Temperature, $p < 0.0001$).

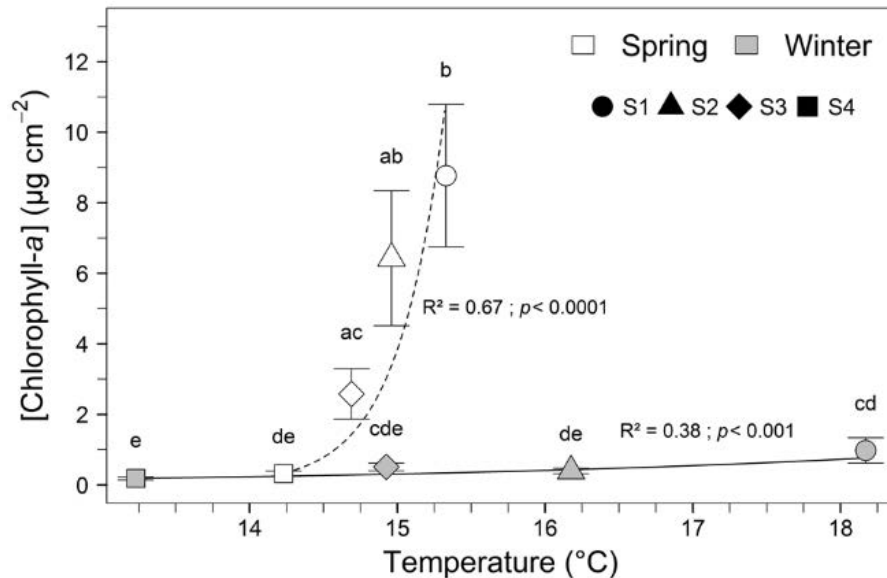


Figure 1.5 Mean chlorophyll-a concentration \pm SE after 28 days of immersion at the four sites along the temperature gradient across the two study periods. Lines represent regressions with mean temperature (dashed for spring, $R^2=0.67$; solid for winter, $R^2=0.38$). Points with the same letter do not differ significantly (Tukey's HSD test)

Discussion

Contrasting with the current leading conceptions of temperature effects on biological rates (Brown et al. 2004), our results suggest that those effects are mostly season-dependent, at least in a geothermal spring located in a temperate area. Indeed, while we expected the increase of temperature to stimulate decomposition process and algal production, differences in seasonal factors appeared to be more determining than temperature itself. Our different variables exhibited contrasting variations along the temperature gradient: while decomposition rates did not vary with temperature, high temperature was associated with high biofilm autotrophs biomass, but low fungal

biomass and sporulation rate. Interestingly, correcting sporulation data by fungal biomass allowed us to determine that this decreased fungal spore production with increasing temperature was mostly driven by an effect on fungal biomass, but did not reflect any temperature effect on fungal reproductive activity. In contrast, temperature-independent seasonal variations affected all the variables observed, with average values significantly lower in winter than in spring.

The observed temperature independence of microbial decomposition contrasts with results of several previous field and microcosm studies conducted in similar ranges of temperature (Fenoy et al. 2016; Fernandes et al. 2014; Ferreira and Chauvet 2011a, b). However, it echoes results by Ferreira and Canhoto (2014, 2015) who observed no effect of temperature increase on litter decomposition in spring in manipulative experiments under similar temperature ranges. Furthermore, linear decomposition rates of alder leaf-litter observed in this study are consistent with those found by Baudoin (2007) in two reference streams in winter (0.025 and 0.024 d⁻¹; mean temperature: 6.5 and 4.8 °C, respectively). Consistent with the decomposition dynamics, fungal biomass and aquatic hyphomycete community composition exhibited no clear pattern along the temperature gradient, as found by Ferreira et al. (2014) and Ferreira and Canhoto (2014, 2015). Several potential mechanisms can explain together the temperature invariance of litter decomposition. First, several studies found that temperature and nutrient availability could have synergistic effects on microbial activity and litter decomposition (Ferreira and Chauvet 2011a; Fernandes et al. 2014; but see Manning et al. 2018). This interactive influence can explain weak temperature effects in oligotrophic conditions such as in our stream (Ferreira and Chauvet 2011a). Moreover, temperature effects on biological activities typically follow a hump-shaped relationship, with a decrease of performances at higher temperature than typically experienced by organisms (Huey and Stevenson 1979). To date, very little is known about the thermal performance curves of aquatic microbial decomposers, and it is not unlikely that the temperature of our stream exceeded the optimal temperature for microbial decomposition in temperate systems. Finally, temperature can have indirect effects on processes through changes in community structure and trophic interactions among species. For instance, several studies performed in soil ecosystems suggested that mid- to long-term warming experiments could fail to elicit any temperature effect on microbially driven processes due to quick adjustments of

microbial communities (Bradford et al. 2008; Giardina and Ryan 2000; Wei et al. 2014). However, in our study, the lack of temperature effect on fungal community structure, as well as the proximity between sites (with likely fluxes of conidia between sites) make this latter explanation unlikely. Thus, the adjustment to temperature, if any, might here occur at the intra-specific level (e.g. through physiological response) and does not involve any shift in species composition. Indeed, *Lunulopsora curvula* was the dominant species at each site in both seasons, although it is classically found in warm waters such as tropical ecosystems, or during summer in temperate ecosystems.

In contrast with the heterotrophic microbes, we observed that even a small increase of temperature (~ 1 °C) in spring had a strong positive effect on biofilm chlorophyll-*a* concentration. This suggests a strong effect of temperature on autotrophic microbial colonization and growth (Delgado et al. 2017; Díaz-Villanueva et al. 2011), which could reflect the kinetic effect of temperature on the enzymes involved in photosynthesis (Allen et al. 2005; Padfield et al. 2017). Alternatively, this could also be due to an increased chlorophyll-*a* concentration in the biofilm grown under warm conditions, as described by Ylla et al. (2014).

In winter, even a large temperature increase (~ 5 °C) did not hasten biofilm production of chlorophyll-*a* to an extent seen in spring, with winter algal biomass accrual remaining low between 13 and 18 °C. This pattern, together with the strong effect of season on decomposition rates, fungal biomass and sporulation rates, suggests that season has an overwhelming importance in determining ecosystem process rates that cannot be explained by temperature seasonal variations only. In the case of autotrophic biofilms, primary production is likely limited by light availability in winter, explaining the lower values and temperature-dependency of chlorophyll-*a* concentrations (Romaní et al. 2014). Concerning fungal decomposers, higher decomposition rates in spring (despite lower temperature) could be due to shifts in community composition, which could reflect among-species variations in phenology (Suberkropp 1984). Alternatively, light availability could influence directly or indirectly fungal decomposers as well. This could be due to a direct effect of light on aquatic hyphomycete activity (Rajashekhar and Kaveriappa 2000) or to interactions with autotrophic biofilms (Halvorson et al. 2016). Indeed, assuming that the increase in algal biomass accrual observed in spring on ceramic tiles occurred on any hard surface

of the watercourse (including on leaf discs), it is likely that auto- and heterotrophs interacted. We hypothesized that a priming effect, a mechanism by which a release of labile carbon by autotrophic biofilms stimulates the decomposition of refractory carbon by heterotrophic micro-organisms (Danger et al. 2013; Kuehn et al. 2014) may have led to higher decomposition rates in spring than in winter. Otherwise, the amounts of labile carbon released by phototroph's activity are transported by water and can therefore benefit surrounding fungi, even if physically separated. Finally, other seasonal drivers might have influenced decomposition rates and fungal communities, such as consumer activity or nutrient availability. However, in the present study, nutrient concentrations did not exhibit significant temporal variations.

Using a natural and original ecosystem, our study opens a new perspective on the effect of temperature on microbially-driven processes in streams, despite some obvious limitations. The small size and scarcity of this system limits our ability to study temperature effects over larger and/or colder gradients, and precludes the replication of the experiment in another similar system. Based on the results of our study, we strongly recommend improving the grain (number of intermediate values) and extent (range between extreme values) of temperature gradients, which would probably allow us to determine the optimal temperatures of ecosystem processes in headwater streams. It remains that such springs are natural ecosystems and as such exhibit complex and representative communities and food webs, compared to oversimplified laboratory assemblages. Most importantly, they allow overcoming the technical challenge associated with temperature manipulation in natural streams (Canhoto et al. 2013), and provide a similar water temperature across seasons. It is thus a useful tool for the assessment of temperature effects on ecological processes at the ecosystem scale, as suggested in previous studies on Icelandic tundra geothermal ecosystems (O’Gorman et al. 2014; Woodward et al. 2010) and should allow a better understanding of the influence of short- (e.g. seasonal) to long-term (e.g. climate warming) temperature variations on communities and ecosystem processes under temperate latitudes as well.

Acknowledgments

We thank P. Rousselle and D. Lambrigt for water and ergosterol analyses and P. Wagner, M. Odinet, and F. Louis for valuable help in the field. We are grateful to Christopher Swan, Stuart Findlay and two anonymous reviewers who provided excellent feedback and suggestions to improve this manuscript. The present study was funded by the French National Research Agency (ANR-14-CE01-0009) and the French National Program EC2CO (2016-2017).

References

- Allen A.P., Gillooly J.F. & Brown J.H. (2005). Linking the global carbon cycle to individual metabolism. *Functional Ecology* *19*, 202–213. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2005.00952.x>
- Bärlocher F. (2005). Sporulation by aquatic hyphomycetes. In: *Methods to study litter decomposition*, Springer. pp. 185–188. Dordrecht.
- Bärlocher F. (1985). The role of fungi in the nutrition of stream invertebrates. *Botanical journal of the Linnean Society* *91*, 83–94
- Baudoin J.-M. (2007). *Biodiversité et fonctionnement de cours d'eau forestiers de tête de bassin: effet de l'acidification anthropique et d'une restauration*. Université de Metz.
- Benfield E.F. (2006). Decomposition of leaf material. In: *Methods in stream ecology*, 2nd ed. (Eds F.R. Hauer & G.A. Lamberti), pp. 711–720. Academic Press/Elsevier, San Diego, Calif.
- Besemer K. (2015). Biodiversity, community structure and function of biofilms in stream ecosystems. *Research in Microbiology* *166*, 774–781. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.05.006>
- Boyero L., Pearson R.G., Gessner M.O., Barmuta L.A., Ferreira V., Graça M.A., et al. (2011). A global experiment suggests climate warming will not accelerate litter decomposition in streams but might reduce carbon sequestration. *Ecology Letters* *14*, 289–294
- Bradford M.A., Davies C.A., Frey S.D., Maddox T.R., Melillo J.M., Mohan J.E., et al. (2008). Thermal adaptation of soil microbial respiration to elevated temperature. *Ecology Letters* *11*, 1316–1327. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01251.x>
- Brown J.H., Gillooly J.F., Allen A.P., Savage V.M. & West G.B. (2004). Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology* *85*, 1771–1789
- Canhoto C., de Lima J.L.M.P. & de Almeida A.T. (2013). Warming up a stream reach: design of a hydraulic and heating system. *Limnology and Oceanography: Methods* *11*, 410–417. <https://doi.org/10.4319/lom.2013.11.410>
- Casas J.J., Larrañaga A., Menéndez M., Pozo J., Basaguren A., Martínez A., et al. (2013). Leaf litter decomposition of native and introduced tree species of contrasting quality in headwater

- streams: How does the regional setting matter? *Science of the Total Environment* 458, 197–208
- Clivot H., Danger M., Pagnout C., Wagner P., Rousselle P., Poupin P., et al. (2013). Impaired Leaf Litter Processing in Acidified Streams: Learning from Microbial Enzyme Activities. *Microbial Ecology* 65, 1–11.
<https://doi.org/10.1007/s00248-012-0107-x>
- Cornut J., Clivot H., Chauvet E., Elger A., Pagnout C. & Guérol F. (2012). Effect of acidification on leaf litter decomposition in benthic and hyporheic zones of woodland streams. *Water Research* 46, 6430–6444.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.09.023>
- 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, 122–131
- 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, 1604–1613.
<https://doi.org/10.1890/12-0606.1>
- Dangles O., Gessner M.O., Guérol F. & Chauvet E. (2004). Impacts of stream acidification on litter breakdown: implications for assessing ecosystem functioning. *Journal of Applied Ecology* 41, 365–378
- Delgado C., Almeida S.F.P., Elias C.L., Ferreira V. & Canhoto C. (2017). Response of biofilm growth to experimental warming in a temperate stream. *Ecohydrology* 10, e1868.
<https://doi.org/10.1002/eco.1868>
- Díaz-Villanueva V., Font J., Schwartz T. & Romaní A.M. (2011). Biofilm formation at warming temperature: acceleration of microbial colonization and microbial interactive effects. *Biofouling* 27, 59–71.
<https://doi.org/10.1080/08927014.2010.538841>
- Fenoy E., Casas J.J., Díaz-López M., Rubio J., Guil-Guerrero J.L. & Moyano-López F.J. (2016). Temperature and substrate chemistry as major drivers of interregional variability of leaf microbial decomposition and cellulolytic activity in headwater streams. *FEMS microbiology ecology* 92.
- Fernandes I., Pascoal C., Guimarães H., Pinto R., Sousa I. & Cássio F. (2012). Higher temperature reduces the effects of litter quality on decomposition by aquatic fungi: Effects of temperature and litter quality on litter decomposition. *Freshwater Biology* 57, 2306–2317.
<https://doi.org/10.1111/fwb.12004>
- Fernandes I., Seena S., Pascoal C. & Cássio F. (2014). Elevated temperature may intensify the positive effects of nutrients on microbial decomposition in streams. *Freshwater Biology* 59, 2390–2399
- Ferreira V. & Canhoto C. (2014). Effect of experimental and seasonal warming on litter decomposition in a temperate stream. *Aquatic Sciences* 76, 155–163.
<https://doi.org/10.1007/s00027-013-0322-7>
- Ferreira V. & Canhoto C. (2015). Future increase in temperature may stimulate litter decomposition in temperate mountain streams: evidence from a stream

- manipulation experiment. *Freshwater Biology* 60, 881–892. <https://doi.org/10.1111/fwb.12539>
- Ferreira V. & Chauvet E. (2011a). Future increase in temperature more than decrease in litter quality can affect microbial litter decomposition in streams. *Oecologia* 167, 279–291. <https://doi.org/10.1007/s00442-011-1976-2>
- Ferreira V. & Chauvet E. (2011b). Synergistic effects of water temperature and dissolved nutrients on litter decomposition and associated fungi. *Global Change Biology* 17, 551–564. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02185.x>
- Ferreira V., Chauvet E. & Canhoto C. (2014). Effects of experimental warming, litter species, and presence of macroinvertebrates on litter decomposition and associated decomposers in a temperate mountain stream. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 72, 206–216. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2014-0119>
- Fleituch T. (2001). Beech Leaf Breakdown and POM Storage along an Altitudinal Stream Gradient. *International Review of Hydrobiology* 86, 515–525.
- Frainer A., Primicerio R., Kortsch S., Aune M., Dolgov A.V., Fossheim M., et al. (2017). Climate-driven changes in functional biogeography of Arctic marine fish communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, 12202–12207. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706080114>
- Friberg N., Dybkjaer J.B., Ólafsson J.S., Gíslason G.M., Larsen S.E. & Lauridsen T.L. (2009). Relationships between structure and function in streams contrasting in temperature. *Freshwater Biology* 54, 2051–2068. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2009.02234.x>
- Geraldes P., Pascoal C. & Cássio F. (2012). Effects of increased temperature and aquatic fungal diversity on litter decomposition. *Fungal Ecology* 5, 734–740. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2012.05.007>
- Gessner M.O. (2005). Ergosterol as a measure of fungal biomass. In: *Methods to study litter decomposition*, Springer. pp. 189–195. Dordrecht.
- Gessner M.O. & Chauvet E. (1993). Ergosterol-to-biomass conversion factors for aquatic hyphomycetes. *Applied and environmental microbiology* 59, 502–507
- Gessner M.O. & Newell S.Y. (2002). Biomass, growth rate, and production of filamentous fungi in plant litter. *Manual of environmental microbiology* 2, 390–408
- Giardina C.P. & Ryan M.G. (2000). Evidence that decomposition rates of organic carbon in mineral soil do not vary with temperature. *Nature* 404, 858–861. <https://doi.org/10.1038/35009076>
- Gonçalves A.L., Graça M.A. & Canhoto C. (2013). The effect of temperature on leaf decomposition and diversity of associated aquatic hyphomycetes depends on the substrate. *Fungal Ecology* 6, 546–553
- Halvorson H.M., Scott E.E., Entekin S.A., Evans-White M.A. & Scott J.T. (2016). Light and dissolved phosphorus interactively affect microbial metabolism, stoichiometry and decomposition of leaf litter. *Freshwater Biology* 61, 1006–1019. <https://doi.org/10.1111/fwb.12763>

- Huey R.B. & Stevenson R.D. (1979). Integrating Thermal Physiology and Ecology of Ectotherms: A Discussion of Approaches. *Integrative and Comparative Biology* 19, 357–366
- IPCC (2014). IPCC Summary for policymakers. In: *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Field, C.B., V.R. Barros, D.J. Dokken, K.J. Mach, M.D. Mastrandrea, T.E. Billir, M. Chatterjee, K.L. Ebi, Y.O. Estrada, R.C. Genova, B. Girma, E.S. Kissel, A.N. Levy, S. MacCracken, P.R. Mastrandrea, and L.L. White (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1–32.
- IPCC (2001). *Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* IPCC.
- Iqbal S.H. & Webster J. (1973). Aquatic hyphomycetes spora of the river exe and its tributaries. *Transactions of the British Mycological Society* 61, 331–346
- Kahlert M. & McKie B.G. (2014). Comparing new and conventional methods to estimate benthic algal biomass and composition in freshwaters. *Environmental Science: Processes & Impacts* 16, 2627–2634. <https://doi.org/10.1039/C4EM00326H>
- 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
- Langan S.J., Johnston L., Donaghy M.J., Youngson A.F., Hay D.W. & Soulsby C. (2001). Variation in river water temperatures in an upland stream over a 30-year period. *Science of the Total Environment* 265, 195–207
- Manning D.W.P., Rosemond A.D., Gulis V., Benstead J.P. & Kominoski J.S. (2018). Nutrients and temperature additively increase stream microbial respiration. *Global Change Biology* 24, e233–e247. <https://doi.org/10.1111/gcb.13906>
- Martínez A., Larrañaga A., Pérez J., Descals E. & Pozo J. (2014). Temperature affects leaf litter decomposition in low-order forest streams: field and microcosm approaches. *FEMS Microbiology Ecology* 87, 257–267. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12221>
- Mas-Martí E., Muñoz I., Oliva F. & Canhoto C. (2015). Effects of increased water temperature on leaf litter quality and detritivore performance: a whole-reach manipulative experiment. *Freshwater Biology* 60, 184–197. <https://doi.org/10.1111/fwb.12485>
- O’Gorman E.J., Benstead J.P.,** Cross W.F., Friberg N., Hood J.M., Johnson P.W., et al. (2014). Climate change and geothermal ecosystems: natural laboratories, sentinel systems, and future refugia. *Global Change Biology* 20, 3291–3299. <https://doi.org/10.1111/gcb.12602>
- Olapade O.A. & Leff L.G. (2005). Seasonal Response of Stream Biofilm Communities to Dissolved Organic Matter and Nutrient Enrichments. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2278–2287. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2278-2287.2005>
- Padfield D., Lowe C., Buckling A., Ffrench-Constant R., Student Research Team, Jennings S., et al. (2017). Metabolic compensation constrains

- the temperature dependence of gross primary production. *Ecology Letters* 20, 1250–1260. <https://doi.org/10.1111/ele.12820>
- Pilgrim J.M., Fang X. & Stefan H.G. (1998). Stream temperature correlations with air temperatures in Minnesota: implications for climate warming. *JAWRA Journal of the American Water Resources Association* 34, 1109–1121
- Pozo J. & Colino R. (1992). Decomposition processes of *Spartina maritima* in a salt marsh of the Basque Country. *Hydrobiologia* 231, 165–175
- Rajashekhar M. & Kaveriappa K.M. (2000). Effects of temperature and light on growth and sporulation of aquatic hyphomycetes. *Hydrobiologia* 441, 149–153
- Romaní A. (2010). Freshwater biofilms. In: *Biofouling*, 1st ed. (Eds S. Dürr & J. Thomason), pp. 137–153. Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex [England] ; Ames, Iowa.
- Romaní A.M., Borrego C.M., Díaz-Villanueva V., Freixa A., Gich F. & Ylla I. (2014). Shifts in microbial community structure and function in light- and dark-grown biofilms driven by warming: Warming and light effects on biofilms. *Environmental Microbiology* 16, 2550–2567. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12428>
- Schnurr P.J. & Allen D.G. (2015). Factors affecting algae biofilm growth and lipid production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 52, 418–429. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.090>
- Song C., Dodds W.K., Rüegg J., Argerich A., Baker C.L., Bowden W.B., et al. (2018). Continental-scale decrease in net primary productivity in streams due to climate warming. *Nature Geoscience* 11, 415–420. <https://doi.org/10.1038/s41561-018-0125-5>
- Stefan H.G. & Sinokrot B.A. (1993). Projected global climate change impact on water temperatures in five north central US streams. *Climatic Change* 24, 353–381
- Suberkropp K. (1984). Effect of temperature on seasonal occurrence of aquatic hyphomycetes. *Transactions of the British Mycological Society* 82, 53–62
- Unterseher M., Siddique A.B., Brachmann A. & Peršoh D. (2016). Diversity and Composition of the Leaf Mycobiome of Beech (*Fagus sylvatica*) Are Affected by Local Habitat Conditions and Leaf Biochemistry. *PLOS ONE* 11, e0152878. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152878>
- Walther G.-R., Post E., Convey P., Menzel A., Parmesan C., Beebee T.J., et al. (2002). Ecological responses to recent climate change. *Nature* 416, 389–395
- Wei H., Guenet B., Vicca S., Nunan N., AbdElgawad H., Pouteau V., et al. (2014). Thermal acclimation of organic matter decomposition in an artificial forest soil is related to shifts in microbial community structure. *Soil Biology and Biochemistry* 71, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.01.003>
- Weitzel R.L. (1979). *Periphyton measurement and applications*. In: *Methods and measurements of periphyton communities: A Review*, ASTM International. (Ed. R.L. Weitzel), pp. 3–33.
- Woodward G., Dybkjaer J.B., Ólafsson J.S., Gíslason G.M., Hannesdóttir E.R. & Friberg N. (2010). Sentinel

- systems on the razor's edge: effects** of warming on Arctic geothermal stream ecosystems: Impacts of warming on Icelandic stream ecosystems. *Global Change Biology* 16, 1979–1991. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.02052.x>
- Ylla I., Canhoto C. & Romani A.M. (2014). Effects of Warming on Stream Biofilm Organic Matter Use Capabilities. *Microbial Ecology* 68, 132–145. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0406-5>
- Yvon-Durocher G., Jones J.I., Trimmer M., Woodward G. & Montoya J.M. (2010). Warming alters the metabolic balance of ecosystems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365, 2117–2126. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0038>

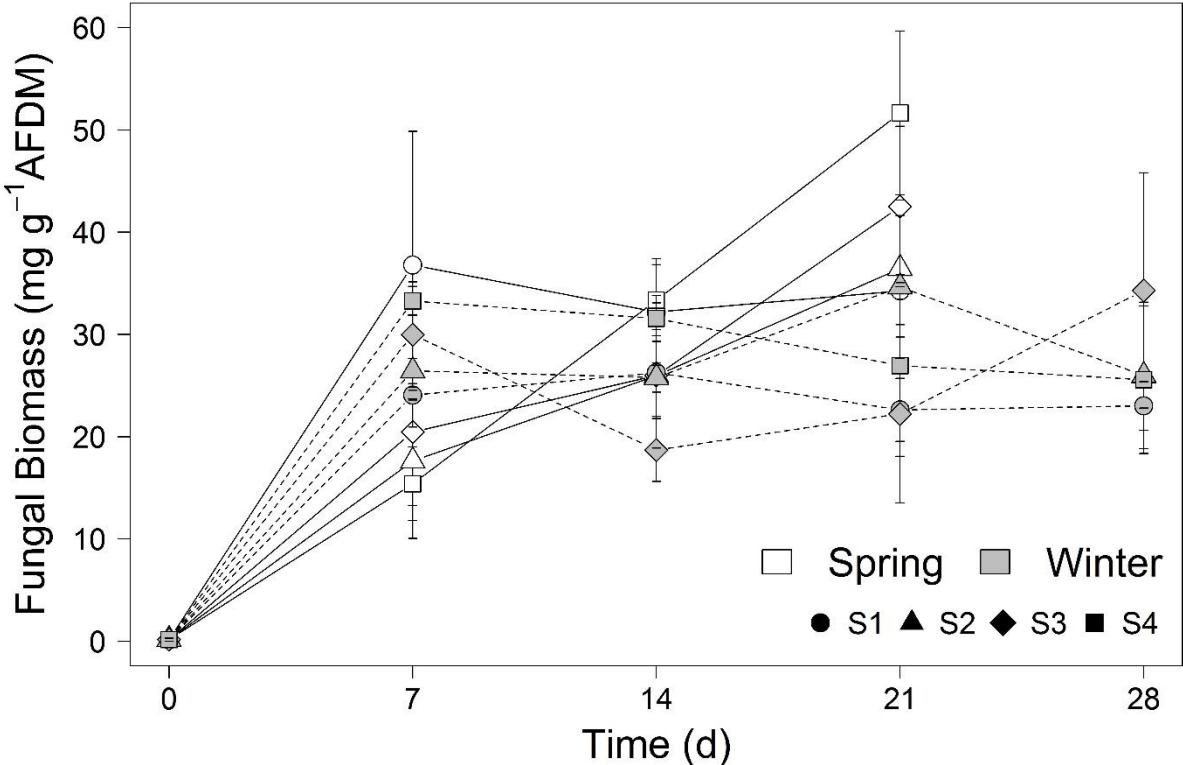


Figure S1.1 Temporal dynamics of fungal biomass associated with alder leaf discs incubated at the four sites along the negative temperature gradient. Values are averages \pm SE

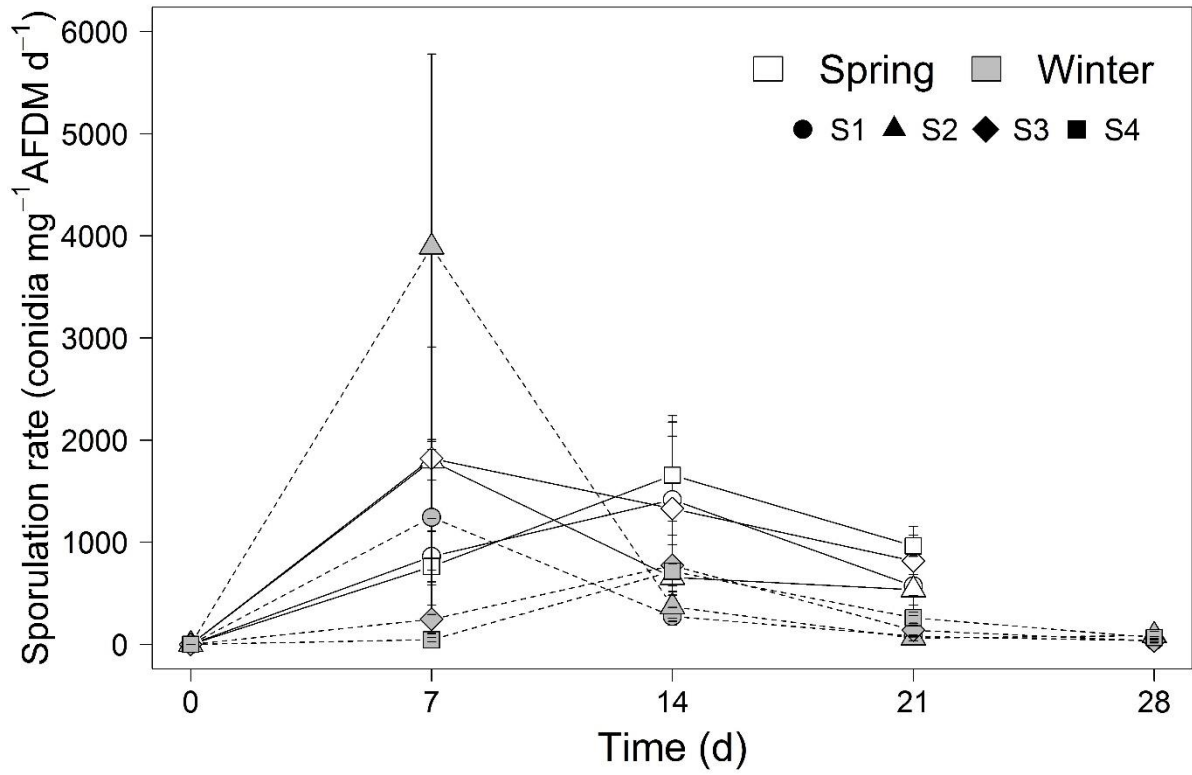


Figure S1.2 Temporal dynamics of sporulation rate of aquatic hyphomycetes associated with alder leaf discs incubated at the four sites along the negative temperature gradient. Values are averages \pm SE

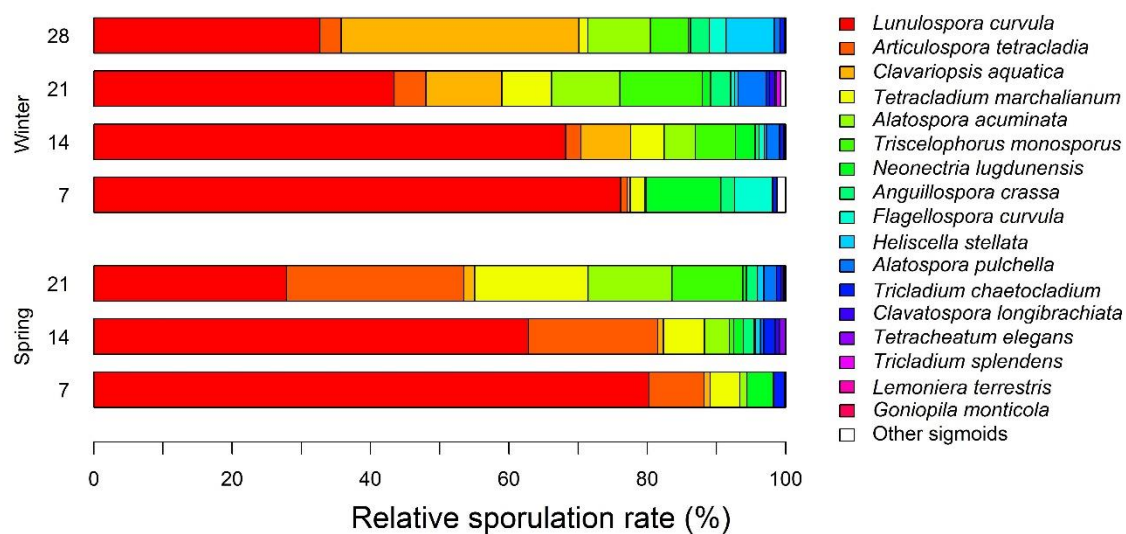


Figure S1.3 Percentage mean contribution to total sporulation rate of aquatic hyphomycete species associated with alder leaf discs after 7, 14, 21 and 28 days of immersion at the four sites along the negative temperature gradient in spring 2016 and winter 2017

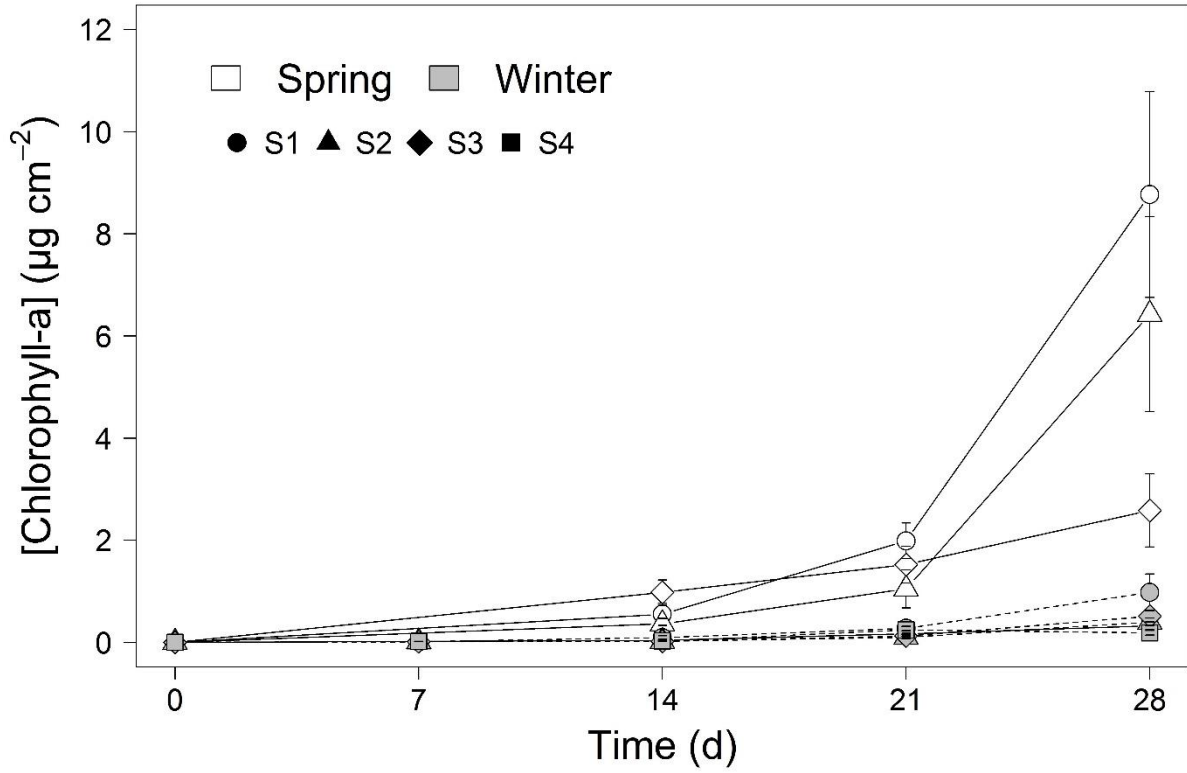


Figure S1.4 Temporal dynamics of biofilm chlorophyll-a concentration on ceramic tiles measured at the four sites along the negative temperature gradient. Values are averages \pm SE

CHAPITRE 2

“What is driving differences between decomposition processes in streams: temperature, season, or leaf-litter type (substrate quality)?”

(Gossiaux et al., in prep)

Alice Gossiaux¹ | Pascal Poupin¹ | Jérémy Jabiol^{1,2} | Eric Chauvet² | François Guérol¹

¹LIEC – Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, Université de Lorraine, UMR 7360, Avenue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

²Ecolab – Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement, Université de Toulouse, UPS, CNRS, INPT, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France

Abstract

In headwater streams, decomposition of allochthonous organic matter and primary production are two key processes of ecosystem functioning. Thus, anticipating their responses on warming is essential to predict consequences for food webs and carbon (C) cycle. However, *in natura*, these responses can be modulated by numerous other environmental factors, such as seasonal variations and nutrients availability. In this study, we compared microbial litter decomposition and associated aquatic hyphomycete communities of two litter types (beech (*Fagus sylvatica*) or alder (*Alnus glutinosa*) leaf discs) enclosed in fine-mesh bags along a natural geothermal temperature gradient, in both spring and winter. Concurrently, we monitored the chlorophyll-*a* accrual in surface-attached biofilm growing on ceramic tiles. The temperature gradient, from upstream to downstream, varied with time of exposition (28 and 42 days for alder and beech, respectively) and fluctuated around a mean of 15.5 °C, with a 1 °C range in spring and a 5 °C range in winter. Results highlighted differences between litter species, and showed important influence of season both on autotrophs and heterotrophs. **Biofilm's** chlorophyll-*a* accrual was higher in spring than in winter. The decomposition rates of alder and beech leaf-litter were affected by season in opposite ways, independently of temperature. In oligotrophic conditions, this study reveals that the nature of the interactions between microbial decomposers and primary producers may rely on the quality of the resources and the availability of light. Overall, these results highlight that multiple factors (season, litter type) can overwhelm temperature effects on the functioning of freshwater ecosystems.

Key-words: decomposition – temperature – seasons – litter quality – microbial

Introduction

Current scenarios of global change predict unprecedented temperature fast increase, which can directly affect ecosystems (IPCC 2014; Yvon-Durocher et al. 2017). In aquatic ecosystems, domino effect predicts that stream water temperature will mirror this increase, in particular during winter and spring (Langan et al. 2001; Pilgrim et al. 1998; Stefan and Sinokrot 1993). Due to its fundamental role in biological processes (Friberg et al. 2009; Woodward et al. 2010), temperature rise triggers various ecological responses (Bernabé et al. 2018; Durance and Ormerod 2007; Frainer et al. 2017; Pérez et al. 2018). As mean air temperature rises rapidly worldwide, it became critical to understand its impacts on changes in ecological communities and the key processes of ecosystems functioning they assume.

Forested headwater streams collect large amounts of allochthonous organic litter from the riparian zone (Hart et al. 2013; Wallace et al. 1997), which represent the major source of energy for aquatic food-webs in such ecosystems, and participate significantly to the global carbon (C) cycle (Benfield 2006). At the bottom of these food-webs, aquatic hyphomycetes control the initial leaf-litter decomposition (Bärlocher 1985) and respiration of detrital inputs (Findlay et al. 2002). In low-order forested streams, the riparian zone also limits light availability for primary producers, which are mainly represented by surface-attached biofilms (Weitzel 1979). Both microbial compartments take part in aquatic food-webs and contribute substantially to biochemical processes and ecosystem functioning (Besemer 2015; Romaní 2010). As they contribute in opposite ways to the carbon cycle (C fixation vs. C mineralization) and may have different sensitivities to temperature and seasonal variability, climate change could have critical effects on carbon cycle balance in streams. Due to their key ecological position, many studies focused on the effect of warming on aquatic microbial communities and leaf-litter decomposition, using different strategies to manipulate temperature across studies. However, predicting to what extent temperature changes will affect stream ecosystem processes is challenging, due to the difficulty to control this factor while studying complex systems, which can lead to contrasted results.

Moreover, temperature effects can be mediated by several other factors, such as litter quality. For example, Gonçalves et al. (2013) reported a faster microbial decomposition of low-quality leaves (oak) in microcosms under increased temperature

conditions but no effect on high-quality leaf (alder) microbial decomposition. By contrast, Ferreira and Chauvet (2011a) found a positive effect of temperature on decomposition rates and fungal respiration in a microcosm study, but no effect of litter quality. In the same way, Ferreira et al. (2014) observed a stimulation of the microbial decomposition of both low- and high-quality litter in an experimentally warmed stream. Finally, in a manipulative experiment, Ferreira and Canhoto (2014), reported positive effect of warming on low-quality (oak) litter decomposition but only in winter. The authors therefore insist on the need to consider simultaneous changes in other environmental variables when addressing the effect of temperature.

In this perspective, natural geothermal gradients offer a promising approach to study and understand the effects of global warming on stream functioning by isolating temperature from other drivers while integrating the complexity of natural systems (O’Gorman et al. 2014).

The main objective of this study was to rely on the natural temperature gradient (up to 21 °C) occurring along a geothermal spring to investigate the effects of water temperature on beech leaf litter decomposition and on primary producers (through chlorophyll-a) across two contrasted seasonal contexts (spring and winter). We hypothesized that even slight increases in water temperature (<1.1°C in spring and <5.0°C in winter) will lead (i) to an increase in leaf microbial decomposition (ii) through changes in leaf-associated aquatic hyphomycete communities, and (iii) an increase in in situ algal production. We expected that the effect of temperature rise would be stronger in winter for leaf decomposition (Ferreira and Canhoto 2015) and in spring for primary producers (Delgado et al. 2017; Olapade and Leff 2005). Finally, we profited from a parallel study on alder decomposition to compare temperature and season effects on different leaf-litter quality (Gossiaux et al. 2019).

Material and methods

Study site and stream characterization

The study was carried out in spring 2016 and winter 2017 in a first-order stream fed by a temperate geothermal source, located in Vecoux (Vosges Mountains north-

eastern France; 47°58'01.8"N, 6°39'56.5"E, 540 m a.s.l.). The spring outlet exhibits a constant temperature of 21°C and provides a constant discharge throughout the year. The water of this small forested stream (length = 106 m) cools down from upstream to downstream through contact with air until it reaches a cold second-order stream. The watercourse is underlain by granite bedrock and surrounded by a mixed coniferous forest mainly composed of silver fir (*Abies alba* Karst.), Norway spruce (*Picea abies* Karst.), alder (*Alnus glutinosa*), beech (*Fagus sylvatica*). The riverbed of the stream mainly consists in sand and gravels with some cobbles.

The experiments were conducted at four sites, each separated by ca. 20.4 m, chosen along the stream section to capture the widest temperature range and maximize between-sites temperature differences. At each site, water temperature was recorded every 30 min with submerged data loggers (Hobo Pendant UA-001-08, Onset Computer Corp., Massachusetts, USA). The mean difference in water temperature (\pm SD) between sites 1 and 4 was 1.10 ± 0.33 °C in spring and 4.94 ± 1.27 °C in winter (Fig. 2.1).

Water samples (500 mL) from each site were collected on four occasions during the experiments. Stream pH was measured in the laboratory using a microprocessor pH meter (pH 3000, WTW) and acid-neutralizing capacity (ANC) was determined by **Gran's titration**. Conductivity was measured with a **Metrohm Herisau Conductometer E518** (Herisau, Switzerland) at 25 °C. Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺ and K⁺ concentrations were determined by atomic absorption spectrophotometry (AAnalyst 100; Perkin Elmer and Varian SpetrAA-300) and concentrations in Cl⁻, NO₃⁻, PO₄²⁻ and SO₄²⁻ by ion chromatography (Dionex 1500i; Sunnyvale, USA; Gossiaux et al. 2019).

Leaf conditioning

Alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) and beech leaves (*Fagus sylvatica* L.), two common riparian tree species in the area and in Europe, were collected just after abscission in October 2015 and 2016. For each season, 480 alder leaf discs and 360 beech leaf discs (diameter 16 mm) were cut with a cork-borer, avoiding the central vein, and air-dried in the dark at ambient temperature until needed. Discs were individually weighted (\pm 0.1 mg) to determine initial dry mass (DM) before being enclosed in fine

mesh bags composed of rows of five discs (40 alder and 30 beech discs; bag size: 13 × 22.8 cm, 0.25 mm mesh). Three bags of each litter type (*i.e.* replicates) were submerged at each site. After 7, 14, 21 and 28 d of immersion for alder and 14, 28 and 42 days for beech (*i.e.* sampling dates), two rows of five discs per replicate bag were sampled (*i.e.* one row for mass loss estimation and the other one for fungal biomass and diversity measurements), placed in individual ziplock bags containing stream water, and transported to the laboratory in a cooler.

Leaf mass loss

To determine DM at each sampling date, five discs from each bag were gently washed with distilled water, oven-dried at 60°C for 72 h to constant mass, and weighed (± 0.1 mg). The discs were then ignited in a muffle furnace at 550 °C for 4 h to determine the ash-free dry mass (AFDM). Three unexposed sets of five discs per litter type were used to determine leaf initial AFDM.

Fungal biomass and diversity

At each sampling date, five other discs from each bag were placed in 100-mL Erlenmeyer flasks filled with 20 mL of filtered stream water (Glass microfibre GF/F, Whatman; pore size 0.7 μ m) to determine sporulation rates and species composition of alder and beech leaf-associated fungal assemblages. They were then incubated at 17 °C in the dark for 48 h on an orbital shaker (100 rpm). Unfortunately, in spring, remaining masses were insufficient to perform fungal biomass and diversity analyses at 28 d.

After incubation, the discs were removed and frozen at -20 °C for future ergosterol content measurement according to Gessner and Newell (2002). Ergosterol was quantified by HPLC (Gessner 2005), and then converted into fungal biomass using a conversion factor of 5.5 μ g ergosterol per mg of fungal dry mass (Gessner and Chauvet 1993).

Conidial suspensions were poured into 50-mL Falcon tubes, fixed with 2 mL of 37 % formalin, and the final volume was adjusted to 40 mL with distilled water. 250

μL TritonX-100 (0.5 %) was added to the suspension, mixed with a magnetic stirring bar to ensure uniform distribution of conidia, and an aliquot (1-10 mL) of the suspension was filtered through membrane filters (25 mm diameter, pore size 5 μm ; Millipore SMWP, Millipore Corporation, MA, USA). Filters were stained with 0.1 % Trypan blue in 60 % lactic acid (Iqbal and Webster 1973), and conidia were identified and counted under a microscope at $\times 200$ magnification (Bärlocher 2005). Sporulation rate was expressed as the number of conidia released per mg leaf AFDM per day, and per mg fungal biomass per day.

Moreover, conidial assemblages from stream water were characterized following the same procedure, based on three filtrations of 100 mL of the stream water from each site and for each season (25 mm diameter, pore size 5 μm ; Millipore SMWP, Millipore Corporation, MA, USA). Moreover, conidial assemblages from stream water were characterized following the same procedure, based on three filtrations of 100 mL of the stream water at each site and in each season (25 mm diameter, pore size 5 μm ; Millipore SMWP, Millipore Corporation, MA, USA).

Chlorophyll-a

At each site, six ceramic tiles (individual upper surface area: 5 \times 5 cm) were placed on the stream bed during 42 d. At 7, 14, 21, 28 and 42 d, the overall biomass of benthic algae colonizing the ceramic tiles was quantified *in situ* using the BenthosTorch (bbe Moldaenke), a fluorometric probe designed for use in the field that has been proven reliable for total chlorophyll-a concentration assessments (see Kahlert and McKie 2014). The BenthosTorch was directly applied to the surface of each ceramic tile ensuring that the foam pad around the diodes shadowed the biofilms from external light. The overall biomass of benthic algae was expressed as μg Chlorophyll-a per cm^2 .

Data analysis

Decomposition rates of alder and beech leaf discs (k) were calculated assuming (a) a linear decay, by regression of the linear model $M_t = M_0 - k \times t$ (where M_0 is the initial AFDM, M_t is the AFDM at time t and k is the decomposition rate; Table 2.2;

Pozo and Colino 1992). The effect of temperature, season, litter species and interaction between temperature, season and litter species on decomposition rates were evaluated using linear mixed-effects models (LME; *nlme-package* in R) with random effects of mesh bags (*i.e.* blocks) identity nested into site. The significance of independent factors **in LMEs was evaluated using type “III” or “II” sum of squares** (*car-package* in R), depending on the presence of interactions. Indeed, when not significant, the interaction was removed for model simplification. Season, litter species, site and block identity were considered as categorical variables, whereas temperature was integrated as a continuous variable in LME models. The model assumptions (normality and homoscedasticity) were assessed graphically, as well as with Shapiro tests on the residuals. Finally, to assess the effect of between-sites differences, linear models were constructed with season and site as categorical variables, then analyzed with ANOVA, and finally followed by Tukey HSD post hoc test ($p < 0.05$).

During the experiment, variations in fungal biomass and assemblages associated with alder and beech leaf discs were analyzed by nonmetric multidimensional scaling ordination (NMDS) based on Bray-Curtis dissimilarity of each variable parameters (mean, standard deviation, maximum and day at which maximum was reach). PERMANOVA was performed to test for effects of temperature, season, litter species and interactions between variables on fungal biomass and sporulation parameters (*RVAideMemoire-package* in R). The possible influence of the distance from the source was analyzed for ambient conidial counts (to represent inocula) before the beginning of the experiment at each site and in each season with Jaccard similarity (J) and Bray-Curtis dissimilarity (BC) coefficients. Finally, multiple comparison tests after Kruskal-Wallis (*kruskalmc; pgirmess-package* in R) were used to analyze temperature differences between combinations of sites and seasons.

All statistical analyses were performed with the R software (R Core Team 2017, version 3.4.2.).

Results

Stream water characterization

The mean temperature range was wider in winter than in spring (4.57 ± 1.19 °C and 1.17 ± 0.34 °C, respectively; Fig. 2.1). Thus, in winter, mean temperature of the warmest site (S1) was higher than in spring (18.3 °C and 16.2 °C, respectively), while it was lower at the coldest site (S4; 13.7°C and 15.0°C in spring, respectively). On average, the temperature difference (\pm SD) between two successive sites (S1-S2; S2-S3 and S3-S4) was 0.39 ± 0.10 °C in spring and 1.52 ± 0.30 °C in winter during the 42 d of the experiment. It resulted in a global 680-631 degree-days gradient in spring and a 576-768 degree-days gradient in winter. Temperatures were all significantly different between all site \times season combinations except for S4-spring and S3-winter (Fig. 2.1).

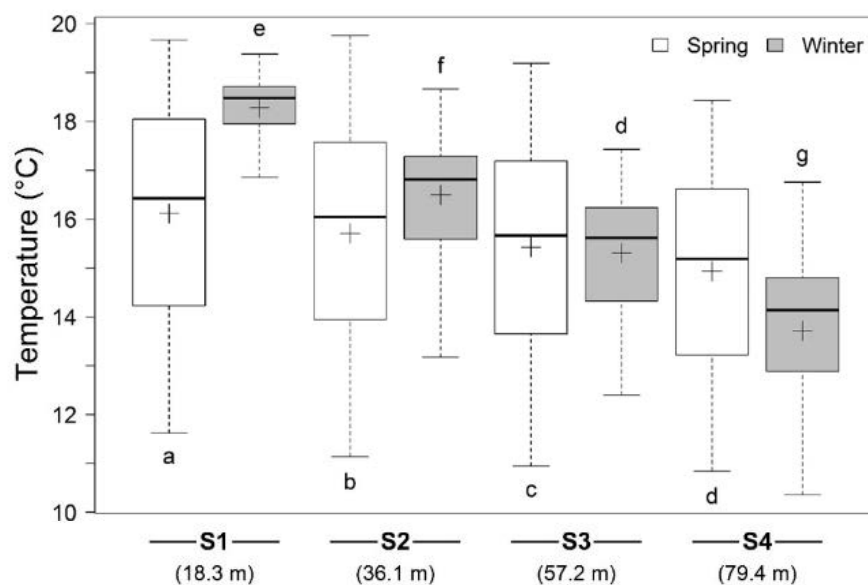


Figure 2.1 Water temperature at the four sites (ordered by increasing distance along the stream reach) across the two study periods. Each boxplot represent the temperature data collected every 30 minutes during the 42d experiments ($n=1987$ in spring and $n=2016$ in winter). Central line is median; plus sign is mean; box top and bottom are first and third quartiles; whiskers are confidence limits). Sites with the same letter do not differ significantly (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$)

During the experiments, the stream water characteristics remained rather constant through time and did not differ between sites. Water was slightly alkaline and relatively nutrient-poor in comparison with other streams of the area (see Gossiaux et al. 2019). Air temperature was higher in spring than in winter (9.02 ± 5.32 °C and 1.42 ± 5.62 °C on average, respectively). Finally, aquatic hyphomycete inocula before the

onset of experiment were very similar between sites in spring (BC < 0.16 and J > 0.9) with similarity indices being slightly lower in winter (BC < 0.34 and J > 0.8).

Decomposition rates

Decomposition rates of alder after 28 d were significantly higher than beech litter decomposition rates after 42 d (Fig. 2.2). For each litter type, whatever the range of temperature observed (1.1 °C in spring and 4.9 °C in winter between site 1 and 4 after 28 d for alder and 1.17 °C in spring and 4.57 °C in winter after 42 d for beech, Table 2.1), linear decomposition rates were not significantly different within a season (Fig. 2.2). Overall, we observed a strong effect of season × litter species (ANOVA, Season × Litter species, $p < 0.0001$). In fact, whereas alder decomposition rates were significantly higher in spring than in winter (0.031-0.034 d⁻¹ and 0.021-0.024 d⁻¹, respectively; Fig. 2.2), the opposite tendency was found for beech decomposition rates (0.0042-0.0052 d⁻¹ and 0.0053-0.0064 d⁻¹ respectively; Fig. 2.2). These seasonal differences in decomposition rates occurred in spring occurred independently of temperature differences between winter and spring (Table 2.1). Mean water temperature in spring was actually lower for site 1 and 2 (respectively -2.45 °C and -0.96 °C on average than in winter), but higher for site 4 (+1.16 °C than in winter). By contrast, temperature was similar across seasons on site 3 (0.20 °C higher in winter).

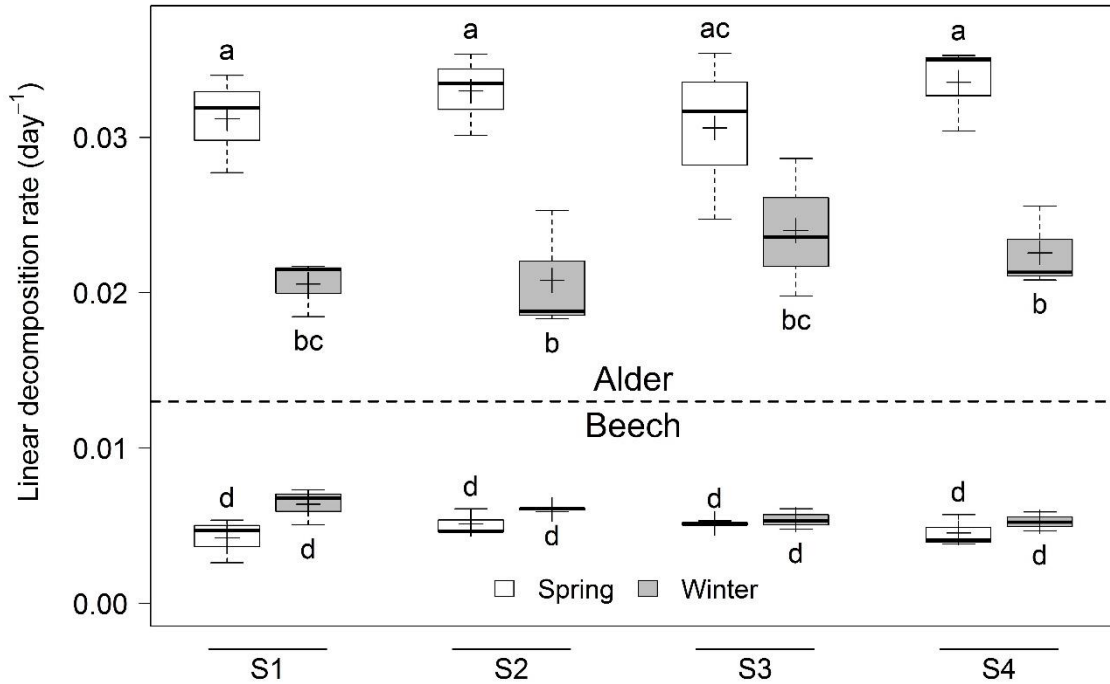


Figure 2.2 Linear decomposition rates of alder (top, from Gossiaux et al. 2019) and beech (bottom) leaf disks incubated at the four sites along the negative temperature gradient. Values are averages \pm SE. Sites with the same letter do not differ significantly (ANOVA followed by Tukey HSD test; p -value <0.05)

Fungal biomass and diversity

Whereas fungal biomass associated with alder discs was similar between seasons (Table 2.1), average fungal biomass \pm SD associated with beech discs was higher in winter (60.0 ± 11.9 mg g⁻¹ AFDM) than in spring (35.8 ± 13.5 mg g⁻¹ AFDM). Fungal biomass associated with alder discs reached maximums at different sampling times, but decreased generally after 21 d (Table 2.1). Fungal biomass associated with beech discs slightly decreased in both seasons after 28 d (Table 2.1). PERMANOVA revealed significant differences between the two litter species (Litter Species, $p < 0.001$). Furthermore, seasons had a significant influence on fungal biomass (PERMANOVA; Season \times Litter Species $p = 0.004$; Season, $p = 0.041$), whereas the influence of temperature was found only in interaction with season and with litter species (PERMANOVA; Temperature \times Season, $p = 0.038$; Temperature \times Litter Species, $p = 0.018$). The NMDS ordination diagram of fungal biomass parameters (based on mean, SD, max and d_{max}) indicates a separation between litter species (Axis

2; Alder in spring vs Beech in winter; Fig. 2.3a), but mostly a significant influence of seasons for each litter species (Axis 1, Beech; Axis 2, Alder; Fig. 2.3a).

Table 2.1. Decomposition rates, fungal biomass (in mg g⁻¹ AFDM) and sporulation rates (in conidia mg⁻¹ AFDM d⁻¹) of aquatic hyphomycetes measured on alder and beech discs incubated at the 4 sites in spring and winter: mean (\pm SD), maximum and number of days at which maximum was reach (in d).

Litter species	Season	Site	Temperature	Decomposition		Fungal biomass			Sporulation rates		
				$k \pm SE$	Mean \pm SD	Max	d_{Max}	Mean \pm SD	Max	d_{Max}	
Alder	Spring	S1	15.33	0.031 \pm 0.002	34.41 \pm 12.37	62.86	7	950.16 \pm 734.76	2587.50	14	
Alder	Spring	S2	14.96	0.033 \pm 0.002	26.69 \pm 13.46	46.11	21	995.63 \pm 649.02	2032.08	7	
Alder	Spring	S3	14.69	0.031 \pm 0.003	29.65 \pm 14.88	54.31	21	1322.07 \pm 1307.35	3972.17	7	
Alder	Spring	S4	14.23	0.034 \pm 0.002	33.47 \pm 17.71	67.36	21	1127.79 \pm 771.76	2809.36	14	
Alder	Winter	S1	18.17	0.021 \pm 0.001	23.98 \pm 4.52	31.59	14	408.16 \pm 712.44	2438.78	7	
Alder	Winter	S2	16.18	0.021 \pm 0.002	28.22 \pm 9.34	48.62	21	1102.98 \pm 2190.24	6799.78	7	
Alder	Winter	S3	14.93	0.024 \pm 0.003	26.31 \pm 13.22	47.82	28	297.32 \pm 349.65	1106.56	14	
Alder	Winter	S4	13.23	0.023 \pm 0.002	29.34 \pm 9.29	43.14	21	272.28 \pm 460.02	1688.59	14	
Beech	Spring	S1	16.19	0.004 \pm 0.001	38.61 \pm 12.76	57.78	28	160.94 \pm 113.92	410.44	14	
Beech	Spring	S2	15.78	0.005 \pm 0.000	34.79 \pm 11.75	58.64	28	95.41 \pm 51.93	197.38	28	
Beech	Spring	S3	15.50	0.005 \pm 0.000	33.00 \pm 14.76	54.35	28	82.48 \pm 63.86	185.49	28	
Beech	Spring	S4	15.02	0.005 \pm 0.001	36.73 \pm 16.19	52.55	28	71.12 \pm 50.16	146.96	28	
Beech	Winter	S1	18.28	0.006 \pm 0.001	59.82 \pm 16.01	76.96	28	36.46 \pm 47.19	117.30	28	
Beech	Winter	S2	16.11	0.006 \pm 0.000	66.42 \pm 8.88	80.13	28	36.13 \pm 35.34	126.20	28	
Beech	Winter	S3	15.30	0.005 \pm 0.000	56.87 \pm 10.69	74.62	28	80.54 \pm 73.23	203.87	14	
Beech	Winter	S4	13.71	0.005 \pm 0.000	57.05 \pm 9.95	73.74	14	56.69 \pm 84.27	269.14	28	

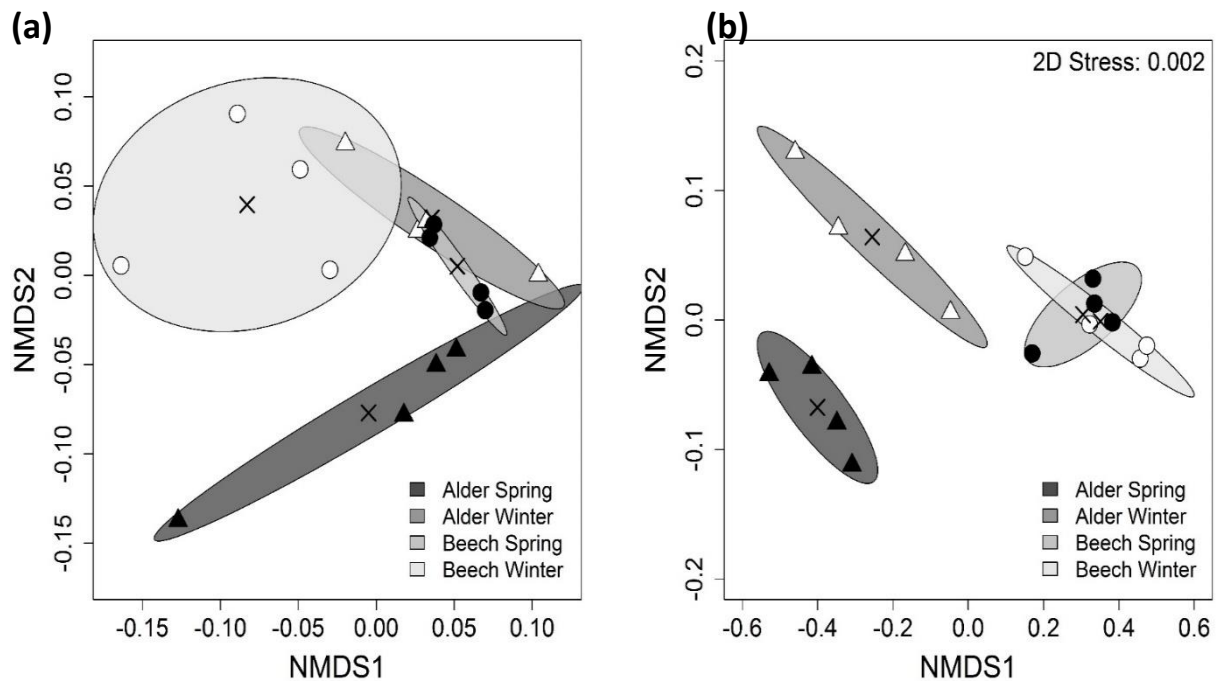


Figure 2.3 NMDS ordination diagram based on fungal biomass (a) and sporulation rates (b) associated with alder and beech discs assessed from mean, standard deviation, maximum and day at which maximum was reached for each variable at the four sites along the negative temperature gradient in spring 2016 and winter 2017. Crosses represent centroids of ellipses and confidence limits are 0.75

During the experiments, total sporulation rates of aquatic hyphomycetes associated with beech disks a maximum of 410.4 conidia mg^{-1} AFDM d^{-1} which was considerably lower than total sporulation rates measured with alder discs (6799.8 conidia mg^{-1} AFDM d^{-1} ; Table 2.1). PERMANOVA revealed that only litter species significantly affected sporulation rates parameters (Litter Species, $p = 0.001$), whereas season and temperature were not significant even when considered in interaction (PERMANOVA, all other $p > 0.05$). The NMDS ordination diagram of sporulation rates parameters (based on mean, SD, max and d_{max}) indicates a separation between litter species (Axis 1; Fig. 2.3b), and a significant influence of seasons for alder (Axis 2, Alder; Fig. 2.3b).

Aquatic hyphomycete species richness was similar between seasons, litter types and sites, with a total of 18 species observed (see Gossiaux et al 2019). For both litter species, the dominant species at all sites in both seasons was *Lunulospora curvula*, whose relative contribution to total conidial production was particularly high during the first decomposition stages (7 and 14 d). *L. curvula* remained the dominant aquatic hyphomycete associated with alder leaf discs during the 28 d of experiment (Fig. 2.4a). On the contrary, after 28 and 42 d, a shift between spring and winter occurred in the relative contribution of *L. curvula* to total conidia production measured on beech discs: while this species remained dominant in spring, it was replaced by *Clavariopsis aquatica* in winter (Fig. 2.4b).

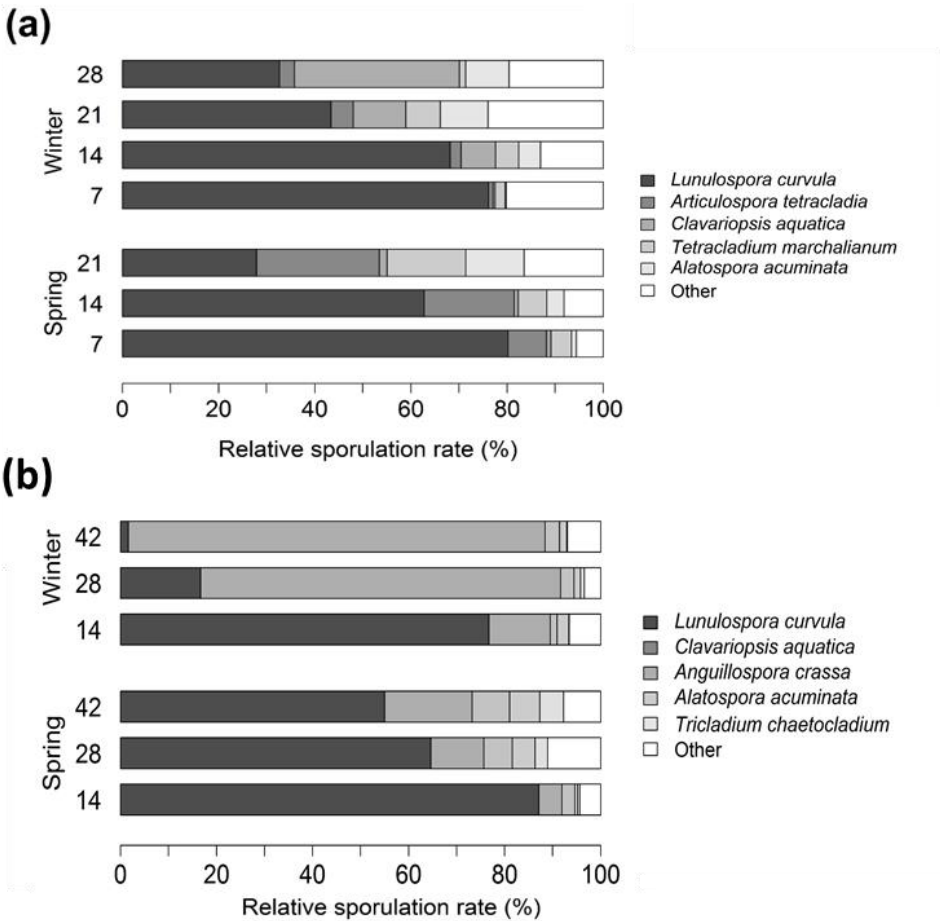


Figure 2.4 Percentage contribution of aquatic hyphomycete species to total conidial production associated with alder leaf discs (a) and beech leaf discs (b) during 7, 14, 21 and 28 days and 14, 21 and 42 days of immersion (for alder and beech, respectively) at the four sites along the negative temperature gradient in spring 2016 and winter 2017

Chlorophyll-a concentration

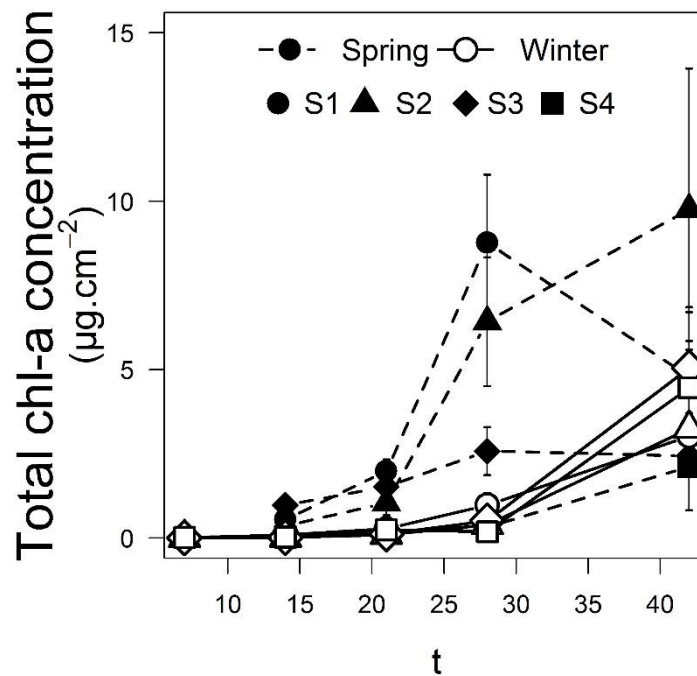


Figure 2.5 Temporal dynamics of biofilm chlorophyll-a concentration on ceramic tiles measured at the four sites along the negative temperature gradient during the 42d experiment. Values are averages \pm SE

During the experiment, chlorophyll-*a* (chl-*a*) concentration in biofilm colonizing the ceramic tiles increased from 0 to 28 d, then either kept increasing or declined after 42 d (Fig.5). After 28 d, mean chl-*a* concentration was almost 9-fold higher in spring than in winter (4.53 and 0.52 $\mu\text{g cm}^{-2}$, respectively). In spring, an increase of 1 °C led to a 24.7-fold increase in mean chl-*a* concentrations after 28 d (Fig.5; S1 is the warmest site and S4 the coolest), while the 5 °C winter increase only led to a 5.3-fold increase (Fig.5). However, the influence of temperature on chl-*a* concentrations was no longer noticeable after 42 d, and no significant difference between sites \times seasons combinations were found at this sampling date (Kruskal-Wallis test, $p = 0.005$).

Discussion

Contrasting with the current leading conceptions of temperature effects on biological rates (Brown et al. 2004), our results suggest a limited influence of temperature on decomposition of alder and beech leaf litter and associated aquatic hyphomycete communities. In fact, temperature effects occurring on fungal biomass and sporulation rates were always observed in interaction with season or with litter species, suggesting that (i) temperature affected fungal growth and reproduction differently on the two litter species and (ii) these temperature effects may depend on seasonal influence on community structure. As shown by Bruder et al. (2014) and Graça et al. (2001), other environmental factors than temperature can strongly influence microbial decomposition, and mask temperature effects, even when considering large temperature gradients. In agreement with these findings, our results suggest that seasonal variations prevailed over potential temperature effects, which we could assess thanks to the provision of year-round constant water temperature from the thermal source.

The observed temperature independence of microbial decomposition contrasts with results of several previous field and microcosms studies conducted in similar ranges of temperature (Fenoy et al. 2016; Fernandes et al. 2014; Ferreira and Chauvet 2011a,b; Friberg et al. 2009). However, it echoes studies revealing a seasonal effect and a limited effect of temperature (Duarte et al. 2016; Ferreira and Canhoto 2014, 2015; Graça et al. 2001). Furthermore, we observed an opposite seasonal response of decomposition rates of alder and beech leaf-litter, in concordance with observed differences in fungal biomass parameters. Sporulation rates, along with the seasonal shifts in aquatic hyphomycete community composition observed, differed strongly between species. These results are consistent with Nikolcheva and Bärlocher (2005), who observed a strong seasonal effect on presence/absence of fungal taxa and reproductive efforts, whereas fungal biomass seems very sensitive to temperature (Duarte et al. 2016; Domingos et al. 2015; Fernandes et al. 2014).

Overall, the response of stream litter decomposition processes to warming was linked to the litter type or quality. Indeed, recalcitrant organic matter decomposition is often more sensitive to temperature compared with high-quality litter, as shown for both terrestrial (Conant et al. 2011; Fierer et al. 2005) and aquatic ecosystems (Follstad Shah et al. 2017; Gonçalves et al. 2013). In this work, we compared the influence of

temperature and seasons on a low-quality litter (beech) and a high-quality litter (alder). This simultaneous experiment allowed us to compare the results from both litter types processed in the same conditions. With alder leaf-litter, we found a significantly higher microbial decomposition during spring; whereas beech leaves decomposed faster in winter (Fig. 2.2). Fernandes et al. (2012) have shown that higher temperatures may weaken the effects of litter quality on decomposition in streams, suggesting that slow decomposing low-quality litter could be accelerated by warming, whereas the opposite could happen with high-quality fast decomposing litter. However, in our study, the lack of temperature effect on both species decomposition rates (alder and beech), makes this explanation unlikely.

A probable reason of this opposite response between alder and beech decomposition to seasons could be found in the interactions between aquatic hyphomycetes and biofilm. Indeed, some theoretical models and experimental results indicate that autotrophic (biofilm) and heterotrophic (aquatic hyphomycetes) microorganisms can either compete for nutrients or benefit from each other through mutualism relationships, and thus, impact organic matter processing (Danger et al. 2007; Guenet et al. 2010; Kuehn et al. 2014). In our study, biofilm chlorophyll-*a* was higher in spring than in winter at 28 days, and higher at hotter sites than at colder ones. However, after 42 days, this strong temperature effect in spring was not observed anymore (Fig. 2.5). One explanation lies in the fact that warming can produce thicker biofilms (Delgado et al. 2017; Díaz-Villanueva et al. 2011), which was observed in the field; and that such thick biofilms may also be more sensitive to detachment. In winter, winter biofilm chlorophyll-*a* concentration remained low relative to spring, independently of higher temperature of the two warmest sites (Fig. 2.5). This could be linked to lower daily duration and intensity of sunlight in winter, relative to spring. Finally, as the stream water was relatively nutrient-poor, our study suggests that autotroph-heterotroph microbial interactions were influenced (*i*) by initial leaves nutrient content, which was higher in alder than in beech leaves, and (*ii*) by season, because of the difference in light availability between spring and winter. We hypothesized that higher decomposition rates of alder in spring than in winter could be due to mutualism relationships between autotrophs and heterotrophs, because of sufficient (*i*) light availability for biofilm growth in spring and (*ii*) high nutrient content of alder leaves allowing both microbial compartments to share resources. On the contrary, on beech leaves, where nutrient content is scarce, when light availability was

sufficient to allow the development of biofilm, a competition for nutrients may occur between autotrophs and heterotrophs, resulting in a limitation of decomposition rates in spring, and maybe shifts in aquatic hyphomycetes as well.

Finally, our study suggest that experiments in temperate geothermal springs bring new elements to understand ecosystem complex responses to seasonal and global warming, despite some obvious limitations. The small size and scarcity of this system limits our ability to study temperature effects over larger and/or colder gradients, and precludes the replication of the experiment in other similar systems. It remains that such natural springs exhibit complex and representative communities and food-webs, compared to oversimplified laboratory assemblages. Most importantly, they allow overcoming the technical challenge associated with temperature manipulation in natural streams (Canhoto et al. 2013), and provide a steady water temperature across seasons. It is thus a useful tool for the assessment of temperature effects on ecological processes at the ecosystem scale, as suggested in previous studies on Icelandic tundra geothermal ecosystems (O’Gorman et al. 2014; Woodward et al. 2010) and should bring important knowledge on the influence of short- (e.g. seasonal) to long- (e.g. climate warming) term temperature variations on communities and ecosystem processes under our latitudes as well.

Acknowledgments

We thank P. Rousselle and D. Lambrigot for water and ergosterol analyses and P. Wagner, M. Odinot, and F. Louis for valuable help in the field. The present study was funded by the French National Research Agency (ANR-14-CE01-0009) and the French National Program EC2CO (2016-2017).

References

- Bärlocher F. (2005). Sporulation by aquatic hyphomycetes. In: *Methods to study litter decomposition*, Springer. pp. 185–188. Dordrecht.
- Bärlocher F. (1985). The role of fungi in the nutrition of stream invertebrates. *Botanical journal of the Linnean Society* 91, 83–94
- Benfield E.F. (2006). Decomposition of leaf material. In: *Methods in stream ecology*, 2nd ed. (Eds F.R. Hauer & G.A. Lamberti), pp. 711–

720. Academic Press/Elsevier, San Diego, Calif.
- Bernabé T.N., de Omena P.M., Santos V.P. dos, de Siqueira V.M., de Oliveira V.M. & Romero G.Q. (2018). Warming weakens facilitative interactions between decomposers and detritivores, and modifies freshwater ecosystem functioning. *Global Change Biology*, *24*, 7, 3170–3186. <https://doi.org/10.1111/gcb.14109>
- Besemer K. (2015). Biodiversity, community structure and function of biofilms in stream ecosystems. *Research in Microbiology* *166*, 774–781. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.05.006>
- Brown J.H., Gillooly J.F., Allen A.P., Savage V.M. & West G.B. (2004). Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology* *85*, 1771–1789
- 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. <https://doi.org/10.1111/fwb.12276>
- Canhoto C., de Lima J.L.M.P. & de Almeida A.T. (2013). Warming up a stream reach: design of a hydraulic and heating system. *Limnology and Oceanography: Methods* *11*, 410–417. <https://doi.org/10.4319/lom.2013.11.410>
- Conant R.T., Drijber R.A., Haddix M.L., Parton W.J., Paul E.A., Plante A.F., et al. (2008). Sensitivity of organic matter decomposition to warming varies with its quality: Temperature sensitivity of organic matter decomposition. *Global Change Biology* *14*, 868–877. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2008.01541.x>
- Danger M., Leflaive J., Oumarou C., Ten-Hage L. & Lacroix G. (2007). Control of phytoplankton-bacteria interactions by stoichiometric constraints. *Oikos* *116*, 1079–1086. <https://doi.org/10.1111/j.2007.0030-1299.15424.x>
- Delgado C., Almeida S.F.P., Elias C.L., Ferreira V. & Canhoto C. (2017). Response of biofilm growth to experimental warming in a temperate stream. *Ecohydrology*, *10*, 6, e1868. <https://doi.org/10.1002/eco.1868>
- Díaz-Villanueva V., Font J., Schwartz T. & Romaní A.M. (2011). Biofilm formation at warming temperature: acceleration of microbial colonization and microbial interactive effects. *Biofouling* *27*, 59–71. <https://doi.org/10.1080/08927014.2010.538841>
- Domingos C., Ferreira V., Canhoto C. & Swan C. (2015). Warming, and the presence of a dominant shredder, drive variation in decomposer communities in a mountain stream. *Aquatic Sciences* *77*, 129–140. <https://doi.org/10.1007/s00027-014-0378-z>
- Duarte S., Bärlocher F., Pascoal C. & Cássio F. (2016a). Biogeography of aquatic hyphomycetes: Current knowledge and future perspectives. *Fungal Ecology* *19*, 169–181. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.06.002>
- Duarte S., Cássio F., Ferreira V., Canhoto C. & Pascoal C. (2016b). Seasonal Variability May Affect Microbial Decomposers and Leaf

- Decomposition More Than Warming in Streams. *Microbial Ecology* 72, 263–276. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0780-2>
- Durance I. & Ormerod S.J. (2007). Climate change effects on upland stream macroinvertebrates over a 25-year period. *Global Change Biology* 13, 942–957. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2007.01340.x>
- Fenoy E., Casas J.J., Díaz-López M., Rubio J., Guil-Guerrero J.L. & Moyano-López F.J. (2016). Temperature and substrate chemistry as major drivers of interregional variability of leaf microbial decomposition and cellulolytic activity in headwater streams. *FEMS microbiology ecology* 92, 11.
- Fernandes I., Pascoal C., Guimarães H., Pinto R., Sousa I. & Cássio F. (2012). Higher temperature reduces the effects of litter quality on decomposition by aquatic fungi: Effects of temperature and litter quality on litter decomposition. *Freshwater Biology* 57, 2306–2317. <https://doi.org/10.1111/fwb.12004>
- Fernandes I., Seena S., Pascoal C. & Cássio F. (2014). Elevated temperature may intensify the positive effects of nutrients on microbial decomposition in streams. *Freshwater Biology* 59, 2390–2399
- Ferreira V. & Canhoto C. (2014). Effect of experimental and seasonal warming on litter decomposition in a temperate stream. *Aquatic Sciences* 76, 155–163. <https://doi.org/10.1007/s00027-013-0322-7>
- Ferreira V. & Canhoto C. (2015). Future increase in temperature may stimulate litter decomposition in temperate mountain streams: evidence from a stream manipulation experiment. *Freshwater Biology* 60, 881–892. <https://doi.org/10.1111/fwb.12539>
- Ferreira V. & Chauvet E. (2011a). Future increase in temperature more than decrease in litter quality can affect microbial litter decomposition in streams. *Oecologia* 167, 279–291. <https://doi.org/10.1007/s00442-011-1976-2>
- Ferreira V. & Chauvet E. (2011b). Synergistic effects of water temperature and dissolved nutrients on litter decomposition and associated fungi. *Global Change Biology* 17, 551–564. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02185.x>
- Ferreira V., Chauvet E. & Canhoto C. (2014). Effects of experimental warming, litter species, and presence of macroinvertebrates on litter decomposition and associated decomposers in a temperate mountain stream. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 72, 206–216. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2014-0119>
- Fierer N., Craine J.M., McLaughlan K. & Schimel J.P. (2005). Litter quality and the temperature sensitivity of decomposition. *Ecology* 86, 320–326
- Findlay S., Tank J., Dye S., Valett H.M., Mulholland P.J., McDowell W.H., et al. (2002). A cross-system comparison of bacterial and fungal biomass in detritus pools of headwater streams. *Microbial Ecology* 43, 55–66

- Follstad Shah J.J., Kominoski J.S., Ardón M., Dodds W.K., Gessner M.O., Griffiths N.A., et al. (2017). Global synthesis of the temperature sensitivity of leaf litter breakdown in streams and rivers. *Global Change Biology* 23, 3064–3075. <https://doi.org/10.1111/gcb.13609>
- Frainer A., Primicerio R., Kortsch S., Aune M., Dolgov A.V., Fossheim M., et al. (2017). Climate-driven changes in functional biogeography of Arctic marine fish communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, 12202–12207. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706080114>
- Friberg N., Dybkjaer J.B., Ólafsson J.S., Gíslason G.M., Larsen S.E. & Lauridsen T.L. (2009). Relationships between structure and function in streams contrasting in temperature. *Freshwater Biology* 54, 2051–2068. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2009.02234.x>
- Gessner M.O. (2005). Ergosterol as a measure of fungal biomass. In: *Methods to study litter decomposition*, Springer. pp. 189–195. Dordrecht.
- Gessner M.O. & Chauvet E. (1993). Ergosterol-to-biomass conversion factors for aquatic hyphomycetes. *Applied and environmental microbiology* 59, 502–507
- Gessner M.O. & Newell S.Y. (2002). Biomass, growth rate, and production of filamentous fungi in plant litter. *Manual of environmental microbiology* 2, 390–408
- Gonçalves A.L., Graça M.A. & Canhoto C. (2013). The effect of temperature on leaf decomposition and diversity of associated aquatic hyphomycetes depends on the substrate. *Fungal Ecology* 6, 546–553
- Gossiaux A., Jabiol J., Poupin P., Chauvet E. & Guérolde F. (2019). Seasonal variations overwhelm temperature effects on microbial processes in headwater streams: insights from a temperate thermal spring. *Aquatic Sciences* 81. <https://doi.org/10.1007/s00027-019-0627-2>
- Graça M.A.S., Ferreira R.C.F. & Coimbra C.N. (2001). Litter processing along a stream gradient: the role of invertebrates and decomposers. *Journal of the North American Benthological Society* 20, 408–420. <https://doi.org/10.2307/1468038>
- Guenet B., Danger M., Abbadie L. & Lacroix G. (2010). Priming effect: bridging the gap between terrestrial and aquatic ecology. *Ecology* 91, 2850–2861
- Hart S.K., Hibbs D.E. & Perakis S.S. (2013). Riparian litter inputs to streams in the central Oregon Coast Range. *Freshwater Science* 32, 343–358. <https://doi.org/10.1899/12-074.1>
- IPCC (2014). IPCC Summary for policymakers. In: *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Field, C.B., V.R. Barros, D.J. Dokken, K.J. Mach, M.D. Mastrandrea, T.E. Bilir, M. Chatterjee, K.L. Ebi, Y.O. Estrada, R.C. Genova, B. Girma, E.S. Kissel, A.N. Levy, S. MacCracken, P.R. Mastrandrea, and L.L. White

- (eds.]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1–32.
- Iqbal S.H. & Webster J. (1973). Aquatic hyphomycetes spora of the river exe and its tributaries. *Transactions of the British Mycological Society* 61, 331–346
- Kahlert M. & McKie B.G. (2014). Comparing new and conventional methods to estimate benthic algal biomass and composition in freshwaters. *Environmental Science: Processes & Impacts* 16, 2627–2634. <https://doi.org/10.1039/C4EM00326H>
- 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
- Langan S.J., Johnston L., Donaghy M.J., Youngson A.F., Hay D.W. & Soulsby C. (2001). Variation in river water temperatures in an upland stream over a 30-year period. *Science of the Total Environment* 265, 195–207
- Nikolcheva L.G. & Barlocher F. (2005). Seasonal and substrate preferences of fungi colonizing leaves in streams: traditional versus molecular evidence. *Environmental Microbiology* 7, 270–280. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00709.x>
- O’Gorman E.J., Benstead J.P., Cross W.F., Friberg N., Hood J.M., Johnson P.W., et al.** (2014). Climate change and geothermal ecosystems: natural laboratories, sentinel systems, and future refugia. *Global Change Biology* 20, 3291–3299. <https://doi.org/10.1111/gcb.12602>
- Olapade O.A. & Leff L.G. (2005). Seasonal Response of Stream Biofilm Communities to Dissolved Organic Matter and Nutrient Enrichments. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2278–2287. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2278-2287.2005>
- Pérez J., Martínez A., Descals E. & Pozo J. (2018). Responses of Aquatic Hyphomycetes to Temperature and Nutrient Availability: a Cross-transplantation Experiment. *Microbial Ecology* 76, 328–339
- Pilgrim J.M., Fang X. & Stefan H.G. (1998). Stream temperature correlations with air temperatures in Minnesota: implications for climate warming. *JAWRA Journal of the American Water Resources Association* 34, 1109–1121
- Pozo J. & Colino R. (1992). Decomposition processes of *Spartina maritima* in a salt marsh of the Basque Country. *Hydrobiologia* 231, 165–175
- Romaní A. (2010). Freshwater biofilms. In: *Biofouling*, 1st ed. (Eds S. Dürr & J. Thomason), pp. 137–153. Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex [England] ; Ames, Iowa.
- Stefan H.G. & Sinokrot B.A. (1993). Projected global climate change impact on water temperatures in five north central US streams. *Climatic Change* 24, 353–381
- Wallace J.B., Eggert S.L., Meyer J.L. & Webster J.R. (1997). Multiple trophic levels of a forest stream linked to terrestrial litter inputs. *Science* 277, 102–104
- Weitzel R.L. (1979). *Periphyton measurement and applications*.

In: Methods and measurements of periphyton communities: A Review, ASTM International. (Ed. R.L. Weitzel), pp. 3–33.

Woodward G., Dybkjaer J.B., Ólafsson J.S., Gíslason G.M., Hannesdóttir E.R. & Friberg N. (2010). **Sentinel systems on the razor's edge: effects of warming on Arctic geothermal stream ecosystems: Impacts of warming on Icelandic stream**

ecosystems. *Global Change Biology* 16, 1979–1991. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.02052.x>

Yvon-Durocher G., Hualtt C.J., Woodward G. & Trimmer M. (2017). Long-term warming amplifies shifts in the carbon cycle of experimental ponds. *Nature Climate Change* 7, 209

CHAPITRE 3

“Temperature and nutrient effects on the relative importance of brown and green pathways for stream ecosystem functioning: a mesocosms approach”

(Gossiaux et al., en révision pour *Freshwater Biology*)

Alice Gossiaux^{1*} | Marc Rollin¹ | François Guérold¹ | Vincent Felten¹ | Martin Laviale¹ |
Quentin Bachelet¹ | Pascal Poupin¹ | Eric Chauvet² | Alexandre Bec³ | Michael Danger¹

¹LIEC – Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, Université de Lorraine, UMR 7360, Avenue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

²Ecolab – Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement, Université de Toulouse, UPS, CNRS, INPT, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France

³Université Clermont Auvergne, CNRS UMR 6023, Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, Clermont-Ferrand, France

Abstract

1. In addition to global warming, aquatic ecosystems are currently facing multiple global changes among which changes in nitrogen (N) loads. While several studies have investigated both temperature and N impacts on aquatic ecosystems independently, knowledge on their interactive effects remain scarce.
2. In forested headwater streams, decomposition of leaf litter represents the main process ensuring the transfer of nutrients and energy to higher trophic levels, followed by autochthonous primary production, mainly ensured by phototrophic biofilms. The main aim of this study was to disentangle the respective and combined effects of temperature increase and nutrients availability on the relative importance of brown and green processes involved in streams functioning. We mainly hypothesized that water temperature and nutrients would lead to a general increase in leaf-litter decomposition and primary production, but that the intensity of these effects would be largely modulated by competitive interactions arising between microorganisms as well as by the top-down control of microorganisms by macro-invertebrates. Macro-invertebrates would, in turn, be bottom-up controlled by microbial resources quality.
3. To test these hypotheses, we conducted a 56 day experiment in artificial streams containing leaf litter, microbial decomposers and biofilm inoculum, and an assemblage of macro-invertebrates. Two water inorganic N:phosphorus (P) ratios (33 and 100, molar ratios) and two temperatures (ambient, +2 °C) were manipulated, each treatment being replicated three times. Fungal and biofilm growth as well as leaf litter decomposition and primary production were quantified. Top- down impacts of invertebrate primary consumers on brown and green compartments were evaluated using exclosures while bottom-up control was evaluated through the measurement of resources stoichiometry and fatty acid profiles, as well as quantification of macro-invertebrates growth and survival.
4. Contrary to expectations, microbial decomposition was not significantly fastened by tested parameters, while primary production was only improved under ambient temperature. In +2 °C, high N:P conditions, biofilm seemed to partly control fungal development. Temperature increased macro-invertebrates growth

and leaf litter consumption, but this effect was independent of any changes in basal resources potential quality, suggesting that temperature mediated changes **in consumers' metabolism and activity was the main mechanism involved.**

5. Most of our hypotheses that were based on simplified laboratory observations have been rejected in our semi-controlled mesocosms. Our study suggests that the complexity of biological communities might greatly affect the response of ecosystems to multiple stressors, and that interactions between organisms must be explicitly taken into account when investigating global changes impacts on ecosystem functioning.

*Keywords: decomposition – primary production – headwater streams – fatty acids
– top-down vs. bottom-up control*

Introduction

The functioning of forested headwater streams mostly relies on allochthonous organic matter inputs from the riparian zone (Wallace et al. 1997). Mainly composed by dead leaves, this organic material represents the major energy source at the basis of food webs (commonly qualified of brown food-webs), and its decomposition plays a non-negligible role in the global carbon (C) cycle (Benfield 2006). As they reach streams, leaves are rapidly colonized by aquatic fungi, which convert refractory leaf-litter to more bioavailable nutrients and energy that fuel aquatic food webs. Microbial activity initiates leaf-litter decomposition (Bärlocher 1985), and provides a digestible food resource for numerous detritivorous macro-invertebrates. Hence, both detritivores and microbes contribute significantly to the key process of decomposition in streams (Hieber and Gessner 2002). In addition to these detritus based processes, the forested riparian zone of headwater streams strongly reduces light availability and limits the development of aquatic autotroph organisms (Richardson and Danehy 2007). In such heavily shaded streams, surface-attached phototrophic biofilms ensure most of the in stream primary production (Weitzel 1979). While reduced, this autochthonous production (green pathway) of high quality organic matter can be extremely important for stream functioning, impacting, for example, leaf litter decomposition (Danger et al. 2013; Halvorson et al. 2018; Kuehn et al. 2014) and representing a potentially important input of essential compounds to higher trophic levels (e.g. essential fatty acids; Crenier et al. 2017; Guo et al. 2016). Despite the growing interest in the potential importance of the green pathways in the functioning of detritus-based headwater streams, most studies dealing with streams functioning have omitted this autotrophic compartment. Yet, interactions between the green and the brown food webs might significantly complicate our view of stream functioning and stream responses to anthropogenic stressors in particular.

Over the last decade (2006-2015), anthropogenic global warming induced a 0.87 °C increase in mean global surface temperature above pre-industrial levels. As it is currently increasing at 0.2 °C per decade, the recent IPCC report (2018) anticipates that the warming is likely to reach 1.5 °C between 2030 and 2052 if it keeps increasing at the current rate. In this context of global warming, aquatic ecosystems are affected by similar trends in increasing temperatures (Langan et al. 2001). In addition to global

warming, ecosystems are facing multiple other global changes, and in particular, changes in nitrogen (N) loads. Since the early 20th century, anthropogenic activities strongly modified N biogeochemical cycle of terrestrial and aquatic ecosystems, adding ever-increasing nitrogen inputs (Galloway et al. 2008). Combustion of fossil energy, fertilization of agricultural soils, animal breeding and domestic waste induced the emission of reactive nitrogen into the atmosphere. Atmospheric emissions are transported over long distances by air masses and deposited on both terrestrial and aquatic ecosystems, regardless of the proximity to the emission source (Elser 2011). In particular, forested headwater streams, which are often ecosystems located apart from human activities (including agriculture), suffered from large increases in dissolved N concentrations (Elwood and Mulholland 1989) that might have changed the intensity or the nature of nutrient limitations, as already observed in lakes (shift from N to phosphorus (P) limitation, Elser et al. 2009). Current efforts to limit atmospheric deposition are likely to induce further changes on these ecosystems, impacted streams being expected to face future conditions of decreasing N inputs (Gilliam et al. 2019).

In the last decade, an increasing number of studies investigated the effects of temperature and nutrients on freshwater ecosystems, but disentangling their respective and combined effects remains a challenge (Cross et al. 2015). On the one hand, temperature controls biological processes through its effect on metabolic rate (Woodward et al. 2010) and is responsible for species distribution and phenology (Odum 1949). On the other hand, nutrients are resources required for growth, maintenance, and reproduction of all organisms (Reiners 1986), and, in turn, consumers are essential for nutrient cycling and play a major role in energy pathways (Wetzel 1995). One of the difficulties of studying the interactive effects of temperature and nutrients on aquatic ecosystems is to incorporate interactions between species within the system studied, because these interactions can strongly influence the response of both species and ecological processes to environmental changes (Gilman et al. 2010). Another part of this challenge relies on the difficulty to control both temperature and nutrient concentration while studying complex ecosystems. Differences between study scales and ecosystem complexity certainly explain the large variability observed between experiments. For example, Ferreira and Chauvet (2011b) observed that simultaneous increase in water temperature and dissolved nutrients under simplified laboratory conditions enhanced alder leaf-litter decomposition, as

well as fungal growth and reproduction, while inducing changes in fungal community structure. Furthermore, Moghadam and Zimmer (2016) found that the presence of shredders exacerbates the synergistic effects of temperature and nutrients on litter decomposition. However, in a transplantation experiment, Pérez et al. (2018) reported an increase in microbial decomposition rate when leaf-litter bags were transferred from colder and N-poorer to warmer and N-richer streams, though their results pointed to a higher efficiency of microbial decomposers under colder conditions. At last, the field studies from Hood et al. (2018) and Myrstener et al. (2018) aiming to predict the effects of climate change on aquatic primary production came to similar conclusions about the overriding importance of nutrient balance response to other climate-related factors, including increased temperature. Given the complexity and variability of the biological responses to the projected global changes in temperature and nutrient concentrations, experiments in realistic and semi-realistic systems (e.g. mesocosms, manipulative experimentations, field studies) with natural communities are necessary in order to successfully predict responses of species and ecosystem functioning to global change (Pérez et al. 2018).

The main objective of this study was to disentangle the individual and combined effects of temperature increase and nutrient availability on the relative importance of brown and green processes involved in streams functioning. Brown and green processes were evaluated through the measurement of the leaf litter decomposition process and phototrophic biofilm production, respectively, and consequences at higher trophic **levels were evaluated through the investigation of invertebrates' life history traits and** activity. We conducted a two-months experiment in artificial channels, and monitored the effects of an increase in water temperature (ambient and + 2 °C) combined with two levels of nutrient inputs (molar N:P ratios of 33 and 100) on *i*) resources (leaf litter and biofilm) quality (C:N:P ratios, Poly Unsaturated Fatty Acids (PUFA) contents) and quantity and *ii*) on the growth, activity (fungal conidia production, invertebrate resources consumption), and survival of consumers (micro-organisms and macro-invertebrates). We hypothesized that increased water temperature and higher N:P level would lead to a stimulation of microbial growth and activity (higher fungal biomass and leaf litter decomposition, Ferreira and Chauvet 2011b; higher biofilm biomass and primary production, Díaz-Villanueva et al. 2011). We also expected temperature × water N:P interactions: temperature-stimulated microbial growth

should sharpen competition between microbial decomposers and biofilm primary producers in the lowest N:P conditions (Daufresne and Loreau 2001; Danger et al. 2013b), hence altering microbial leaf litter decomposition and primary production. When considering invertebrate consumers, temperature stimulated metabolism and activity (Hogg and Williams 1996) should increase resources consumption by invertebrates (higher top-down impact), leading to increased leaf-litter mass loss (Ferreira et al. 2014) and stronger top-down control of biofilm biomass. In addition, lower temperature and higher nutrient availability should individually lead to biofilms richer in essential PUFAs, furnishing a potentially higher quality resource for invertebrates that could further increase macro-invertebrates growth (Crenier et al. 2017; Guo et al. 2016).

Material and methods

Experimental setting

Experiments were conducted outdoor during 56 days between October and December 2016 in 12 artificial channels situated on a platform covered by a partially transparent roof. Therefore, the channels were exposed to natural variations in both light and temperature. Before filling each channel with 100 L of water, each channel bed was covered with 3 cm of sand and gravels, which were abundantly rinsed with deionized water beforehand. Each channel functioned in closed circuit, and was composed of three main sections (see Fig. 3.1): **an “upstream” section (110 cm long), where the water supply is ensured, which was separated from a “downstream” section (75 cm long) by a fine mesh panel (0.25 mm mesh).** The upstream section received macro-invertebrates, while the downstream section was exempted of such organisms, permitting to determine the top-down impact of consumers on phototrophic biofilm. Finally, the overflow of water was collected in 20 L drip trays where a submerged pump (Universal 2400, Eheim GmbH & Co. KG, Germany) was re-injecting the water in the **“upstream” section.**

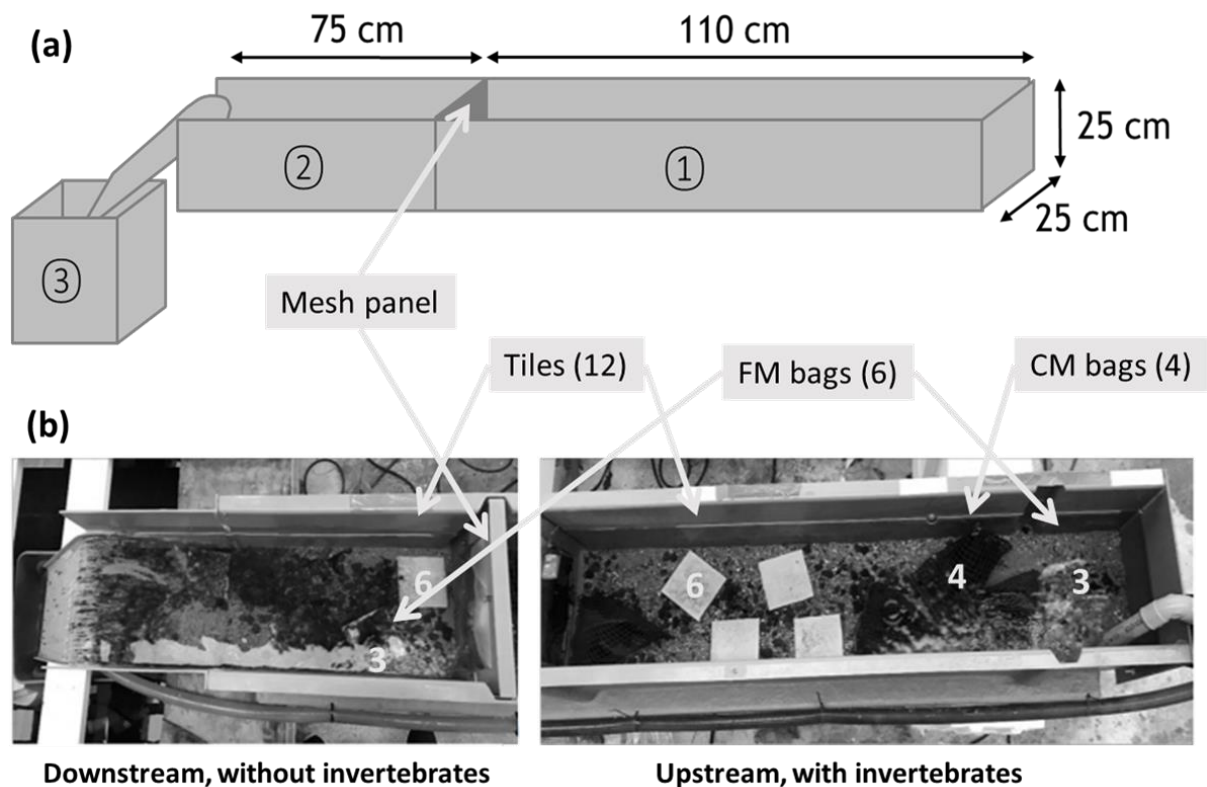


Figure 3.1 (a) Schematic representation and dimensions of an artificial stream used for this experiment. The upstream section (1) receives water from the pump immersed in the drip tray (3). A 250µm mesh separate the upstream (1) and the downstream (2) sections to avoid invertebrates drift and keep the downstream section free of invertebrates. Comparison of the upstream (1) and the downstream (2) sections thus permit to evaluate top-down effects of macro-invertebrates on biofilms. (b) Picture of the two successive sections of an artificial stream: an upstream section with invertebrates separated by a 250µm nylon mesh from a downstream section without invertebrates.

The water collected in six over the 12 drip trays situated downstream each canal was heated in a bain-marie with water heaters (Profi Heater 1kW, Xclear VGE International, Netherlands) in order to achieve a mean difference of 2 °C (heated channels) with the six other channels (ambient channels), while following natural diurnal and seasonal temperature variations (see Fig. S3.1). Moreover, supplementary water heaters and external insulation of the channels with expanded polystyrene panels prevented the water of all channels to freeze when air temperature dropped below 0 °C. Ambient and heated channels received weekly nutrients supplies, in order to attain two different N:P ratios: 33 and 100 (hereafter low and high N:P ratio treatments). Our experiment followed a full factorial design, leading to four different treatments, each treatment being replicated three times: ambient temperature and high nitrogen load (AH); ambient temperature and low nitrogen load (AL); elevated

temperature and high nitrogen load (HH); elevated temperature and low nitrogen load (HL).

Physical and Chemical Water Characterization

To fill the channels, we used a mix of water sampled in a reference stream (La Maix, Vosges, France: 40%) and a commercial spring water (Laqueuille bottled spring water, Aquamark: 60%), to control water quality. This commercial water was selected to meet several technical and chemical criteria, such as its relatively low conductivity and neutral pH, and the stability of its chemical composition. Spring water analyses revealed a nitrate (NO_3^-) concentration of 0.5 mg L^{-1} , a pH of 7.7 and a PO_4^{3-} concentration of 0.229 mg L^{-1} . Water samples (50 mL) from each channel were collected each week and the concentrations of NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} , Cl^- and SO_4^{2-} were immediately determined by ion chromatography (Dionex 1500i; Sunnyvale, USA). Each week, during 7 weeks, nitrogen and phosphorus supplies were adapted to current ion concentrations of each channel, just after measuring ion concentrations to attain a N:P molar ratio of 33 or 100 (see Table S3.1), depending on the subset of channels (named low and high N:P treatments hereafter). Nitrogen was added as potassium nitrate (KNO_3), and phosphorus as potassium phosphate (KH_2PO_4). Due to the high initial PO_4^{3-} concentrations in commercial water, reaching the targeted N:P molar ratios of 100 and 33 required to add only KNO_3 at the beginning of the experiment, without any P addition. Concentrations of PO_4^{3-} dropped dramatically after one week (see Fig. S3.2), while NO_3^- levels decreased slowly during the 56 days experiment. To avoid excess of nutrients in our closed mesocosms, we chose to let the total amount of N and P naturally decline instead of maintaining the same amount of dissolved N and P throughout the experiment. Thus, during the whole experiment, KH_2PO_4 and KNO_3 were weekly added to the mesocosms to maintain the targeted 100 and 33 N:P ratios while letting N and P amounts declining in the stream water (all data available in Table S3.1). After 7 weeks of experiment, water samples (500 mL) were collected in each channel for stream pH (pH 3000, WTW), acid-neutralizing capacity (ANC), and water conductivity measurements (Metrohm Herisau Conductometer E518; Herisau, Switzerland) at $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Water temperature was recorded every 15 min in each channel, with submersed data loggers (Hobo Pendant UA-001-08, Onset Computer Corp., Massachusetts, USA).

Microbial inoculation in artificial streams

On the first day of the experiment, microbial inoculates were introduced into the channels (natural bacterial, conidial and biofilm suspensions from the reference stream). More precisely, about 100 dead leaves [mainly hazel (*Corylus avellana* L.), alder (*Alnus glutinosa* L.) and beech (*Fagus sylvatica* L.) leaves] from the La Maix reference stream were collected, brought back to the laboratory and placed in 40 L of aerated stream water. After 24h, 0.5 L of this water was added to each mesocosm in order to add fungal spores and bacteria to the mesocosms. On the same date, natural biofilm was collected on five rocks (approximately 100 cm² of surface area each) from the reference stream using a tooth brush. Biofilm was gently rinsed with stream water, collected in a 1 L glass bottle, and brought back to the laboratory. A volume of 50 mL of this biofilm suspension was added to each mesocosm to permit the initial colonization of the mesocosms by biofilm species. Volumes of inoculates were chosen to represent small amounts (less than 1%) of microbial biomass compared to expected final biomass, to let the experimental treatments shape microbial communities.

Leaf conditioning and mass loss

Leaf litter of hazel, a common riparian tree species in Europe, was collected just after abscission in October 2015, air-dried and stored in the dark at ambient temperature. Pre-weighted portions of leaf litter were spray moistened and introduced in coarse (10-mm mesh size; CM) and fine (1-mm mesh size; FM) mesh bags (3.0 and 1.5 ± 0.05 g dry mass in CM and FM bags, respectively). Before being placed in mesocosms, leaf bags were quickly incubated in the reference stream (La Maix, Vosges) to ensure leeching and inoculation by natural microbial decomposer assemblages. After 3 days, the leaf bags were retrieved from the stream, gently rinsed in stream water to remove invertebrates, and transported to the laboratory in a cooler with stream water and kept at 4°C for one day. Four CM bags and three FM bags were placed in each upstream section of the channels, and three other FM bags were placed in the downstream section. The leaves from four supplementary bags of each mesh type (CM and FM) were also rinsed with distilled water, oven-dried (60 °C, 72h) and weighed to **determine “initial” dry mass (DM). These leaves were then grinded, and a portion (0.25 ± 0.05 g) of the powder obtained was ignited in a muffle furnace at 550 °C for 4 h to determine the initial ash-free dry mass (AFDM).** To analyze the leaf litter

decomposition dynamic, the FM bags in channels were retrieved by pairs (one from the upstream section, one from the downstream section) after 21, 35 and 52 days. In contrast, to avoid a loss of macro-invertebrates enclosed in CM bags during intermediate sampling, the CM bags were only retrieved on a single date, after 56 days. As for initial mass determination, leaves were first oven-dried (60 °C, 72h), weighed to determine DM and grinded. A portion (0.25 ± 0.05 g) of the leaves powder was ignited (550 °C, 4h) to determine AFDM. Decomposition rates of hazel tree leaves in FM and CM bags (k) were calculated assuming an exponential decomposition rate, by linear regression of the Ln transformed negative exponential model $M_t = M_0 \times e^{-kt}$ (Pozo and Colino 1992).

Fungal biomass and diversity

At each sampling date, six disks were cut with a cork-borer from the rinsed leaves of the two FM bags collected per channel (three disks coming from the FM bag collected upstream, and three disks from the FM bag collected downstream, each disk coming from different leaves chosen randomly in the bags). The six disks were placed in 100-mL Erlenmeyer flasks filled with 20 mL of filtered stream water (Glass microfibre GF/F, Whatman; nominal cut off 0.7 μm) and then incubated at 12°C (a temperature close to channel water temperature on the first sampling date) in the dark for 48 h on an orbital shaker (100 rpm) to determine sporulation rates and species composition of leaf-associated fungal assemblages. After incubation, the disks were removed and the remaining water containing conidial suspensions were poured into a 50-mL Falcon tubes, and fixed with 2 mL of 37 % formalin. The suspensions were mixed with magnetic stirring bars to ensure uniform distribution of conidia, and an aliquot (1-12 mL) was filtered through membrane filters (25 mm diameter, pore size 5 μm ; Millipore SMWP, Millipore Corporation, MA, USA). Filters were stained with 0.1 % Trypan blue in 60 % lactic acid (Iqbal and Webster 1973), and conidia were identified and counted under a microscope at $\times 200$ magnification (Graça et al. 2005). Conidial production was expressed as the number of conidia released per mg leaf AFDM per day. In the meantime, 10 other disks were cut from the leaves of the pairs FM bags (five from each) per channel and frozen at -20 °C for future ergosterol content measurement according to Gessner and Newell (2002). Ergosterol was quantified by HPLC on the disks (Graça et al. 2005), and then converted into fungal biomass using

a conversion factor of 5.5 μg ergosterol mg^{-1} fungal dry mass (Gessner and Chauvet 1993).

Biofilm production

Twelve ceramic tiles (individual upper surface area of 95 cm^2) were placed on the channel beds (six in the upstream section, i.e. with macro-invertebrates, six in the downstream section, i.e. without invertebrates). After 21, 35 and 52 days, two tiles were randomly retrieve from each channel section and gently scraped with a smooth brush. Suspensions of biofilm were poured in tubes and the volume was adjusted to 100 mL with distilled water. Two subsamples of 5 mL were filtered through GF/F membrane filters (25 mm diameter, pore size 0.7 μm ; Whatman, GE Healthcare, USA) and stored at -80 °C until further analysis of pigments. The remaining suspension was freeze-dried, ground and weighed to the nearest 0.01 g. A portion of the powder (0.15 ± 0.05 g) was ignited in a muffle furnace at 550 °C for 4 h to determine ash-free dry mass (AFDM). For pigment extraction, samples were thawed in 90% acetone, sonicated and then left overnight in the dark at 4 °C. After extraction, each acetonic extract was centrifuged (10,000g, 15 min), and the absorbance of the supernatant was measured spectrophotometrically at 664 and 750 nm before and after addition of 10% HCl. Chlorophyll *a* (Chl-*a*) and pheophytin *a* (Pheo-*a*) concentrations were determined for each extract using the equations of Lorenzen (1967) and were expressed in μg pigment per unit of substrate colonized area ($\mu\text{g cm}^{-2}$). In addition to the pigment values available on each date, primary production of biofilms (in day^{-1}) were calculated based upon the temporal dynamic of pigment increase in absence of grazers (in the downstream section), assuming a linear production of pigments in time (linear regressions).

Stoichiometric and biochemical quality of leaves and biofilm

Subsamples of leaf litter and biofilm powders were used to determine their carbon (C), nitrogen (N) and phosphorus (P) contents on the first and the last date of the experiment (i.e. 52 days for leaf litter collected in FM bags and biofilm). The initial CNP content of leaf litter was measured from the bags used to measure initial leaf mass loss. Subsamples were weighed to the nearest 0.001 mg (Perkin Elmer AD6 Autobalance). C and N contents in each resources were quantified using a CHN

elemental analyzer (Carlo Erba NA2100, Thermo Quest CE International, Milan, Italy). Phosphorus content was quantified after sodium persulfate digestion and spectrophotometry. Leaves and biofilm C:N, N:P, and C:P were expressed as molar ratios.

Fatty acids analyses were performed on biofilm collected in each channel at the end of the experiment, using the protocol described in Crenier et al. (2017). Briefly, lipids were extracted two times using a chloroform/methanol solution (Folch et al. 1957). Once extracted, fatty acids were converted into fatty acid methyl-esters (FAME) by acid-catalysed transesterification and analyzed on an Agilent technologies™ 6850 gas chromatograph. FAME were identified by comparing retention times with those obtained from Supelco and laboratory standards, and were quantified against internal standards (13:0).

Macro-invertebrates introduction in the channels, survival, and growth

To obtain a functionally diverse macro-invertebrate assemblage, four common species of macro-invertebrates from the Vosges mountains streams were introduced in the channels: two species feeding mainly on detritus *Sericostoma personatum* and *Odontocerum albicorne*, one generalist species, *Gammarus fossarum*, and one grazer species feeding mainly on biofilms, *Epeorus sylvicola*. All macro-invertebrates were collected in four reference headwater streams located in the Vosges Mountains (La Maix, Le Marteau, La Plaine, and Le Tihet). Macro-invertebrates were quickly transported to the laboratory in a cooler with aerated stream water, and maintained at 4 °C until sorting. Depending on the species, sorting was made directly in the field (for Trichoptera and Ephemeroptera), or in the laboratory (Gammarids). Indeed, gammarids were sorted by size (three size classes: (A) 4.4 ± 0.7 mm, (B) 5.8 ± 0.8 mm, and (C) 8.4 ± 0.6 mm), in order to obtain a size-distribution representative of natural populations and for accurate estimations of gammarids growth. To limit manipulation of Ephemeropteran and Trichopteran invertebrates, and since it was not possible to precisely evaluate individual or population growth of these taxa during the two months experiment, we chose not to measure initial size of these taxa. However, for Trichoptera and Ephemeroptera, we initially produced 12 batches of invertebrates (one per channel) with roughly similar size distributions for each species, each batch being randomly introduced in one channel. Before introduction into the channels, macro-

invertebrates were slowly (4-6 hrs) acclimated to the mixed water by gently mixing artificial stream water to stream water containing the invertebrates. To remain close to what is generally observed in La Maix stream (Felten 2003), a total number of 25 Ephemeroptera, 10 Trichoptera (five of each species), and 259 gammarids (60% of A, 30% of B and 10% of C) were introduced in each channel.

Data analysis

Temperature differences between channels were evaluated using a general linear model (GLM). We also used GLMs to assess the effects of temperature, water N:P ratio, and the temperature \times water N:P ratio interactions on several response variables: (i) exponential decomposition rates; (ii) log-transformed total sporulation rates; (iii) fungal biomass, (iv) C:N, C:P and N:P ratios of FM bags leaf litter; (v) biofilm biomass; (vi) log-transformed biofilm pigments concentrations; (vii) biofilm C:N, C:P and N:P ratios, (viii) biofilm fatty acids contents, (ix) primary production, (x) ratio of FM decomposition rate to primary **production, and (xi) gammarids' body length.** Prior to those analyses and to avoid complicated three- and four-ways interactions, we investigated the temporal effect on (ii), (iii), (v), and (vi), and we further evaluated the effect of the position in the channel (upstream and downstream; presence and absence of macro-invertebrates, respectively) on biofilm related response variables [i.e., (v), (vi), and (vii)]. If the effect of time and/or position in the channel was significant, the effects of temperature, water N:P ratio, and the temperature \times water N:P ratio interactions were evaluated on response variables [i.e., (ii), (iii), (v), and (vi)] split by time, position or both. For all GLMs, the significance of predictor variables was evaluated using a Type II or Type III Anova (car-package) depending on the presence of significant interactions in the model. We graphically assessed model validation and further evaluated the normality of model residuals using Shapiro tests. Top-down impacts of macro-invertebrates on leaf litter decomposition and algal biomass in biofilm was investigated through the calculation of Ln-transformed ratios of decomposition in CM (accessible to detritivores) to decomposition in FM (inaccessible to detritivores) litter bags and of Ln algal biomass (pigments) measured upstream (section with grazers) to those measured downstream (section without grazers). Effects of temperature and water N:P ratio were considered as significant when confidence intervals at 95% did not overlap with zero. Finally, to assess the multivariate response

of weekly ions concentrations to the four different treatments (i.e., two temperature and two nutrients related treatments), we used a PERMANOVA based on the Bray-Curtis dissimilarity index, and 999 permutations. Similar tests were performed to analyze the effects of temperature, water N:P ratio, and the temperature \times water N:P ratio interactions on species-specific sporulation rates. All statistical analyses were performed with the R software (R Core Team 2017, version 3.4.2.).

Results

Physico-chemical conditions in the mesocosms

The mean temperature difference between ambient and heated channels was 1.9 °C and remained quite constant over the 56 days of the experiment (Table 3.1, Fig. S3.1). On average, the temperature of ambient channels (\pm SD) was 9.2 ± 4.0 °C and the temperature of heated channels was 11.1 ± 3.5 °C. Temperatures significantly differed between ambient and heated channels (ANOVA, $p < 0.0001$, Tukey HSD).

Table 3.1 Main physical and chemical water parameters measured in the four treatment channels during the 56 days of experiment (n=2688 for temperature; n=8 for other parameters).

	Temperature (°C)			pH	Conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	NH_4^+ (mg L^{-1})	NO_3^- (mg L^{-1})	PO_4^{3-} (mg L^{-1})
	Mean \pm SD	Min	Max					
AMBIENT HIGH	9.20 ± 4.01^a	1.33	19.09	8.08 ± 0.01	223 ± 9	0.006 ± 0.007	4.80 ± 2.21^a	0.028 ± 0.057
AMBIENT LOW	9.18 ± 4.05^a	1.22	19.28	8.10 ± 0.02	217 ± 5	0.006 ± 0.008	0.93 ± 0.61^b	0.028 ± 0.058
HEATED HIGH	11.08 ± 3.47^b	4.42	19.38	8.12 ± 0.01	217 ± 12	0.008 ± 0.008	4.58 ± 2.23^a	0.029 ± 0.059
HEATED LOW	11.12 ± 3.49^b	4.42	19.47	8.09 ± 0.06	217 ± 9	0.007 ± 0.007	0.80 ± 0.61^b	0.027 ± 0.056

Treatments with the same letter are not significantly different (Tukey HSD test, $p > 0.05$).

With respect to nutrient water concentrations, NH_4^+ and PO_4^{3-} concentrations measured each week before adjustments were similar between channels (0.007 ± 0.007 mg NH_4^+ L $^{-1}$ and 0.029 ± 0.057 mg PO_4^{3-} L $^{-1}$ in average, respectively). However, NO_3^- concentrations significantly differed between high N:P ratio channels (4.69 ± 2.20 mg NO_3^- L $^{-1}$) and low N:P ratio channels (0.87 ± 0.61 mg NO_3^- L $^{-1}$; PERMANOVA, dissolved N:P ratio: $p = 0.001$; Temperature: $p > 0.05$; Table 3.1, Fig. S3.2). All other parameters were unaffected by the temperature and dissolved N:P ratio treatments

throughout the experiment: water was slightly alkaline ($\text{pH}=8.10 \pm 0.03$), conductivity reached $218 \pm 7.9 \mu\text{S cm}^{-1}$, and ANC (Acid Neutralizing Capacity) was $1.9 \pm 0.1 \text{ meq L}^{-1}$.

Effects of temperature and water N:P ratio on aquatic fungi

Fungal biomass, as evaluated by ergosterol quantification in leaf litter (Fig. 3.2a), was significantly affected by the interaction of time, dissolved N:P ratio, and temperature (ANOVA, $p = 0.02$). To better understand this complex interaction, fungal biomass was then analyzed date by date, showing a temperature \times dissolved N:P ratio interaction ($p = 0.03$) after 21d (lower fungal biomass in the high N:P, heated streams), and only a temperature effect ($p = 0.01$) after 52d, fungal biomass being significantly higher in the ambient temperature treatment.

Mean total sporulation rates of aquatic hyphomycetes associated with hazel leaves were the highest after 21 days ($128\text{-}309 \text{ conidia mg}^{-1} \text{ AFDM d}^{-1}$), then decreased from 35 ($58\text{-}97 \text{ conidia mg}^{-1} \text{ AFDM d}^{-1}$) to 52 days ($29\text{-}68 \text{ conidia mg}^{-1} \text{ AFDM d}^{-1}$) in all treatments (Fig. 3.1b). Since statistical analyses revealed a significant influence of time (ANOVA; $p = 0.04$, other $p > 0.05$), further analyses were performed independently on sporulation rates measured at each sampling time and revealed a positive influence of temperature on sporulation rates measured after 52d (ANOVA, Temperature, $p = 0.04$).

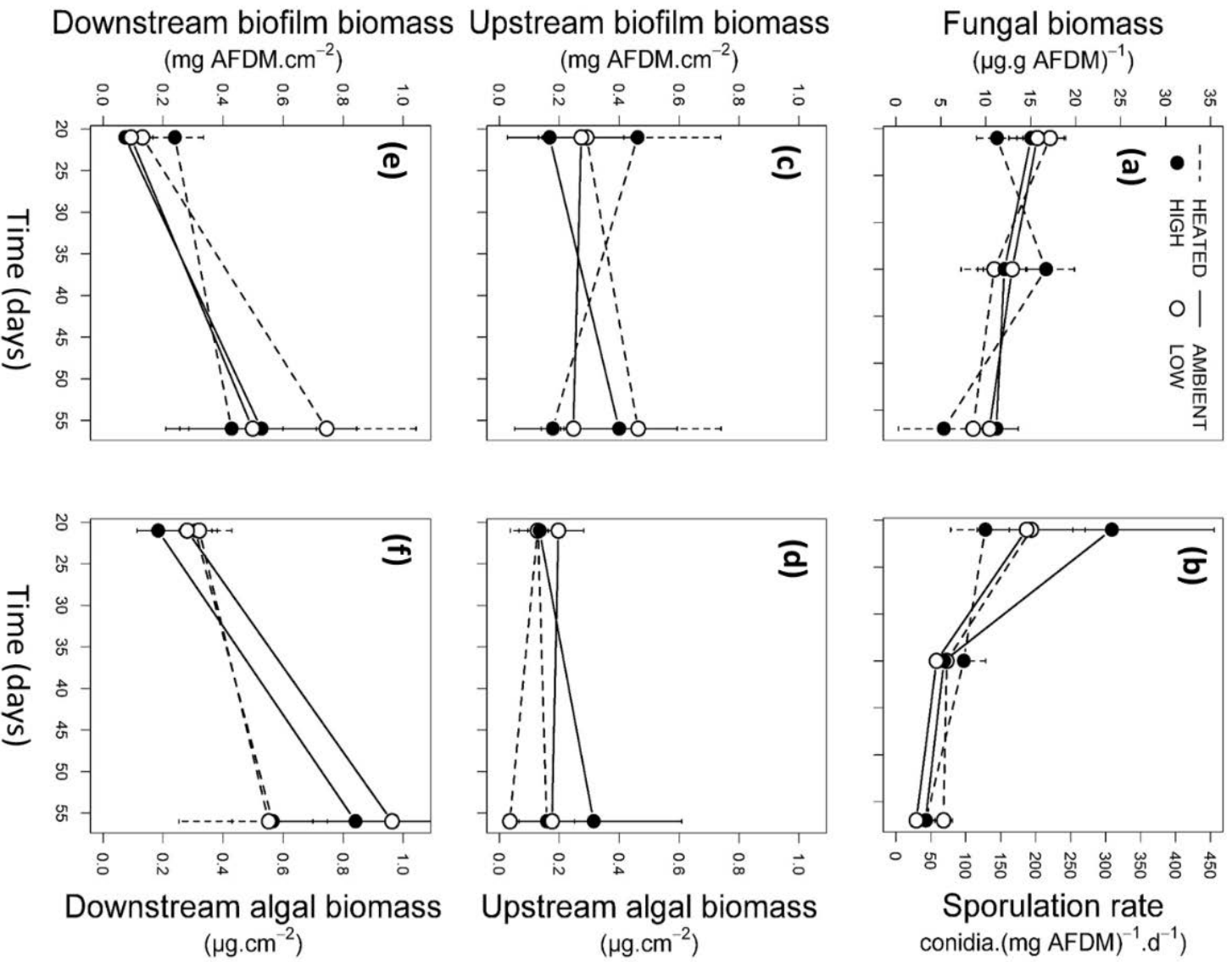


Figure 3.2 Effects of temperature and water N:P ratios on the temporal dynamics of microbial development and activity: Fungal biomass, measured as ergosterol content per unit of leaf litter biomass (a) and sporulation rates (b) changes through time measured on leaf litter enclosed in fine mesh bags: Changes in upstream (with grazers, panels c-d) and downstream (i.e. grazers excluded, panels e-f) biofilm biomass (in mg AFDM cm^{-2} , panels c and e) and algal abundance (in $\mu\text{g chl a cm}^{-2}$, panels d and f) through time. Error bars (n=3) correspond to SD except on the panel b (SE)

Species richness of aquatic hyphomycete communities was similar between treatments, and reached a total of 16 species. Consortia of aquatic hyphomycetes observed in all channels were mainly represented by four species (*Flagellospora curvula*, *Tetracheatum elegans*, *Clavariopsis aquatica* and *Lunulospora curvula*), while the other species (*Anguillospora crassa*, *Articulospora tetracladia*, *Alatospora aquatica*, *Alatospora pulchella*, *Tricladium chaetocladium*, *Tetracheatum marchalianum*, *Tripospermum myrti*, *Anguillospora longissima*, *Heliscella stellata*, *Tricladium monosporum*, *Heliscus lugdunensis*, other sigmoids) did not exceed 5% of the relative abundance (Fig. 3.3a). *Flagellospora curvula* was dominant in almost all channels (relative abundance: $53 \pm 15\%$ and $64 \pm 17\%$ after 21 and 35 days respectively), and no significant differences between treatments were observed at these two sampling times (PERMANOVA). However, after 52 days, aquatic hyphomycete consortia were significantly different between ambient and heated channels (PERMANOVA, Temperature: $p = 0.004$). At this date, although *Flagellospora curvula* remained dominant in heated channels, the dominant species in ambient channels was *Lunulospora curvula* (relative abundance: $27 \pm 12\%$ and $57 \pm 13\%$ in heated and ambient channels, respectively; Fig. 3.3a). This observation was supported by NMDS ordination diagram of fungal communities based on conidial production after 52 days of incubation (Fig. 3.3b).

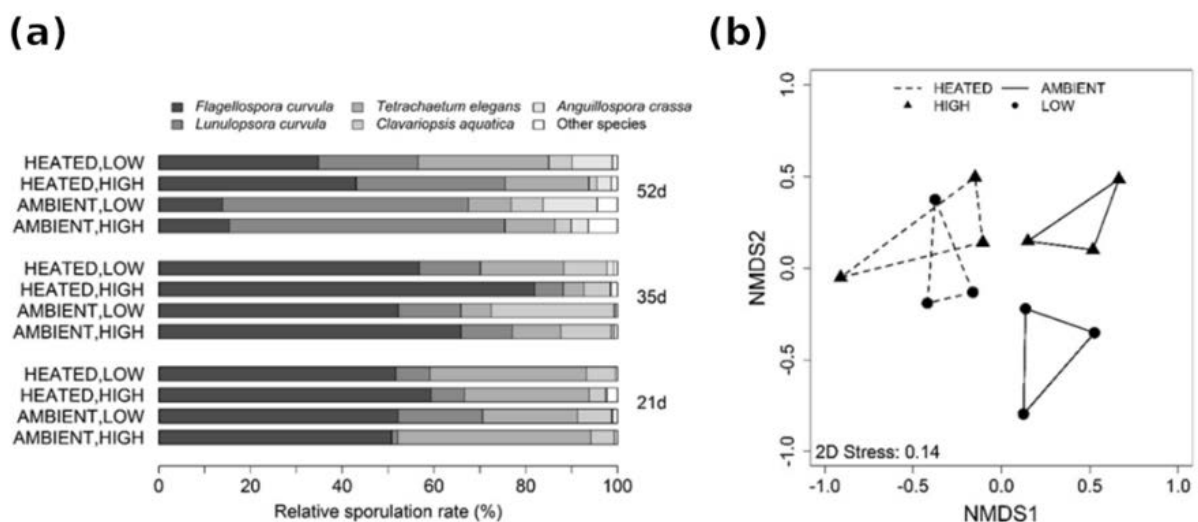


Figure 3.3 Percentage contribution of the main aquatic hyphomycete species to total conidial production (a) in the four treatments channels for each sampling date (21, 35, and 52 days) and NMDS ordination diagram based on fungal communities assessed from conidia released from hazel leaf disks after 52 days of incubation (b)

Effects of temperature and water N:P ratio on biofilm abundance

Biofilm biomass (measured in mg of AFDM per surface unit) was significantly affected by the sampling time (21 and 56 days; ANOVA, Time, $p < 0.001$) and the position in the stream channel (upstream vs downstream; ANOVA, Position, $p = 0.002$; Fig. 3.2c and 3.2e). Thus, the effects of temperature and dissolved N:P ratio were analyzed separately on sub-groups of biomass data (e.g. 21d-upstream, 21d-**downstream...**). **For all sub-groups**, results showed no significant effect of the interaction between temperature and dissolved N:P ratio on biofilm biomass (ANOVA, Temperature \times dissolved N:P ratio, all $p > 0.05$). Furthermore, no individual effects of temperature and dissolved N:P ratio were found on biofilm biomass grown upstream (in presence of invertebrates, Fig. 3.2c). However, concerning biofilm growing downstream (in absence of invertebrates), biomass was positively related to temperature in the high N:P treatment after 21 days (0.23 ± 0.43 in heated, low N:P channels and 0.10 ± 0.03 mg AFDM cm⁻² on average in the three other treatments, interaction Temperature \times dissolved N:P ratio, $p = 0.04$; Fig. 3.2e).

Total photo-pigments (chlorophyll-*a* and pheophytin) concentrations in biofilm (Fig. 3.2d and 3.2f) were significantly lower in the upstream section (0.17 ± 0.14 $\mu\text{g cm}^{-2}$) than in the downstream section of the channels (0.62 ± 0.58 $\mu\text{g cm}^{-2}$; ANOVA, Position effect, $p < 0.0001$). No significant differences were found between the two sampling times (21 and 56 days; ANOVA, Time, $p > 0.05$). Thus, the effect of temperature and nutrient supply was analyzed separately on two sub-groups of pigments data (i.e. upstream and downstream), without considering time effect. For both sub-groups, the temperature \times dissolved N:P ratio interaction was not significant (ANOVA, $p > 0.05$). Due to the high variability, no significant effect of temperature and dissolved N:P ratio were evidenced in the downstream section (Fig. 3.2f). In contrast, upstream total pigments concentrations were shown as significantly and independently influenced by the temperature and the dissolved N:P ratio (Fig. 3.2d). Warmer temperature was associated with lower total pigments concentrations (0.12 ± 0.05 and 0.22 ± 0.12 $\mu\text{g cm}^{-2}$ in heated and ambient channels, respectively; ANOVA, Temperature, $p < 0.001$; Fig. 3.2d). By contrast, higher N:P ratios in water was positively related to pigment concentrations (0.20 ± 0.05 and 0.13 ± 0.07 $\mu\text{g cm}^{-2}$ in

high N:P and low N:P ratio channels, respectively; ANOVA, dissolved N:P ratio, $p = 0.03$; Fig. 3.2d).

Effects of temperature and water N:P ratio on leaf litter decomposition and primary production

Microbial decomposition rates, evaluated from the mass loss of leaf litter enclosed in FM bags, ranged from $0.006 \pm 0.001 \text{ d}^{-1}$ in HL channels to $0.007 \pm 0.001 \text{ d}^{-1}$ in HH channels (Fig. 3.4a). Decomposition rates measured in FM bags were not significantly affected neither by temperature nor by nutrients, and did not differ significantly between treatments (ANOVA, all $p > 0.05$). FM decomposition rates were significantly lower than mean overall decomposition rates (including both microbial and macro-invertebrates activities) measured in CM bags (ANOVA, Mesh size effect, $p < 0.0001$), mean overall decomposition rates ranging from $0.014 \pm 0.002 \text{ d}^{-1}$ in AL channels to $0.020 \pm 0.002 \text{ d}^{-1}$ in HL channels after 56 days of incubation (Fig. 3.4b). Decomposition rates measured in CM bags were not significantly influenced by the interaction between temperature and dissolved N:P ratios nor by the different N:P ratios alone (ANOVA, Temperature \times N:P ratio and N:P ratio alone, $p > 0.05$). However, overall decomposition rates were significantly higher in heated than in ambient channels (0.020 ± 0.003 and $0.016 \pm 0.002 \text{ d}^{-1}$ in heated and ambient channels, respectively; ANOVA, Temperature, $p = 0.02$; Fig. 3.4b). Primary production (in d^{-1}), as evaluated by the linear rate of biofilm pigment (in $\mu\text{g cm}^{-2}$) increase throughout the 56d experiment (Fig. 3.4c) was significantly and negatively impacted by temperature, shifting from 1.04 ± 0.22 in heated conditions to 1.47 ± 0.36 in ambient ones (ANOVA, Temperature, $p = 0.03$). In contrast, the ratio of microbial decomposition to primary production (kFM/primary production, Fig. 3.4d) was unaffected by the two treatments and their interactions (ANOVA, all $p > 0.05$).

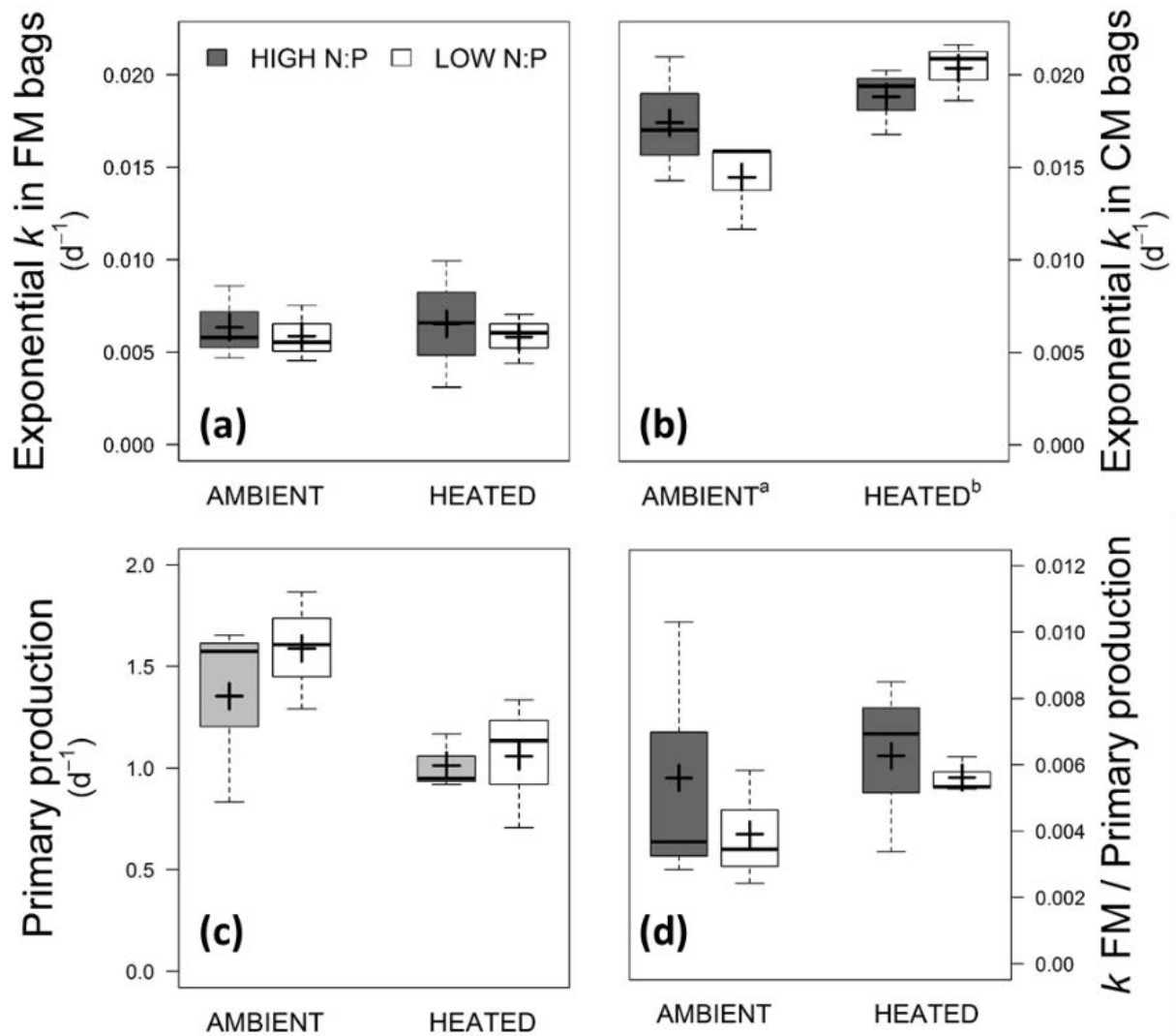


Figure 3.4 Effects of temperature and water N:P ratios on leaf litter exponential decomposition rates in fine (a) and coarse (b) mesh bags, primary production (c), and microbial decomposition to primary production ratios (d) measured during the 56 days experiment in the four treatments.

Effects of temperature and water N:P ratio on top-down impacts of invertebrates

Evaluation of the importance of macro-invertebrates on leaf litter decomposition rates (measured through the ratio of k measured in CM bags to k measured in FM bags, Fig. 3.5a) revealed that the detritivorous invertebrates significantly increased rates of leaf litter decomposition only in the low N:P treatments, independently of water temperature. In contrast, negative impacts of macro-invertebrates on biofilm biomass after 56 d (evaluated through the ratio of biofilm

pigments measured upstream, i.e. with grazer, to biofilm pigments measured downstream, i.e. without grazers, Fig. 3.5b) was only significant in the heated, high N:P ratio treatment. All other ratios did not differ significantly from 0.

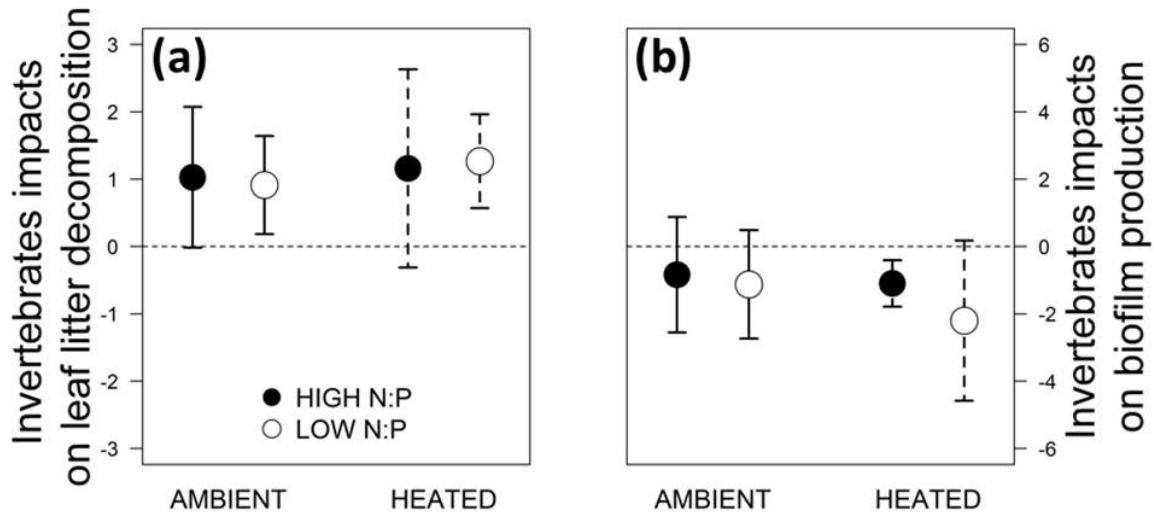


Figure 3.5 Evaluation of the invertebrate consumer impacts on rates of leaf litter decomposition (a; calculated as the \ln -transformed ratio of k_{CM} on k_{FM}) and biofilm production (b; calculated as the \ln -transformed ratio of biofilm pigments concentration with invertebrates (upstream) on concentration without invertebrates (downstream)) in the four different treatments. Error bars correspond to 95% confidence intervals (IC 95%)

Stoichiometry and PUFA content of leaf litters and biofilms

Initially, hazel leaf litter introduced in FM bags contained 42.8 % of C, 1.2 % of N and 0.02 % of P, resulting in C:N, N:P and C:P molar ratios of 42.1, 149.0 and 6224.5, respectively. After 52d of conditioning, leaf litters contained 41.2 % of C, 1.5 % of N and 0.05% of P, resulting in C:N, N:P, and C:P ratios of 31.5 ± 2.0 , 68.3 ± 7.0 , and 2153.0 ± 227.6 , respectively (Table 3.2). Statistical analyses revealed no significant effect of temperature and dissolved N:P ratio (neither in interaction nor as simple additive factors) on leaf litter C:N:P ratios (ANOVA, all $p > 0.05$; Table 3.2).

Table 3.2 Leaf litter and biofilm C:N, N:P and C:P molar ratios and biofilm content in the main Poly Unsaturated Fatty Acids measured on the last date of the experiment (day 56). Values are mean (\pm SD, n=3).

			<i>Ambient, N:P high</i>	<i>Ambient, N:P low</i>	<i>Heated, N:P high</i>	<i>Heated, N:P low</i>
Leaf litter (fine mesh bags)	Elemental composition	%C	40.09 \pm 3.39	39.04 \pm 3.01	36.39 \pm 8.06	38.14 \pm 3.50
		C:N	33.21 \pm 2.44	31.52 \pm 2.30	31.29 \pm 2.14	31.17 \pm 2.97
		C:P	2356.89 \pm 278.51	1958.84 \pm 210.89	2042.24 \pm 416.24	2219.04 \pm 343.06
		N:P	71.15 \pm 8.82	62.16 \pm 5.26	65.00 \pm 11.47	70.98 \pm 6.46
Biofilm (downstream)	Elemental composition	%C	15.76 \pm 2.63	12.56 \pm 2.40	14.88 \pm 2.61	14.24 \pm 3.15
		C:N	14.56 \pm 1.54	15.71 \pm 2.00	14.92 \pm 2.19	18.14 \pm 4.42
		C:P	255.19 \pm 115.04	197.06 \pm 75.82	223.42 \pm 52.80	211.12 \pm 61.90
		N:P	17.31 \pm 6.51 ^A	12.29 \pm 3.34 ^B	15.05 \pm 3.12 ^A	11.70 \pm 2.11 ^B
	Main PUFA content ($\mu\text{g}\cdot\text{mgDW}^{-1}$)	18:3 ω 3	0.15 \pm 0.03 ^A	0.08 \pm 0.03 ^B	0.13 \pm 0.06 ^A	0.06 \pm 0.02 ^B
		20:5 ω 3	1.97 \pm 0.07 ^{A*}	1.26 \pm 0.38 ^{B*}	1.90 \pm 0.37 ^A	1.20 \pm 0.23 ^B
		22:6 ω 3	0.14 \pm 0.01	0.09 \pm 0.03	0.13 \pm 0.04	0.08 \pm 0.01
Sum of PUFAs		6.45 \pm 0.40	4.13 \pm 1.15	5.64 \pm 1.16	3.79 \pm 0.63	

Letters indicate a significant effect of water N:P level; * indicate a significant effect of temperature; no interaction was evidenced

After 56 days, biofilm stoichiometry did not differ significantly between treatments (Table 3.2). In contrast, fatty acid profiles were affected by dissolved N:P ratios. Considering biofilms from the four treatments, about 90% of total fatty acids were identified and these fatty acid were represented in average by 34% of saturated fatty acids, 33% of monounsaturated fatty acids, and 24% of polyunsaturated fatty acids. Biofilms contained predominantly palmitoleic acid (16:1 ω 7), palmitic acid (16:0), eicosapentaenoic acid (20:5 ω 3) and myristic acid (14:0), these fatty acids representing respectively 28.9 \pm 3.5%, 19.9 \pm 2.5%, 7.7 \pm 1.3 %, and 7.2 \pm 0.9 % of total fatty acids. Both concentrations of 18:3 ω 3 and 20:5 ω 3 were significantly increased in the high N:P channels when compared to the low N:P ones ($p < 0.001$). In contrast, 20:5 ω 3 were slightly reduced in heated channels when compared to ambient ones ($p < 0.05$), while no interactions between temperature and N:P ratios were evidenced neither on 18:3 ω 3 nor on 20:5 ω 3 biofilm content.

Macro-invertebrate responses to temperature and nutrients

Initially, 259 *Gammarus fossarum* of known length (mean \pm SD: 5.07 \pm 1.32 mm, sorted in 3 size classes) were introduced in each channel. After 56 days, mean growth rates (\pm SD) of gammarid population reached 0.0051 \pm 0.0002 day⁻¹ in heated channels, and 0.0036 \pm 0.0001 day⁻¹ in ambient channels, for a mean length (\pm SD) of 6.70 \pm 1.43 mm and 6.23 \pm 1.37 mm in heated and ambient channels respectively (Table 3.3). The faster growth of gammarids population was observed for those placed in heated channels (Fig. 3.6), with a larger shift of the associated density curves to larger sizes in comparison with gammarids grown in ambient channels. Because of the non-normality of the residuals of the GLM model, the effect of temperature and nutrients on gammarid length was assessed using Kruskal-Wallis multi-comparison test. It revealed a significant difference between the length of gammarids found in heated and ambient channels, but not between high and low N:P channels ($p = 0.05$, Bonferroni adjusted). Mean mortality rate (\pm SD) of macro-invertebrates in all channels after 56 days was 46.30 \pm 13.02 % for *Gammarus fossarum*, 46.33 \pm 9.57 % for *Epeorus spp*, 13.33 \pm 15.57 % for *Odontocerum spp* and 16.67 \pm 23.87 % for *Sericostoma spp* (Table 3), these mortalities being independent of the treatments.

Table 3.3 Mean \pm SD (n=3) length, growth, and mortality of Gammarids and mean \pm SD (n=3) mortality of Ephemeroptera and Trichoptera per treatment

	<i>Gammarids</i>			<i>Ephemeroptera</i>	<i>Trichoptera</i>
	<i>Length (mm)</i>	<i>Growth (mm day⁻¹)</i>	<i>Mortality (%)</i>	<i>Mortality (%)</i>	<i>Mortality (%)</i>
AMBIENT HIGH	6.23 \pm 0.24 ^a	0.0037 \pm 0.0007	51 \pm 12	45 \pm 2	20 \pm 10
AMBIENT LOW	6.15 \pm 0.33 ^a	0.0034 \pm 0.0010	45 \pm 9	49 \pm 18	7 \pm 15
HEATED HIGH	6.67 \pm 0.25 ^b	0.0049 \pm 0.0006	54 \pm 18	51 \pm 6	3 \pm 6
HEATED LOW	6.77 \pm 0.27 ^b	0.0052 \pm 0.0007	35 \pm 7	40 \pm 4	30 \pm 10

Treatments with the same letter are not significantly different (Kruskal-Wallis multiple comparison test, $p > 0.05$).

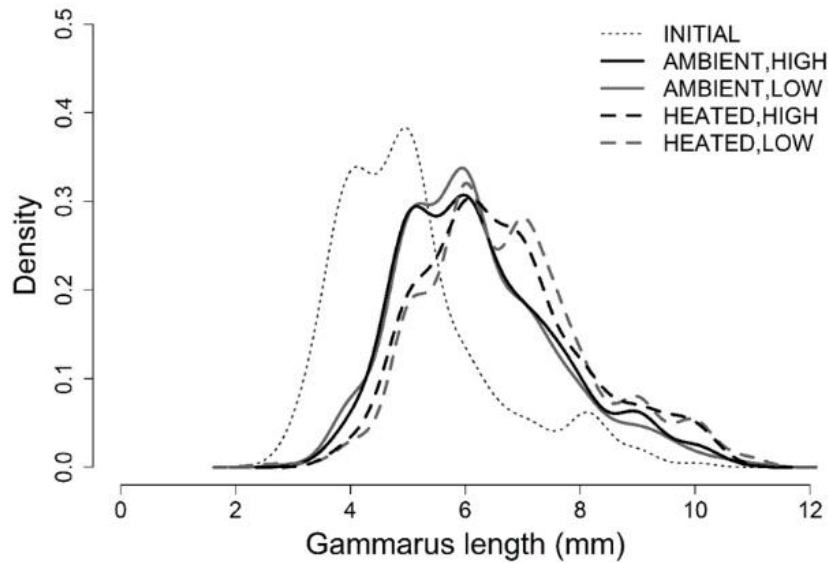


Figure 3.6 Size distribution of gammarids at the beginning of the experiment and after 56 days of experiments in the four different treatments. Dotted line is the initial distribution, solid lines are ambient distributions, and dash lines are heated distributions. Dark and light grey represent treatments with high and low nutrients supply.

Discussion

The main objective of this study was to investigate the potential interactive effects of temperature and dissolved N:P ratio in water on the relative importance of brown and green processes occurring in stream ecosystems and, in turn, on their invertebrate consumers. To date, most studies dealing with this question were conducted in highly simplified conditions. Yet, these effects might largely differ when investigated in more complex systems, representing diverse habitats, resources, and species interactions, as well as different trophic levels (Woodward et al. 2010). Our results revealed complex single and combined effects of the two parameters tested on different functional processes, underlining the importance of including ecological complexity.

Effects of temperature and water N:P ratio on microbial decomposers – primary producers interactions

Microbial decomposition is a key ecosystem process, especially in forested headwater streams where allochthonous detritus constitute the main input of nutrient and energy for stream food webs (Wallace et al. 1997). Inorganic nutrients, and N in particular, are directly incorporated in fungal biomass and stimulate mycelial growth and activity (Gulis et al. 2017). Microbial decomposition is also a temperature dependent process that is expected to benefit from increased temperatures (Follstad-Shah et al. 2017). Both parameters were thus expected to fasten microbial decomposition processes, either independently or interactively. Yet, contrary to expectations, our study did not reveal any significant effect of water N:P ratio and temperature on the microbial decomposition of hazel leaf-litter. Similarly, fungal biomass and spores production, an indicator of fungal activity, were only moderately affected by the different treatments. Fungal growth was slightly delayed in the high N:P, heated treatment, while spore production was only stimulated by temperature on the last date of the experiment. These results contrast with those from previous studies that reported an increase in microbially-driven decomposition and fungal activities under increased nutrients availability (Gulis and Suberkropp 2003), temperature (Ferreira and Chauvet 2011a), or both simultaneously (Fernandes et al. 2014; Ferreira and Chauvet 2011b). Nevertheless, our results are consistent with those of two recent field studies (Gossiaux et al. 2019; Pérez et al. 2018) that suggest microbial activity can be highly sensitive to other ecological variables (e.g. seasonal variations, interactions with other biological compartments). These contrasted observations emphasize the need to consider more diversified systems when assessing the effects of complex environmental changes.

Among the different factors that could have participated to dampen the effects of temperature and nutrients on microbial decomposition of leaf litter, the initial choice of the leaf litter might have played a non-negligible role. Ferreira et al. (2015) showed in a meta-analysis on nutrient enrichment effects on leaf litter decomposition that impacts of nutrient enrichments were maximized on low quality substrates. The use of a low refractory resource in our experiment might thus have reduced the magnitude of the response to the nutrient treatment. In addition to this hypothesis, the putative role of the competition between microbial decomposers and phototrophic

biofilms on leaf litter decomposition was specifically tested in this experiment. Indeed, both primary producers and decomposers compete for the same inorganic nutrients (Daufresne and Loreau 2001), and any factor that could favor the development of one biological compartment could, in turn, negatively affect the other one. To date, very few data are available concerning the interactions of primary producers and decomposers in forested headwater streams. Some results suggested that aquatic fungi could control algal growth either through higher competitive capabilities for nutrients (Danger et al. 2013b) or through the production of allelopathic compounds (Allen et al. 2017). In addition, algal exudation, exacerbated by nutrient depletion, could negatively or positively impact leaf litter decomposition through priming effect mechanisms (Danger et al. 2013b; Kuehn et al. 2014; Halvorson et al. 2018). In headwater streams, in addition to low light levels (Hill et al. 1995), phototrophic biofilm development can be constrained by low temperature (Delgado et al. 2017) and dissolved nutrient concentrations (Gao et al. 2019; Myrstener et al. 2018). In this context, we expected that simultaneous increase of these two factors would have stimulated phototrophic biofilm biomass and, by extent, pigments concentrations. However, our study revealed that temperature and nutrients effects are not simply additive or synergistic, but can differentially influence biofilm development depending on the stage of substrate colonization. Indeed, in absence of invertebrate grazers, higher temperature associated to high N:P ratios significantly increased biofilm biomass after 21 days. Interestingly, this increased biofilm biomass is also related to a lowest fungal biomass in decomposing leaf litters. Higher biofilm biomass in high temperature, high N:P conditions could thus have led to higher competition for nutrients with microbial decomposers and at least partly impeded the expected stimulation of leaf litter decomposition by temperature elevation and nutrient addition.

To go further in the understanding of microbial decomposers / primary producer interactions, we calculated primary production based on the temporal dynamic of pigment concentration increase in the absence of grazers. Such a time integrated indicator was expected to be more comparable to the leaf litter decomposition rate calculated using the FM leaf mass loss. Results showed a significant negative effect of temperature on primary production, maximal algal biomass being ultimately higher in the ambient than in the heated channels. Based on the results of microcosm experiments, primary production could have been expected

to be higher in heated systems rather than in ambient ones, as already suggested in previous laboratory studies (e.g. Díaz-Villanueva et al. 2011). However, results from the literature are far less conclusive when measurements are made in natural ecosystems. For example, using streams representing natural gradients of temperature, no trend was evidenced between temperature and biofilm biomass (Friberg et al. 2009). As underlined by Woodward et al. (2010), the response of ecological processes to parameters like temperature might largely differ between highly simplified, laboratory conditions and more complex ecosystems, where species interactions might modify the observed responses. Despite the significant effect of temperature on primary production, the relative intensity of microbial decomposition when compared to primary production were not significantly impacted by temperature and dissolved N:P ratio (Fig. 3.4d). These last results suggest that even if interactions between primary producers and decomposers occurred throughout the 56d experiment, these ones were not strongly impacted by the treatments tested. Nevertheless, searching for such comparisons of green and brown processes interactions might be interesting to investigate in more nutrient contrasted ecosystems, these interactions being expected to be exacerbated in the most oligotrophic conditions (Danger et al. 2013b).

An alternative hypothesis to primary producers/decomposers interactions for explaining the absence of response of microbial decomposition to both temperature and inorganic nutrient level could be that these treatments altered fungal community structure and, in turn, changed the intensity of their decomposition activity. Indeed, temperature and nutrients could have led to significant changes in microbial decomposer community structure. Species replacement of more efficient fungal species in the less favorable conditions (i.e. ambient temperature, lower N:P ratios) by less efficient ones in the more favorable conditions (i.e. high temperature, higher N:P ratios) could have concur to maintain decomposition at similar levels. In other words, it could be hypothesized that some species with lower nutrient and thermal requirements could have higher decomposition capabilities. In our experiment, analyses revealed a significant effect of temperature on fungal community structure but only at the latest stage of decomposition. It seems thus unlikely for the former hypothesis to occur or, at least, to be sufficient for explaining the absence of response of microbial decomposition. Interestingly, analyses also revealed a positive effect of temperature on the relative contribution of *Lunulospora curvula* in total conidia

production in ambient channels in comparison with heated channels. This result is surprising given that this species is classically found in warm waters from tropical ecosystems or in summer assemblages under our latitudes. Changes in assemblages in late decomposition could be due to a lower competitiveness of some aquatic hyphomycete species under higher temperatures. However, this explanation is unlikely given that the occurring shift concerns a species that generally prefers higher temperatures than those observed in all our channels, and particularly at the end of the experiment when air temperatures dropped below zero (°C).

Effects of temperature and water N:P ratio on the top-down control of higher trophic levels

Although microbially-driven decomposition remained similar in all treatments, we observed that even a slight elevation in water temperature (+ 2°C) was able to significantly enhance the overall decomposition rates (ensured by both micro-organisms and macro-invertebrates) in comparison with ambient channels. **Temperature might thus have stimulated detritivorous invertebrates' activity and leaf litter consumption rate.** Leaf litter consumption is generally related to the degree of microbial development (Graça et al. 1993; Danger et al. 2012). In our experiment, the increase in leaf litter consumption was certainly independent of leaf litter microbial conditioning, since microbial biomass was not stimulated by temperature. A **stimulation of invertebrates' metabolism** is thus a more plausible explanation for this positive response of leaf litter mass loss in heated channels. In contrast to temperature, nutrients supply did not significantly influence overall decomposition rates. However, when investigating the ratio of CM to FM decomposition rates, the presence of invertebrates was shown to significantly change leaf litter decomposition only in the lower N:P conditions (Fig. 3.5a). These observations contrast with the results from Moghadam and Zimmer (2016), who observed that simultaneous increase in nutrient concentration and temperature accelerated litter decomposition as a result of synergistic interactions between those factors. However, as shown by Greig et al. (2012), the effect of nutrients on litter decomposition can vary seasonally, hence depending on several other factors. In our study, which took place in late autumn, the relatively low temperatures (9-11 °C) could explain the lack of synergistic effects between temperature and nutrients on decomposition rates.

Concerning the top-down impact of the invertebrates consumers on biofilms, comparing the upstream and downstream sections of our mesocosms permitted to evaluate the intensity of the biofilm biomass control ensured by grazers. Interestingly, grazers significantly reduced the algal biomass measured at 56d only in the high N:P, heated treatment (Fig. 3.5b). In headwater streams, grazers have been shown to be able to strongly control biofilm biomass, this grazing being for example susceptible to almost totally control the biofilm biomass increase following experimental nutrient enrichments (Greenwood and Rosemond 2005). Our results suggest that such a control of biofilm production might also be dependent on the interaction between temperature and nutrient availability conditions. Testing this hypothesis in natural streams exposed to nutrient pollution in different seasons might be interesting to evaluate the susceptibility of benthic algae blooms to occur.

Effects of temperature and water N:P ratio on the bottom-up control of higher trophic levels

It is henceforth admitted that fungal nutrient immobilization potentially increase the stoichiometric quality of the leaf litter, in particular in nutrient enrichment conditions (Danger et al. 2013a; Gulis et al. 2017; Jabiol et al. 2018; Manning et al. 2015), whereas regarding temperature effects on stoichiometric quality, the literature has not come to an agreement yet. In our study, differences in leaf litter elemental contents and ratios were independent of the temperature and of the water N:P ratios. This last result was unexpected since leaf litter content generally reflects the nutrient availability in the water column (Farrell et al. 2018). Similarly, C:N:P ratios of biofilms collected on the last date of the experiment did not significantly differ between treatments. Gulis et al. (2017) results suggested that P was more susceptible than N to luxury uptake by aquatic fungi, N being mainly used for immediate organisms biomass increase. The fast decrease in water dissolved P observed between each nutrient addition (see Material and Methods, data not shown) could suggest that in these relatively high N:P conditions (molar N:P ratios of 33 and 100, ratios generally above those leading to N limitations, Güsewell and Gessner 2009), the potentially limiting P was quickly immobilized by microorganisms after each nutrient addition, this P being then used for microbial growth with the non-limiting N, thus maintaining a low variability in microbial biomass. It must also be noted that results of our

experiment might have differed if dissolved N and P amounts had been let constant throughout the experiment. Indeed, it has been shown that both nutrient total amounts and ratios are fundamental for determining the nature and the intensity of microbial nutrient limitations (Güsewell and Gessner 2009). In our experiment, since N:P ratios were maintained constant but N and P availabilities declined through time, one can imagine that nutrient limitations might have changed during the experiment.

Finally, in contrast with elemental ratios, biofilm fatty acids proportions were significantly influenced by water N:P ratios and temperature. In particular, the biofilm **contents in 18:3 ω 3 and the 20:5 ω 3 were significantly higher in the high N:P channels than in the low N:P ones, and biofilm contents in 20:5 ω 3 were slightly reduced in heated channels. Temperature increase is largely known to reduce organisms' requirements in PUFAs (e.g. Masclaux et al. 2009). In our experiment, these differences, while significant, remained reduced. Differences in temperature might have not been sufficient for inducing strong changes in biofilm PUFA content, especially because mean temperatures in experimental streams were quite low (between 9 and 11°C). In contrast, the higher PUFAs content of biofilms grown in high N:P conditions are in agreement with some results showing a higher synthesis of these compounds by benthic algae in higher nutrient conditions (e.g. Hill et al. 2011). Since some PUFAs can be limiting for macro-invertebrates growth (Torres-Ruiz et al. 2007; Crenier et al. 2017), a stimulation of biofilm consumers growth in the high N:P ratio channels mediated by an increase in resources quality could have been expected. In our experiment, the organisms we choose to measure temperature and nutrient impacts on higher trophic levels growth were gammarids. Indeed, gammarids are mostly detritivorous invertebrates that still have substantial capacity for herbivory and could cope with low-quality detrital resources by compensatory feeding on biofilms (Flores et al. 2014; Taylor and Brown 2006). As such, they provide an important link between brown and green food webs, and can have substantial influence on auto- and heterotrophic microbes (Frost et al. 2002; Hillebrand et al. 2004; Jüttner et al. 2001). In our study, gammarids growth was significantly increased in the heated mesocosms, whatever the N:P ratio tested. Gammarids growth was neither related to leaf litter elemental quality nor to resources PUFA contents, probably due to the fact that these resources were either not sufficiently limiting or not sufficiently different between treatments for inducing a stimulation of consumers growth. The increase in gammarids metabolism, associated to higher leaf litter consumption rates in heated**

channels, might thus explain by itself the fastest growth observed with higher temperature.

Conclusion

Overall, results from our mesocosm experiment indicate that even small changes in temperature and nutrients supply may have complex and pervasive effects on stream ecosystem processes. Most of our hypotheses that were based, upon the results of laboratory experiment carried out, for most of them, with large gradients of both temperature and nutrients, have been rejected in our semi-controlled mesocosms. Contrary to expectations, microbial leaf litter decomposition remained unchanged under higher temperatures and N:P ratios, and biofilm growth stimulation by nutrients and temperature were limited, and transitory. Most of temperature responses concerned macro-invertebrates that showed increased activity and growth, while these changes were unrelated to changes in resources quality (in terms of resources stoichiometry and PUFA contents). Our mesocosm study thus demonstrated that interactive effects of temperature and nutrients were certainly far much more complicated than initially thought. Undoubtedly, our mesocosm study also have limits, particularly concerning the temperature variability in such experimental settings. Indeed, as the water temperature followed air temperature fluctuations, water temperature variations in our experimental channels upon 56 days were certainly wider than actual variations occurring *in natura*. However, the mean temperature difference between heated and ambient channels (1.91 °C) is realistic with current IPCC previsions for the years to come (IPCC 2014) and has the edge to consider diel temperature oscillations. However, such semi-controlled experiments, involving a large complexity of biological communities, might be essential to better understand the effects of potential interactions amongst multiple stressors on natural ecosystems and to provide insights into possible mitigation effects through the complex network of species interactions.

Acknowledgments

We first greatly thank H. Halvorson, K. Kuehn, K. Wyatt for inviting us to submit our research to this special issue. This work was supported by the French National Research Agency program FunctionalStream project (ANR-14-CE01-0009) to EC. M.D. benefited from the Institut Universitaire de France (IUF). We are grateful to P. Rousselle for conducting chemical water analyses, to D. Lambrigot for ensuring ergosterol quantification, and to P. Wagner and J. Bouquerel for valuable help in the field.

References

- Allen J.L., Leflaive J., Bringuier C., Ten-Hage L., Chauvet E., Cornut J., et al. (2017). Allelopathic inhibition of primary producer growth and photosynthesis by aquatic fungi. *Fungal Ecology* 29, 133–138. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2017.07.001>
- Bärlocher F. (1985). The role of fungi in the nutrition of stream invertebrates. *Botanical journal of the Linnean Society* 91, 83–94
- Benfield E.F. (2006). Decomposition of leaf material. In: *Methods in stream ecology*, 2nd ed. (Eds F.R. Hauer & G.A. Lamberti), pp. 711–720. Academic Press/Elsevier, San Diego, Calif.
- Crenier C., Arce-Funck J., Bec A., Billoir E., Perrière F., Leflaive J., et al. (2017). Minor food sources can play a major role in secondary production in detritus-based ecosystems. *Freshwater Biology* 62, 1155–1167
- Cross W.F., Hood J.M., Benstead J.P., Huryn A.D. & Nelson D. (2015). Interactions between temperature and nutrients across levels of ecological organization. *Global Change Biology* 21, 1025–1040. <https://doi.org/10.1111/gcb.12809>
- Danger M., Arce Funck J., Devin S., Heberle J. & Felten V. (2013a). Phosphorus content in detritus controls life-history traits of a detritivore. *Functional Ecology* 27, 807–815
- Danger M., Cornut J., Chauvet E., Chavez P., Elger A. & Lecerf A. (2013b). Benthic algae stimulate leaf litter decomposition in detritus-based headwater streams: a case of aquatic priming effect? *Ecology* 94, 1604–1613. <https://doi.org/10.1890/12-0606.1>
- Danger M., Cornut J., Elger A. & Chauvet E. (2012). Effects of burial on leaf litter quality, microbial conditioning and palatability to three shredder taxa. *Freshwater Biology* 57, 1017–1030
- Daufresne T. & Loreau M. (2001). Ecological Stoichiometry, Primary Producer-Decomposer Interactions, and Ecosystem Persistence. *Ecology* 82, 3069. <https://doi.org/10.2307/2679835>
- Delgado C., Almeida S.F.P., Elias C.L., Ferreira V. & Canhoto C. (2017). Response of biofilm growth to experimental warming in a temperate stream. *Ecohydrology*, 10, 6, e1868. <https://doi.org/10.1002/eco.1868>

- Díaz-Villanueva V., Font J., Schwartz T. & Romaní A.M. (2011). Biofilm formation at warming temperature: acceleration of microbial colonization and microbial interactive effects. *Biofouling* 27, 59–71. <https://doi.org/10.1080/08927014.2010.538841>
- Elser J.J. (2011). A world awash with Nitrogen. *Science* 334, 1504–1505
- Elser J.J., Andersen T., Baron J.S., Bergstrom A.-K., Jansson M., Kyle M., et al. (2009). Shifts in Lake N:P Stoichiometry and Nutrient Limitation Driven by Atmospheric Nitrogen Deposition. *Science* 326, 835–837. <https://doi.org/10.1126/science.1176199>
- Farrell K.J., Rosemond A.D., Kominoski J.S., Bonjour S.M., Rüegg J., Koenig L.E., et al. (2018). Variation in Detrital Resource Stoichiometry Signals Differential Carbon to Nutrient Limitation for Stream Consumers Across Biomes. *Ecosystems*, 21, 8, 1676–1691. <https://doi.org/10.1007/s10021-018-0247-z>
- Felten V. (2003). *Effets de l'acidification des ruisseaux vosgiens sur la biologie, l'écologie et l'écophysiologie de Gammarus fossarum Koch, 1835 (Crustacea Amphipoda) : Approche intégrée à différents niveaux d'organisation*. PhD thesis, Université de Metz, p333
- Fernandes I., Seena S., Pascoal C. & Cássio F. (2014). Elevated temperature may intensify the positive effects of nutrients on microbial decomposition in streams. *Freshwater Biology* 59, 2390–2399
- Ferreira V. & Chauvet E. (2011a). Future increase in temperature more than decrease in litter quality can affect microbial litter decomposition in streams. *Oecologia* 167, 279–291. <https://doi.org/10.1007/s00442-011-1976-2>
- Ferreira V. & Chauvet E. (2011b). Synergistic effects of water temperature and dissolved nutrients on litter decomposition and associated fungi. *Global Change Biology* 17, 551–564. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02185.x>
- Ferreira V., Castagneyrol B., Koricheva J., 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. <https://doi.org/10.1111/brv.12125>
- Ferreira V., Chauvet E. & Canhoto C. (2014). Effects of experimental warming, litter species, and presence of macroinvertebrates on litter decomposition and associated decomposers in a temperate mountain stream. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 72, 206–216. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2014-0119>
- Flores L., Larrañaga A. & Elosegi A. (2014). Compensatory feeding of a stream detritivore alleviates the effects of poor food quality when enough food is supplied. *Freshwater Science* 33, 134–141. <https://doi.org/10.1086/674578>
- Folch J., Lees M. & Stanley H.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226, 497–509
- Follstad Shah J.J., Kominoski J.S., Ardón M., Dodds W.K., Gessner M.O., Griffiths N.A., et al. (2017). Global synthesis of the temperature sensitivity of leaf litter breakdown in streams and rivers. *Global*

- Change Biology* 23, 3064–3075.
<https://doi.org/10.1111/gcb.13609>
- Friberg N., Dybkjaer J.B., Ólafsson J.S., Gíslason G.M., Larsen S.E. & Lauridsen T.L. (2009). Relationships between structure and function in streams contrasting in temperature. *Freshwater Biology* 54, 2051–2068.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2009.02234.x>
- Frost P.C., Elser J.J. & Turner M.A. (2002). Effects of Caddisfly Grazers on the Elemental Composition of Epilithon in a Boreal Lake. *Journal of the North American Benthological Society* 21, 54–63.
<https://doi.org/10.2307/1468299>
- Galloway J.N., Townsend A.R., Erisman J.W., Bekunda M., Cai Z., Freney J.R., et al. (2008). Transformation of the Nitrogen Cycle: Recent Trends, Questions, and Potential Solutions. *Science* 320, 889–892.
<https://doi.org/10.1126/science.1136674>
- Gao Y., Jia Y., Yu G., He N., Zhang L., Zhu B., et al. (2019). Anthropogenic reactive nitrogen deposition and associated nutrient limitation effect on gross primary productivity in inland water of China. *Journal of Cleaner Production* 208, 530–540.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.10.137>
- Gessner M.O. & Chauvet E. (1993). Ergosterol-to-biomass conversion factors for aquatic hyphomycetes. *Applied and environmental microbiology* 59, 502–507
- Gessner M.O. & Newell S.Y. (2002). Biomass, growth rate, and production of filamentous fungi in plant litter. *Manual of environmental microbiology*, 2, 390–408
- Gilliam F.S., Burns D.A., Driscoll C.T., Frey S.D., Lovett G.M. & Watmough S.A. (2019). Decreased atmospheric nitrogen deposition in eastern North America: Predicted responses of forest ecosystems. *Environmental Pollution* 244, 560–574.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.135>
- Gilman S.E., Urban M.C., Tewksbury J., Gilchrist G.W. & Holt R.D. (2010). A framework for community interactions under climate change. *Trends in Ecology & Evolution* 25, 325–331.
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.03.002>
- Gossiaux A., Jabiol J., Poupin P., Chauvet E. & Guérol F. (2019). Seasonal variations overwhelm temperature effects on microbial processes in headwater streams: insights from a temperate thermal spring. *Aquatic Sciences* 81.
<https://doi.org/10.1007/s00027-019-0627-2>
- Graça M.A.S., Bärlocher F. & Gessner M.O. eds (2005). *Methods to study litter decomposition: a practical guide*. Springer, Dordrecht ; New York.
- Graça M.A.S., Maltby L. & Calow P. (1993). Importance of fungi in the diet of *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus*. *Oecologia* 96, 304–309
- Greenwood J.L. & Rosemond A.D. (2005). Periphyton response to long-term nutrient enrichment in a shaded headwater stream. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62, 2033–2045
- Greig H.S., Kratina P., Thompson P.L., Palen W.J., Richardson J.S. & Shurin J.B. (2012). Warming, eutrophication, and predator loss amplify subsidies between aquatic and terrestrial ecosystems. *Global Change Biology* 18, 504–514.

- <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2011.02540.x>
- Gulis V., Kuehn K.A., Schoettle L.N., Leach D., Benstead J.P. & Rosemond A.D. (2017). Changes in nutrient stoichiometry, elemental homeostasis and growth rate of aquatic litter-associated fungi in response to inorganic nutrient supply. *The ISME journal* 11, 2729
- Gulis V. & Suberkropp K. (2003). Leaf litter decomposition and microbial activity in nutrient-enriched and unaltered reaches of a headwater stream. *Freshwater biology* 48, 123–134
- Guo F., Kainz M.J., Sheldon F. & Bunn S.E. (2016). The importance of high-quality algal food sources in stream food webs - current status and future perspectives. *Freshwater Biology* 61, 815–831. <https://doi.org/10.1111/fwb.12755>
- Güsewell S. & Gessner M.O. (2009). N : P ratios influence litter decomposition and colonization by fungi and bacteria in microcosms. *Functional Ecology* 23, 211–219. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01478.x>
- Halvorson H.M., Barry J.R., Lodato M.B., Findlay R.H., Francoeur S.N. & Kuehn K.A. (2018). Periphytic algae decouple fungal activity from leaf litter decomposition via negative priming. *Functional Ecology*, 33, 1, 188-201. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13235>
- Hieber M. & Gessner M.O. (2002). Contribution of stream detritivores, fungi, and bacteria to leaf breakdown based on biomass estimates. *Ecology* 83, 1026–1038
- Hillebrand H., De Montpellier G. & Liess A. (2004). Effects of macrograzers and light on periphyton stoichiometry. *Oikos* 106, 93–104
- Hillebrand H., Frost P. & Liess A. (2008). Ecological stoichiometry of indirect grazer effects on periphyton nutrient content. *Oecologia* 155, 619–630. <https://doi.org/10.1007/s00442-007-0930-9>
- Hill W.R., Rinchar J. & Czesny S. (2011). Light, nutrients and the fatty acid composition of stream periphyton: Periphyton stoichiometry and fatty acids. *Freshwater Biology* 56, 1825–1836. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2011.02622.x>
- Hill W.R., Ryon M.G. & Schilling E.M. (1995). Light limitation in a stream ecosystem: responses by primary producers and consumers. *Ecology* 76, 1297–1309
- Hogg I.D. & Williams D.D. (1996). Response of stream invertebrates to global-warming thermal regime: an ecosystem-level manipulation. *Ecology* 77, 395–407
- Hood J.M., Benstead J.P., Cross W.F., Huryn A.D., Johnson P.W., Gíslason G.M., et al. (2018). Increased resource use efficiency amplifies positive response of aquatic primary production to experimental warming. *Global Change Biology* 24, 1069–1084. <https://doi.org/10.1111/gcb.13912>
- IPCC (2014). IPCC Summary for policymakers. In: *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Field, C.B., V.R. Barros, D.J. Dokken, K.J. Mach, M.D. Mastrandrea, T.E. Bilir, M. Chatterjee, K.L. Ebi, Y.O. Estrada, R.C. Genova, B. Girma, E.S. Kissel, A.N. Levy, S. MacCracken, P.R. Mastrandrea, and L.L. White (eds.)]. Cambridge University

- Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1–32.
- IPCC (2018). Summary for Policymakers. In: *Global warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty* [V. Masson-Delmotte, P. Zhai, H. O. Pörtner, D. Roberts, J. Skea, P. R. Shukla, A. Pirani, W. Moufouma-Okia, C. Péan, R. Pidcock, S. Connors, J. B. R. Matthews, Y. Chen, X. Zhou, M. I. Gomis, E. Lonnoy, T. Maycock, M. Tignor, T. Waterfield (eds.)].
- Iqbal S.H. & Webster J. (1973). Aquatic hyphomycetes spora of the river exe and its tributaries. *Transactions of the British Mycological Society* 61, 331–346
- Jabiol J., Cornut J., Tlili A. & Gessner M.O. (2018). Interactive effects of dissolved nitrogen, phosphorus and litter chemistry on stream fungal decomposers. *FEMS microbiology ecology* 94, fiy151
- Jüttner F. (2001). Liberation of 5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoic acid and other polyunsaturated fatty acids from lipids as a grazer defense reaction in epilithic diatom biofilms. *Journal of Phycology* 37, 744–755
- 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
- Langan S.J., Johnston L., Donaghy M.J., Youngson A.F., Hay D.W. & Soulsby C. (2001). Variation in river water temperatures in an upland stream over a 30-year period. *Science of the Total Environment* 265, 195–207
- Lorenzen C.J. (1967). Determination of chlorophyll and pheopigments—spectrophotometric equations. *Limnology and Oceanography* 12, 343–346
- Manning D.W., Rosemond A.D., Kominoski J.S., Gulis V., Benstead J.P. & Maerz J.C. (2015). Detrital stoichiometry as a critical nexus for the effects of streamwater nutrients on leaf litter breakdown rates. *Ecology* 96, 2214–2224
- Masclaux H., Bec A., Kainz M.J., Desvilettes C., Jouve L. & Bourdier G. (2009). Combined effects of food quality and temperature on somatic growth and reproduction of two freshwater cladocerans. *Limnology and Oceanography* 54, 1323–1332
- Moghadam F.S. & Zimmer M. (2016). Effects of warming, nutrient enrichment and detritivore presence on litter breakdown and associated microbial decomposers in a simulated temperate woodland creek. *Hydrobiologia* 770, 243–256. <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2596-3>
- Myrstener M., Rocher-Ros G., Burrows R.M., Bergström A.-K., Giesler R. & Sponseller R.A. (2018). Persistent nitrogen limitation of stream biofilm communities along climate gradients in the Arctic. *Global Change Biology* 24, 3680–3691. <https://doi.org/10.1111/gcb.14117>
- Odum E.P. (1949). Weight variations in wintering white-throated sparrows in relation to temperature and migration. *The Wilson Bulletin*, 3–14
- Pérez J., Martínez A., Descals E. & Pozo J. (2018). Responses of Aquatic Hyphomycetes to Temperature and

- Nutrient Availability: a Cross-transplantation Experiment. *Microbial Ecology*, 76, 2, 328–339
- Pozo J. & Colino R. (1992). Decomposition processes of *Spartina maritima* in a salt marsh of the Basque Country. *Hydrobiologia* 231, 165–175
- Reiners W.A. (1986). Complementary Models for Ecosystems. *The American Naturalist* 127, 59–73. <https://doi.org/10.1086/284467>
- Richardson J.S. & Danehy R.J. (2007). A synthesis of the ecology of headwater streams and their riparian zones in temperate forests. *Forest Science* 53, 131–147
- Taylor R.B. & Brown P.J. (2006). Herbivory in the gammarid amphipod *Aora typica*: relationships between consumption rates, performance and abundance across ten seaweed species. *Marine Biology* 149, 455–463
- Torres-Ruiz M., Wehr J.D. & Perrone A.A. (2007). Trophic relations in a stream food web: importance of fatty acids for macroinvertebrate consumers. *Journal of the North American Benthological Society* 26, 509–522
- Wallace J.B., Eggert S.L., Meyer J.L. & Webster J.R. (1997). Multiple trophic levels of a forest stream linked to terrestrial litter inputs. *Science* 277, 102–104
- Weitzel R.L. (1979). *Periphyton measurement and applications*. In: *Methods and measurements of periphyton communities: A Review*, ASTM International. (Ed. R.L. Weitzel), pp. 3–33.
- Wetzel R.G. (1995). Death, detritus, and energy flow in aquatic ecosystems. *Freshwater Biology* 33, 83–89
- Woodward G., Perkins D.M. & Brown L.E. (2010). Climate change and freshwater ecosystems: impacts across multiple levels of organization. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365, 2093–2106. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0055>

Supplementary online material

Table S3.1 Weekly concentrations of NO₃⁻ and PO₄³⁻ and subsequent additions of NO₃⁻ and PO₄³⁻ to reach the targeted N:P molar ratios of 100 and 33 in the high and low N:P treatments, respectively. Due to the high initial PO₄³⁻ concentrations, NO₃⁻ were mainly added at the beginning of the experiment. Then, after one week, PO₄³⁻ dropped quickly and PO₄³⁻ inputs were added to maintain a reasonable amount of PO₄³⁻, NO₃⁻ additions being adjusted to maintain the targeted N:P ratio. No nutrient addition was done on the last measurement date, systems being sufficiently rich in nutrients at this stage.

Date	Nutrient	Water N:P ratio Temperature Channel number	High N:P	Low N:P	High N:P	Low N:P	High N:P	Low N:P	High N:P	Low N:P	High N:P	Low N:P	High N:P	Low N:P	Mean N:P	Mean N:P
			Heated	Heated	Heated	Heated	Heated	Heated	Ambient	Ambient	Ambient	Ambient	Ambient	Ambient	Ambient	High
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
19/10/2016	NO ₃ ⁻ measured	mg/L	1.64	1.57	1.62	1.58	1.57	1.59	1.59	1.56	1.54	1.56	1.54	1.61		
	PO ₄ ³⁻ measured	mg/L	0.18	0.18	0.21	0.18	0.18	0.18	0.19	0.19	0.19	0.18	0.19	0.19		
	NO ₃ ⁻ addition	mg/L	10.00	2.50	10.00	2.50	10.00	2.50	10.00	2.50	10.00	2.50	10.00	2.50		
	PO ₄ ³⁻ addition	mg/L	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
	Final molar N:P ratio	mol mol⁻¹	98.54	33.89	83.99	34.16	97.95	35.01	93.96	33.63	95.58	33.81	95.07	32.63	94.18	33.86
25/10/2016	NO ₃ ⁻ measured	mg/L	8.02	1.41	8.86	1.47	8.23	1.66	8.35	1.64	7.90	1.63	7.98	1.49		
	PO ₄ ³⁻ measured	mg/L	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02		
	NO ₃ ⁻ addition	mg/L	0.00	1.12	0.00	1.12	0.00	1.12	0.00	1.12	0.00	1.12	0.00	1.12		
	PO ₄ ³⁻ addition	mg/L	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11		
	Final molar N:P ratio	mol mol⁻¹	99.70	31.41	105.85	31.90	101.49	34.52	102.97	34.83	100.66	34.14	100.01	32.14	101.78	33.16
02/11/2016	NO ₃ ⁻ measured	mg/L	6.38	0.98	7.61	1.05	5.48	1.34	7.28	0.98	6.53	1.21	7.10	1.18		
	PO ₄ ³⁻ measured	mg/L	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01		
	NO ₃ ⁻ addition	mg/L	1.62	1.66	0.39	1.59	2.52	1.30	0.72	1.66	1.47	1.43	0.90	1.46		
	PO ₄ ³⁻ addition	mg/L	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11		
	Final molar N:P ratio	mol mol⁻¹	97.09	32.56	99.45	33.64	102.79	33.64	101.93	34.50	102.79	33.09	103.66	34.21	101.28	33.60
10/11/2016	NO ₃ ⁻ measured	mg/L	6.82	1.21	7.08	1.39	6.46	1.39	6.76	1.81	7.10	1.56	7.01	1.29		
	PO ₄ ³⁻ measured	mg/L	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01		
	NO ₃ ⁻ addition	mg/L	0.00	1.03	0.00	0.85	0.00	0.85	0.00	0.43	0.00	0.68	0.00	0.95		
	PO ₄ ³⁻ addition	mg/L	0.09	0.09	0.10	0.09	0.09	0.10	0.10	0.10	0.10	0.09	0.10	0.10		
	Final molar N:P ratio	mol mol⁻¹	100.00	33.00	100.00	33.00	100.00	33.00	100.00	33.00	100.00	33.00	100.00	33.00	100.00	33.00
15/11/2016	NO ₃ ⁻ measured	mg/L	5.39	0.73	4.13	0.84	4.68	0.82	4.86	1.03	5.97	1.04	5.31	1.15		
	PO ₄ ³⁻ measured	mg/L	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01		
	NO ₃ ⁻ addition	mg/L	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
	PO ₄ ³⁻ addition	mg/L	0.07	0.02	0.05	0.03	0.06	0.03	0.07	0.04	0.08	0.04	0.07	0.05		
	Final molar N:P ratio	mol mol⁻¹	100.00	33.00	100.00	33.00	100.00	33.00	100.00	33.00	100.00	33.00	100.00	33.00	100.00	33.00
23/11/2016	NO ₃ ⁻ measured	mg/L	4.75	0.09	3.28	0.01	4.10	0.41	4.10	0.57	5.26	0.18	5.08	0.57		
	PO ₄ ³⁻ measured	mg/L	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01		
	NO ₃ ⁻ addition	mg/L	0.00	1.65	0.00	1.73	0.00	1.33	0.00	1.17	0.00	1.56	0.00	1.17		
	PO ₄ ³⁻ addition	mg/L	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.08	0.08	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07		
	Final molar N:P ratio	mol mol⁻¹	90.30	33.00	62.35	33.00	77.94	33.00	77.94	33.00	100.00	33.00	96.57	33.00	84.19	33.00
30/11/2016	NO ₃ ⁻ measured	mg/L	4.12	0.62	3.99	0.45	4.34	0.85	4.01	0.94	4.36	0.73	4.27	1.12		
	PO ₄ ³⁻ measured	mg/L	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01		
	NO ₃ ⁻ addition	mg/L	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
	PO ₄ ³⁻ addition	mg/L	0.06	0.02	0.05	0.02	0.06	0.04	0.06	0.04	0.06	0.03	0.06	0.04		
	Final molar N:P ratio	mol mol⁻¹	100.05	32.99	99.98	32.99	100.00	32.97	99.99	33.03	100.01	33.00	100.04	33.00	100.01	33.00
06/12/2016	NO ₃ ⁻ measured	mg/L	2.45	0.00	2.73	0.00	3.50	0.00	2.97	0.00	3.20	0.00	3.38	0.11		
	PO ₄ ³⁻ measured	mg/L	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00		
	NO ₃ ⁻ addition	mg/L	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
	PO ₄ ³⁻ addition	mg/L	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
	Final molar N:P ratio	mol mol⁻¹	938.51	0.00	697.18	0.00	893.82	0.00	910.16	0.00	817.20	0.00	739.86	56.18	832.79	0.00

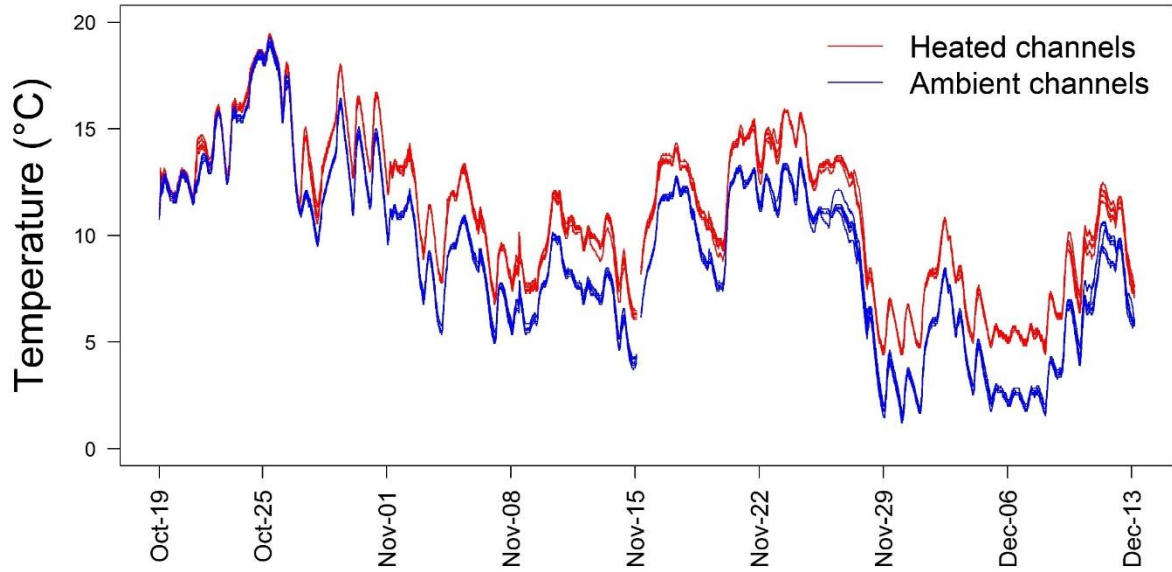


Figure S3.1 Water temperature variations in the experimental channels during the 56 days of experiment. Each line represent the temperature recorded in each channel ($^{\circ}\text{C}$), red lines represent heated channels and blue lines ambient channels.

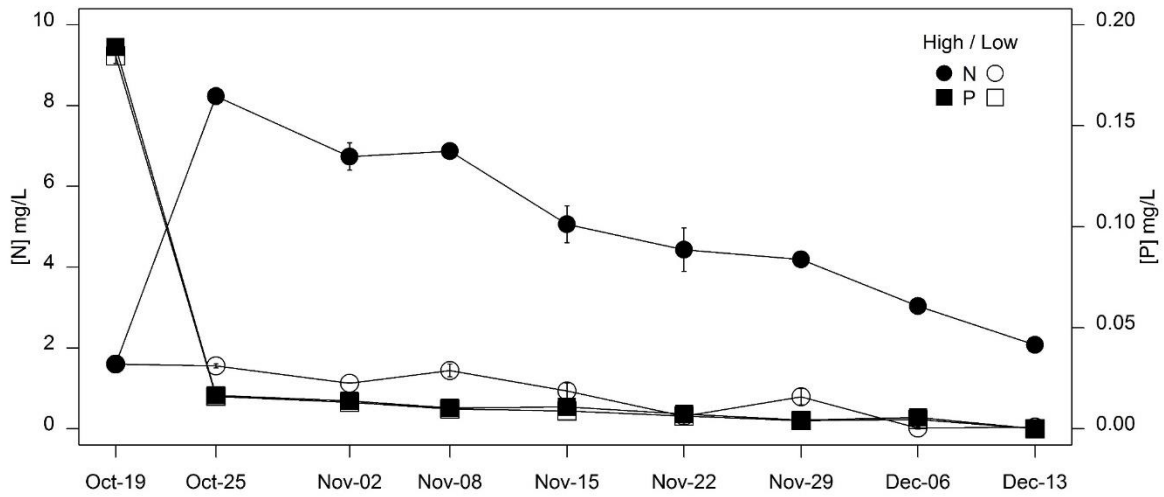


Figure S3.2 Mean NO_3^- and PO_4^{3-} concentrations variations in the experimental channels across the 56 days of experiment. Solid circles and squares represent NO_3^- and PO_4^{3-} concentrations (mg L^{-1}) in high nutrients channels, whereas hollow circles and squares represent NO_3^- and PO_4^{3-} concentrations (mg L^{-1}) in low nutrient channels. Error bars represent SE.

DISCUSSION

A. LES PROCESSUS FONCTIONNELS DES ECOSYSTEMES AQUATIQUES FACE AUX FLUCTUATIONS DES CONTRAINTES ABIOTIQUES

A.1. La décomposition microbienne (*in natura* et en mésocosmes)

Au cours de cette thèse, les différentes études effectuées n'ont permis de mettre en évidence qu'un effet modéré de la température et des nutriments sur le processus de décomposition.

(i) Température

Les expériences de décomposition microbienne réalisées n'ont pas révélé d'effet de la température, ni *in natura*, ni en mésocosmes, quelle que soit la saison (printemps ou hiver) ou l'essence étudiée (aulne, hêtre, noisetier). Cette absence de lien entre température et décomposition microbienne observée dans nos expérimentations contraste avec les conceptions actuelles des effets de la température sur l'activité métabolique des organismes (Brown et al. 2004). En effet, la théorie métabolique de l'écologie permet de prévoir explicitement la contribution des écosystèmes aux cycles biogéochimiques, et fait le lien entre la température corporelle des organismes et leurs demandes énergétiques. Appliquée aux cours d'eau de tête de bassin, cette théorie prévoit donc que l'augmentation de la température devrait se traduire par un accroissement de la consommation des litières par les décomposeurs (et donc accélérer la décomposition). Elle est notamment étayée par les résultats de nombreuses études sur la décomposition réalisées *in situ* ou en microcosmes (Fenoy et al. 2016; Fernandes et al. 2014; Ferreira and Chauvet 2011a, 2011b). Reprise par de nombreux travaux en écologie, cette théorie rencontre cependant des limites et est actuellement sujette à controverse au sein de la communauté scientifique. Cependant, nos résultats concordent avec ceux issus de deux études de Ferreira & Canhoto (2014, 2015), qui n'ont pas révélé d'influence significative de la température sur les taux de

décomposition microbienne mesurés au printemps dans un cours d'eau échauffé à des températures similaires à celles mesurées dans nos expérimentations.

(ii) Nutriments et effets interactifs avec la température

En mésocosmes, nous **avons également voulu tester l'hypothèse selon laquelle** la disponibilité en nutriments pouvait impacter les taux de décomposition, en particulier dans un contexte de réchauffement climatique. Nos résultats divergent cependant de cette hypothèse, soutenue par les résultats de plusieurs études **précédentes. En effet, nous n'avons pas mesuré de différence significative entre les taux** de décomposition microbienne des mésocosmes exposés à différents ratios en nutriments, contrairement à plusieurs études qui observent une augmentation des **taux de décomposition avec l'augmentation des nutriments, et en particulier de l'azote** (Fernandes et al. 2014 en microcosmes, Ferreira et al. 2006 dans une étude manipulative et Noel et al. 2016 sur le terrain). Par ailleurs, **d'autres études en mésocosmes montrent également que l'interaction entre température et nutriments** peuvent affecter la décomposition microbienne (Moghadam & Zimmer 2016). En microcosmes, Ferreira & Chauvet (2011b) ont pu démontrer que ces deux facteurs peuvent également avoir un effet synergique sur la décomposition microbienne de **l'aulne. Notre étude en mésocosmes concernant la décomposition des litières de noisetier, pourtant proche de l'aulne en terme de qualité (lignine, nutriments),** contraste avec ces **résultats puisqu'aucun effet de l'interaction entre température et nutriments n'a pu être montré sur les taux de décomposition. En revanche, les résultats** de travaux récents de transplantation croisée réalisés sur le terrain concordent avec nos résultats, et soulignent que les réponses fonctionnelles des décomposeurs dépendent fortement de la composition des communautés (Pérez et al. 2018).

A.2. La décomposition totale (mésocosmes)

(i) Température

En mésocosmes, nous avons observé une corrélation positive entre la température et la décomposition totale, à laquelle participent micro-organismes et macro-invertébrés.

Dans cette étude, la décomposition microbienne n'ayant pas été accélérée par l'augmentation de la température, ce résultat implique donc que l'augmentation de la décomposition totale avec la température est principalement liée à une augmentation de la consommation des litières par les macro-invertébrés. Dans la littérature existante, les résultats concernant les effets potentiels de l'augmentation de la température sur la décomposition totale montrent des résultats divergents. Nos résultats concordent avec ceux observés par Ferreira et al. (2014b) dans un cours d'eau échauffé et qui montrent une accélération de la décomposition totale des litières de chêne avec l'augmentation de la température via une augmentation de l'activité individuelle des macro-invertébrés. A l'inverse, les résultats d'une expérimentation menée à l'échelle mondiale selon un gradient latitudinal de température montrent que le réchauffement aurait plutôt tendance à accélérer la décomposition microbienne des litières d'aulne et à produire une baisse équivalente des taux de décomposition médiés par les détritivores (Boyero et al. 2011). Enfin, la méta-analyse réalisée par Follstad-Shah et al. (2017), et basée spécifiquement sur des études réalisées sur le terrain contredisent ces résultats, en montrant qu'à l'échelle mondiale, l'augmentation de la température devrait entraîner une augmentation similaire des taux de décomposition microbienne et totale.

(ii) Nutriments et effets interactifs avec la température

Les deux niveaux de nutriments (sous forme de ratios N:P) que nous avons testés dans l'expérience réalisée en mésocosmes n'ont pas entraîné de différences significatives sur les taux de décomposition. Nos résultats concordent avec la méta-analyse réalisée par Ferreira et al. (2014a) qui indique que l'effet de l'enrichissement en nutriments est plus important pour les litières de faible qualité (chêne, hêtre, ...), et moins pour les litières riches telles que l'aulne, auquel le noisetier se rapproche en terme de qualité. Par ailleurs, aucun effet interactif des nutriments avec la température n'a pu être montré dans notre étude en mésocosmes. Pourtant, plusieurs études réalisées en mésocosmes mettent en avant un effet de ces deux contraintes sur la décomposition totale, bien qu'elles soient fortement dépendantes du contexte biotique. Ainsi par exemple, Greig et al. (2012) observent une augmentation de la décomposition des litières d'érable avec la température et avec les nutriments (en présence de prédateurs) mais pas d'effet interactif (température et nutriments couplés), tandis que

Moghadam & Zimmer (2016) **montrent que la présence d'invertébrés déchiqueteurs** peut exacerber les effets synergiques de la température et des nutriments sur la décomposition des litières de bouleau.

A.3. Interactions des décomposeurs avec le biofilm phototrophe

(i) Micro-organismes : nature des interactions et qualité des litières

In natura, nos résultats montrent une différence significative entre les taux de décomposition observés au printemps et en hiver pour les deux essences étudiées (aulne et hêtre). Cependant, ces résultats sont opposés pour les deux essences : tandis que la décomposition **microbienne de l'aulne est plus importante au printemps qu'en hiver, la décomposition microbienne du hêtre est plus importante en hiver qu'au printemps**. Par ailleurs, la saison semble également avoir un effet sur le biofilm du **cours d'eau, puisque la production de chlorophylle-*a* est bien plus importante au printemps qu'en hiver. Ainsi, une plus forte production chlorophyllienne du biofilm au printemps concorde avec une décomposition plus rapide de l'aulne, et une décomposition plus lente du hêtre**. Ces résultats pourraient indiquer une interaction entre les décomposeurs microbiens hétérotrophes et les organismes autotrophes du **biofilm, dont la nature (compétition vs. mutualisme) dépendrait de l'essence étudiée**.

En effet, au printemps, la corrélation positive entre concentration en chlorophylle-*a* du **biofilm et décomposition des litières d'aulne** (une essence riche en azote) pourrait indiquer une interaction positive entre les micro-organismes décomposeurs et les autotrophes du biofilm, sous forme de mutualisme (*priming effect* ; Danger et al. 2013 ; Kuehn et al. 2014 ; Halvorson et al. 2018). En hiver, la production de biofilm **étant beaucoup plus faible, l'absence de ce mutualisme pourrait expliquer que les taux de décomposition observés étaient également plus faibles qu'au printemps. Ainsi, à condition que l'intensité lumineuse soit favorable à l'installation du biofilm, la réalisation conjointe du métabolisme de ces deux compartiments, pourrait mener à une accélération de la décomposition des litières d'aulne**.

Au contraire, la décomposition microbienne des litières de hêtre, essence récalcitrante (et pauvre en azote), **était plus importante en hiver qu'au printemps. Dans ce cas, il semble qu'un autre type d'interaction se soit mise en place entre les micro-organismes**

décomposeurs et les autotrophes du biofilm, qui doivent alors **puiser l'azote dans l'eau** pour se développer. Ainsi, il est probable que ces derniers, présents en plus grande quantité au printemps, soient entrés en compétition avec les décomposeurs, ce qui a pu impacter la décomposition microbienne du hêtre. Dans un système oligotrophe, la dualité de cette interaction est sans doute liée à la qualité des litières : lorsque les nutriments sont présents en quantités suffisantes (comme dans les litières **d'aulne**), **un mutualisme pourrait s'exprimer; en revanche, lorsque les litières sont pauvres en nutriments** (comme celles du hêtre), les interactions de compétition domineraient.

Notre étude en mésocosmes ne nous a pas permis de mettre en évidence de telles interactions. Plusieurs raisons peuvent expliquer cela : en premier lieu, elle a été effectuée en hiver, avec une essence riche en nutriments (noisetier). **Les décomposeurs, dans les conditions de l'expérience, ont peut-être trouvé les nutriments nécessaires à leur métabolisme dans les feuilles, ce qui a pu les rendre indépendants des nutriments présents dans l'eau. Bien que du biofilm se soit développé dans les canaux au cours de l'expérimentation, il est donc possible que les conditions lumineuses n'aient pas été suffisantes pour permettre des interactions mutualistes.** Deuxièmement, la production de biofilm était sensiblement la même dans les canaux expérimentaux soumis aux différents traitements : **dans un contexte d'ensoleillement similaire, elle n'a pas été favorisée ni par la température, ni par l'ajout de nutriments.** Ainsi, si une interaction (de type mutualisme ou de compétition) entre décomposeurs microbiens et autotrophes du biofilm a eu lieu, celle-ci devait être relativement similaire dans les **différents canaux expérimentaux. Cela pourrait expliquer l'absence de différences significatives entre les taux de décomposition microbiens observés dans les canaux soumis aux différents traitements.**

(ii) Les déchiqueteurs, consommateurs de biofilm ?

Les résultats de notre étude en mésocosmes montrent une réduction de la **concentration en pigments des biofilms en présence d'invertébrés. Les organismes autotrophes du biofilm, riches en acides gras polyinsaturés des cours d'eau** (Ziegler & Lyon 2010), ont pu être consommés par les gammares (déchiqueteurs), qui étaient les macro-invertébrés les plus abondants dans les canaux expérimentaux. En effet, plusieurs études ont établi des liens entre déchiqueteurs (aselles, gammares), décomposition des litières et facteurs environnementaux (luminosité, nutriments) et

proposent que les algues peuvent être d'importantes composantes de la valeur nutritionnelle des biofilms pour ces invertébrés (Franken et al. 2005; Albariño et al. 2008). Dans notre étude en mésocosmes, nous n'avons pas observé d'influence significative des nutriments sur la consommation des litières par les macro-invertébrés, ni sur leur relative herbivorie (concentrations en pigments en présence **versus en absence d'invertébrés**). L'**augmentation de la température** a stimulé la décomposition totale (assurée par les micro-organismes et les macro-invertébrés) des feuilles et la croissance des gammares mais **n'a pas eu d'effet visible sur l'herbivorie**.

Dans les mésocosmes, l'ajout de nutriments s'est traduit par une **augmentation de la proportion relative d'un acide gras essentiel, l'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5 ω 3)** présent dans les algues photosynthétiques du biofilm. Ce résultat concorde avec ceux de Guschina & Harwood (2006), qui ont montré que la limitation en nutriments devrait entraîner une diminution de la qualité des algues, en réduisant la **proportion d'acides gras polyinsaturés qu'elles contiennent**. En revanche, l'**augmentation de la qualité du biofilm (via une plus forte proportion d'EPA) dans les canaux supplémentés avec un ratio N:P fort (100, molaire) ne s'est pas traduit par une plus forte augmentation de la taille des gammares dans ces canaux**. La taille des **gammares à la fin de l'expérimentation était plus élevée** dans les canaux échauffés, mais ce résultat a été observé à la fois dans les canaux recevant un apport faible et un **apport plus important en nutriments**. Ce manque d'effet de l'ajout de nutriments sur la taille des gammares est en contradiction avec l'étude de Guo et al. (2016), qui ont montré à la fois une **augmentation de la proportion d'acides gras insaturés (ω 3) et de la taille d'un trichoptère déchiqueteur, *Anisocentropus bicoloratus***. Ainsi, bien qu'une interaction entre invertébrés et autotrophes du biofilm ait certainement eu lieu dans les mésocosmes, la teneur en acides gras polyinsaturés du biofilm ne semble pas avoir influencé la croissance des déchiqueteurs. Il est donc possible que cette interaction ne soit donc pas uniquement trophique (pression **d'herbivorie**). **La diminution de la concentration en pigments du biofilm en présence d'invertébrés, observée dans tous les canaux, qui témoigne d'une pression des macro-invertébrés sur la croissance du biofilm, pourrait être liée à d'autres facteurs, et notamment à la turbulence du milieu occasionnée par les mouvements des invertébrés**.

Ces divergences dans les différents résultats de la littérature montrent que les effets **de l'augmentation de température et de la concentration en nutriments** sur le processus fonctionnel de décomposition ne sont pas simples à appréhender et que **d'autres facteurs biotiques et/ou abiotiques devraient être considérés. Dans ce cadre,** nous pouvons nous interroger sur la pertinence des protocoles expérimentaux, notamment en ce qui concerne les gammes de température et/ou de concentration en nutriments testées mais également les choix en terme de diversité biologique des systèmes, en particulier des systèmes artificiels.

B. FACTEURS POTENTIELS A L'ORIGINE DES DIVERGENCES DE RESULTATS

Dans le but d'étudier les contraintes liées aux changements globaux, telles que la température et les nutriments, plusieurs types d'approche peuvent être mises en place. Généralement, on distingue les études menées sur le terrain, qui tirent profit de la diversité des milieux naturels et de leurs caractéristiques propres, des études en milieux artificiels, qui permettent de contrôler un plus grand nombre de paramètres, à la fois abiotiques et biotiques (**microcosmes, mésocosmes**), **mais qui s'écartent des conditions naturelles.**

B.1. Contrôle des contraintes de température et de disponibilité en nutriments en milieu naturel

(i) Utilisation de gradients

Classiquement, une manière d'évaluer les effets de la température sur le fonctionnement des écosystèmes, et notamment sur la décomposition des litières dans les cours d'eau, consiste à utiliser des gradients naturels de température engendrés par les variations latitudinales ou altitudinales des sites d'études. Dans ce cadre, les sites

sont sélectionnés selon des positions géographiques distantes (latitude, altitude), mais **présentant des caractéristiques similaires (pente, largeur, débit) pour tenter d'isoler et de déterminer l'effet de** la température sur le processus de décomposition (Martínez et al. 2014; Irons et al. 1994; Boyero et al. 2016).

De la même manière, la sélection des sites d'études peut également se faire selon un gradient naturel de concentration en nutriments. Généralement, les nutriments (N, P) **augmentent d'amont en aval en fonction de l'ordre de** Strahler, qui peut être utilisé pour établir ce gradient. Il est également possible de recréer ce gradient en **sélectionnant des cours d'eau de même ordre, dont les caractéristiques sont** semblables, mais différant de par leur concentration moyenne annuelle en nutriments. **Ces cours d'eau peuvent alors être situés dans un ou plusieurs bassins** versant, une ou plusieurs régions, ou encore à plus grande échelle (par exemple mondiale).

Cependant, l'utilisation de cours d'eau différents pose certains problèmes. Souvent **éloignés, les cours d'eau choisis le long de ces gradients (latitudinaux, longitudinaux,** en nutriments) peuvent présenter des caractéristiques **bien différentes, qu'elles soient** biotiques (communautés biologiques) ou abiotiques : géologiques (roches **sédimentaires ou cristallines, carbonatées ou peu minéralisées,...**), hydro-morphologiques (forte vs faible diversité de substrats), des conditions climatiques (**luminosité, précipitations,...**) et des environnements immédiats (ripisylve). Ces différences peuvent alors engendrer des difficultés pour comparer la décomposition de **litières d'essences différentes, ou pour trouver une essence commune à tous ces cours d'eau.** Par ailleurs, la structure des communautés (hyphomycètes aquatiques et macro-invertébrés) peut substantiellement varier en fonction des caractéristiques des cours **d'eau (morphologie, chimie, contexte climatique,...), mais également en fonction de la** saison à laquelle les études sont menées [Encadré 1 ; Annexe 1]. Enfin, les **interactions entre les décomposeurs et d'autres organismes (non impliqués dans la** décomposition) ne sont que rarement prises en compte dans ces expérimentations.

Utiliser les variations saisonnières pour évaluer les effets de la température sur le fonctionnement des écosystèmes *in situ*

Dans le cadre de l'ANR *FunctionalStreams*, j'ai participé à une expérimentation sur le terrain selon un gradient latitudinal de température dirigée par Jérémy Jabiol. Dans cette étude, nous avons mesuré le processus de décomposition des litières au **cours des 4 saisons (printemps, été, automne, hiver) dans 12 cours d'eau de tête de bassin versant** (6 en Montagne Noire et 6 dans les Vosges). Ainsi, des sacs (à mailles grossières et fines) contenant des feuilles de noisetier, une essence présente dans les deux régions, nous ont permis de déterminer les taux de décomposition microbienne, médiée par les macro-invertébrés et totale. Les communautés de décomposeurs (champignons aquatiques et détritivores invertébrés) ont également été décrites dans chaque cours d'eau et pour chaque saison. Nous avons testé l'hypothèse selon laquelle la température pourrait être le principal facteur des variations saisonnières des taux de décomposition, et que ces variations saisonnières pourraient donc constituer une bonne alternative aux gradients latitudinaux et aux études manipulatives pour évaluer les effets de la température sur les processus de décomposition dans un contexte naturel. Alternativement, cette approche étant dépendante de la phénologie des organismes, elle pourrait entraîner une variabilité saisonnière de la décomposition qui ne serait pas expliquée par la température. Cependant, en raison de la redondance fonctionnelle généralement élevée des espèces microbiennes, dont les variations de **composition et de structure ont peu d'impact sur la décomposition, les effets de la température sur la décomposition microbienne devraient refléter des changements au niveau métabolique, indépendamment des variations de communautés.** Au contraire, **les effets de la température sur les communautés d'invertébrés devraient se répercuter** sur les taux de décomposition au travers les changements de composition des communautés.

Les résultats de cette étude montrent des effets positifs de la température sur la décomposition totale (k_c). Cependant, ces effets étaient principalement dus à une augmentation de la décomposition microbienne (k_f ; 0,54 eV) ; **la température n'ayant** impacté la décomposition médiée par les invertébrés que dans une moindre mesure (k_{inv} ; 0,33 eV, non significative). De plus, nos analyses ont révélé des variations significatives des taux de décomposition entre les saisons (k_c , k_f et k_{inv}), entre les régions (k_c et k_{inv}), **et entre les cours d'eau (k_f)** qui étaient indépendantes de la température.

Enfin, les communautés de décomposeurs (densité, diversité, composition des espèces) ont montré d'importantes variations saisonnières. Cependant, les variations saisonnières des communautés de macro-invertébrés n'ont jamais dépassé les variations d'un cours d'eau à l'autre. De plus, parmi les changements saisonniers observés dans les communautés de décomposeurs, certains n'étaient pas liés de façon monotone à la température. Par exemple, la densité des conidies et des détritivores était élevée en automne (malgré la température froide) et faible au printemps (malgré la température chaude), ce qui est certainement dû à la synchronie de la dynamique des populations avec la disponibilité de litière dans les cours d'eau.

Considérés dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que les variations saisonnières de température sont un outil puissant pour étudier les effets de la température sur les processus des écosystèmes, malgré les variations phénologiques saisonnières qui agissent sur les ressources et les consommateurs. Cette approche permet d'utiliser de larges gradients de température dans des contextes naturels et réalistes, qui peuvent de surcroît être reproduits dans autant de systèmes que nécessaire. De plus, la répétition saisonnière des expériences en un seul site minimise les variations de nombreux autres facteurs potentiellement confondants, tels que l'hydromorphologie des cours d'eau, la chimie de l'eau (sous réserve qu'elle soit relativement constante dans le temps), le contexte à l'échelle du bassin versant, qui surviennent lorsqu'on étudie les gradients spatiaux à grande échelle. Même les variations des communautés de macro-invertébrés, qui peuvent être élevées d'une saison à l'autre, se sont révélées beaucoup plus faibles que les variations mesurées entre les cours d'eau situés dans la même région, mais aussi que celles mesurées entre des zones biogéographiques éloignées.

Ces résultats, ainsi que leur cohérence générale avec les données existantes, appuient fortement l'utilisation des gradients de température saisonniers comme substitut des variations de température à long terme (décennies) pour étudier les effets du réchauffement planétaire sur les processus des écosystèmes.

Cette étude fera l'objet de publications prochainement, un article est en préparation (Annexe 1).

(ii) Le cas particulier des sources tempérées

Plus récemment, l'utilisation de gradients de température naturellement engendrés par des sources chaudes ou tempérées a été suggérée pour étudier les déterminants thermiques de la décomposition (Woodward et al. 2010 ; O'Gorman et al. 2014). **En effet, les sources chaudes ont l'avantage** –par rapport aux gradients latitudinaux ou altitudinaux de température– de présenter un fort gradient thermique sur de courtes distances ou sur des sites peu éloignés, diminuant ainsi les effets de **l'hétérogénéité naturelle des habitats (luminosité, précipitations, essences d'arbres)** sur les taux de décomposition. Cependant, les résultats de cette thèse démontrent que les sources chaudes présentent également des inconvénients qui leur sont propres.

Premièrement, l'étendue du gradient, définie comme la différence entre la température la plus élevée et la température la plus faible, peut être dépendante de la longueur du cours d'eau exploitable, et de la saison (Fig. 6). En effet, bien que la température soit **constante au niveau de la source (partie amont du cours d'eau) tout au long de l'année,** nos résultats soulignent **la difficulté d'étudier le gradient thermique associé dont l'étendue varie spatialement (en aval) en fonction de la température de l'air, et donc des saisons.** Ainsi, dans notre étude, l'étendue du gradient de températures observée au printemps (1°C) était bien inférieure à celle observée en hiver (5°C). L'étendue du gradient observé au printemps, bien que correspondant à une élévation actuelle réaliste des températures, était peut-être trop faible pour permettre de déceler des différences dans les taux de décompositions mesurés aux différentes stations (Fig. 6, en bas à gauche).

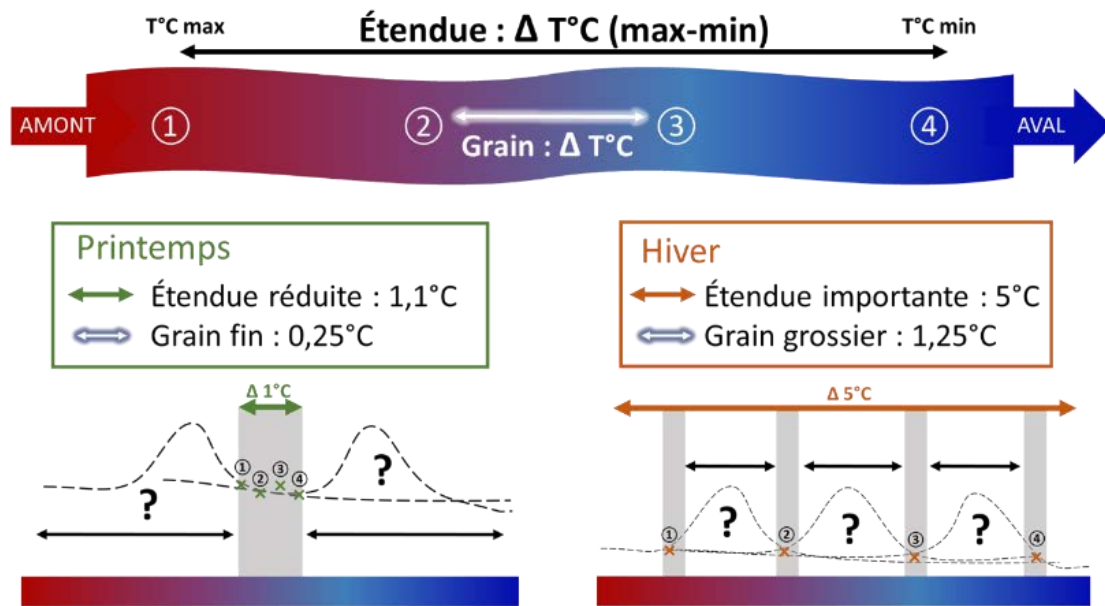


Figure 6. Représentation schématique des paramètres du gradient de température (étendue, grain) de nos études *in natura* réalisées au printemps et en hiver (en haut) et exemples de résultats obtenus pour chacune des saisons (en bas).

Deuxièmement, le grain du gradient, déterminé par la différence moyenne de température entre deux stations consécutives, est fonction de l'étendue du gradient et donc de la longueur du cours d'eau exploitable et de la saison (Fig. 6). Cette grandeur varie en fonction de la température de l'air et donc de la saison. Dans notre étude, seulement quatre stations (semblables en terme de pente, largeur du cours d'eau et hauteur d'eau) ont pu être installées le long du cours d'eau (en raison de sa longueur avant confluence). Dans le but de s'affranchir d'un biais lié à leur localisation, ces stations ont été conservées pour les expérimentations au printemps et en hiver. En conséquence, l'étendue du gradient, plus importante en hiver qu'au printemps, ainsi que la conservation des stations à des points fixes sur le cours d'eau, ont contribué à un changement dans la taille du grain : celui-ci s'est également élargi entre le printemps (étendue / nombre de station = $1^{\circ}\text{C} / 4 = 0,25^{\circ}\text{C}$) et l'hiver (étendue / nombre de station = $5^{\circ}\text{C} / 4 = 1,25^{\circ}\text{C}$). En hiver, la résolution faible de nos observations, liée au grain plus grossier du gradient, nous a peut-être conduit à conclure à une absence d'effet de la température sur la décomposition microbienne tandis que cet effet aurait potentiellement pu se produire de manière non linéaire (e.g.

relation unimodale) dans les intervalles de température entre les stations (Fig. 6, en bas à droite).

Troisièmement, les sources géothermales présentent souvent des caractéristiques physico-chimiques très particulières (chimie de l'eau, radioactivité) liées au contact de l'eau avec les roches chaudes profondes, augmentant alors la difficulté de dupliquer les sites d'études et d'extrapoler les résultats obtenus à d'autres systèmes dulçaquicoles. Il est important de signaler que dans la plupart des zones volcaniques, les sources ne peuvent être mises à profit pour l'étude des effets de la température sur les cours d'eau en raison de leur chimie particulière (eaux sulfurées). En revanche, les sources tempérées ou tièdes, se trouvent le plus souvent en dehors des zones volcaniques. Trois sources de ce type ont été recensées dans les Vosges, chacune avec des caractéristiques propres. Dans cette thèse, c'est la source de Chaudefontaine, la plus facile d'accès et la plus large des trois, qui a été sélectionnée pour mener cette première étude. D'après les rapports du BRGM, la source thermale de Chaudefontaine existe et est reconnue depuis de nombreuses années. En 1909, les mesures effectuées indiquaient une température de 22,9°C. Actuellement, elle sort de terre à une température de 21°C, et est constante depuis plusieurs décennies (1978).

Enfin, les communautés présentes dans ces petits écosystèmes ont certainement une histoire évolutive particulière, c'est pourquoi nous n'avons pas souhaité effectuer de prélèvements d'invertébrés ni d'étudier la décomposition totale afin de ne pas altérer/appauvrir les communautés d'invertébrés en place. Cependant, l'analyse de la structure des communautés d'hyphomycètes aquatiques a révélé la dominance d'une espèce généralement présente dans les milieux tropicaux ou dans les assemblages d'été sous nos latitudes (*Lunulospora curvula*). Les espèces présentes dans cette source, depuis longtemps en activité, ce sont certainement adaptées à ces conditions « chaudes » et ne sont donc peut-être pas représentatives des conséquences que pourrait avoir un réchauffement plus rapide comme le réchauffement climatique.

(iii) Manipulation *in situ*

En milieu naturel, un autre type d'étude peut être menée : les expérimentations manipulatives. Il s'agit de modifier les caractéristiques (température, nutriments) d'un milieu naturel, en lui imposant un réchauffement et/ou un apport de nutriments. Ce

type d'approche peut être mené à différentes échelles. La modification du cours d'eau peut être effectuée au niveau d'un tronçon du cours d'eau, dans des canaux de dérivation parallèles au cours d'eau ou encore plus localement, au niveau des sites d'études (sacs à litières contenant des diffuseurs). Ces modifications, en particulier celles au niveau de tronçons (telles que les expérimentations réalisées au Portugal par Canhoto et al.), permettent une exposition aux contraintes plus uniforme et continue que les deux autres approches (Ferreira et al. 2014a).

Elles présentent ainsi l'avantage d'une approche intégrative, permettant d'évaluer, à plusieurs niveaux d'organisation biologique, la réponse du système à divers facteurs de stress (Canhoto et al. 2013). Cependant, ces approches comportent également des inconvénients. Elles demandent notamment des moyens techniques et financiers importants, du matériel adapté parfois difficile à installer au niveau de cours d'eau difficiles d'accès, et des autorisations de la part des gestionnaires ou propriétaires des lieux. Par ailleurs, la modification de ces cours d'eau, comme la séparation longitudinale du lit du cours d'eau ou la dérivation d'eau vers des canaux parallèles peut entraîner des réponses inhabituelles au niveau du tronçon entier, et nécessite de prendre en compte le temps d'adaptation des organismes et de colonisation ou de recolonisation des différentes parties du cours d'eau modifié. Enfin, de telles études peuvent avoir des répercussions à plus ou moins long-terme sur l'écosystème, son fonctionnement et la biodiversité qu'il abrite. Néanmoins, de par ce compromis entre conditions naturelles et contrôle des contraintes, ce type d'approche génère potentiellement des résultats plus réalistes que les études très simplifiées en microcosmes ou en mésocosmes pour l'évaluation des effets de la température et/ou des nutriments sur les communautés locale, et permettent d'identifier des stratégies efficaces pour la conservation et la gestion des milieux.

Pour conclure, si l'utilisation de systèmes naturels via différentes approches (gradients altitudinaux, latitudinaux, sources chaudes ou tempérées, manipulations *in situ*) permet d'apporter une vision plus réaliste des effets des changements globaux sur le processus de décomposition des litières, ceux-ci sont souvent très compliqués à extriquer des effets multiples d'autres contraintes naturelles. Les études en milieux

artificiels, dans lesquels les facteurs biotiques et abiotiques sont mieux contrôlés, semblent donc nécessaires pour affiner notre compréhension des effets des contraintes propres aux changements globaux, telles que la température ou la concentration en nutriments sur ce processus fonctionnel.

B.2. Contrôle des contraintes de température et de disponibilité en nutriments en milieu artificiel

Les approches développées dans des conditions simplifiées (mésocosmes), voire très simplifiées (microcosmes), **s'affranchissent des biais liés à l'utilisation de systèmes différents et à l'influence de d'autres facteurs environnementaux que ceux ciblés par les études.** Elles permettent ainsi de mieux maîtriser les contraintes de température et les concentrations en **nutriments et d'affiner notre compréhension des liens entre ces contraintes et le processus de décomposition des litières.** Enfin, elles laissent aussi la **liberté à l'expérimentateur de choisir les caractéristiques des compartiments biotiques** (identité et **nombre d'espèces, d'individus** ; communautés, interactions). Toutefois, les **résultats observés, bien qu'informatifs et intéressants, ne peuvent être facilement extrapolés à des situations réelles.**

(i) Réglages de la température

Les milieux artificiels, mésocosmes et microcosmes, peuvent être soumis à des températures soit constantes, soit changeantes. Ces changements peuvent être ponctuels (augmentation ou diminution de la température moyenne), cycliques (par exemple diurnal) ou **oscillatoires (autour d'une température moyenne).** **Ces choix sont déterminants pour la prise en compte de l'effet de la température sur les réponses observées, et la complexité à les prendre en compte dépend de l'importance des variations de température imposées.**

Dans notre étude en mésocosmes, deux niveaux de température ont été choisis : six canaux à température ambiante et six canaux échauffés à +2°C en moyenne par rapport **aux canaux ambiants.** **Ces canaux étant situés à l'extérieur du laboratoire (mais couverts par un toit),** la température des canaux ambiants et échauffés était donc soumise aux variations journalières et saisonnières naturelles. Cette prise en compte

des variations naturelles de température présente l'avantage de reproduire de manière plus réaliste les variations de température que peuvent subir les écosystèmes. Cependant, contrairement à une température constante, cette méthode incorpore également l'amplitude (température maximum-minimum) ainsi que le sens de ces variations (refroidissement ou réchauffement d'un jour sur l'autre). Dans ce cas, l'utilisation de la moyenne des températures mesurées dans les canaux peut être incomplète pour décrire l'effet de la température sur les réponses observées. Durant les 56 jours d'expérimentation, la température des canaux non chauffés était de 9°C et celle des canaux échauffés d'environ 11°C. Les températures minimales et maximales observées (de 1°C à 19°C, quel que soit le traitement) témoignent de fluctuations plus importantes. Cette variation importante, en comparaison avec les variations observées dans les cours d'eau de tête de bassin versant environnants, peut avoir eu des effets importants sur les organismes qui ne sont pas pris en compte avec l'utilisation de la moyenne comme seule variable descriptive. Il conviendrait d'ailleurs de s'interroger non pas sur les effets d'une augmentation moyenne de la température mais sur les effets de températures extrêmes (minimales et/ou maximales). Par exemple, quels seraient les effets d'une augmentation estivale importante de la température (eau à 20°C durant plusieurs jours) sur le fonctionnement de cours d'eau dont la température de l'eau est en moyenne plutôt entre 8°C et 10°C annuellement ? Si de tels événements semblent de plus en plus récurrents, ils risquent d'affecter de nombreux cours d'eau. Par ailleurs, notre étude ayant eu lieu entre octobre et décembre, la température de l'air (et donc de l'eau des canaux) a diminué au cours de l'expérimentation. Dans le cadre de l'étude de la décomposition, qui est un processus dynamique, les taux de décomposition microbienne mesurés à différentes dates (21, 35 et 52 jours) ainsi que la structure des communautés associées peuvent avoir été influencés par les variations naturelles de la température.

(ii) Manipulation des concentrations en nutriments

En milieux contrôlés (et surtout en circuit fermé), la concentration en nutriments peut, de la même manière que la température, être maîtrisée par des ajouts graduels, **punctuels ou cycliques d'un ou plusieurs nutriments (N, P, ...).** Cependant, contrairement à la température, **une partie des nutriments présents dans l'eau est prélevée par les organismes et incorporée à leur biomasse, tandis qu'une autre partie**

est excrétée, ou relarguée dans le milieu à leur mort. Ces variations dans la biodisponibilité des nutriments **présents dans l'eau ou dans les ressources rendent leur concentration plus difficile à maintenir (relativement) constante au cours du temps.** La prise en compte de ces flux demande donc de bien ajuster la fréquence des ajouts (goutte à goutte / ponctuel) afin de ne pas générer de limitation entre deux ajouts, mais également de prendre en compte les ajouts conjoints (par exemple, les ajouts de **potassium K lors de la supplémentation en P, généralement via l'ajout de KH_2PO_4 ou de K_2HPO_4**) afin de ne pas **générer de surdose d'autre éléments.** Enfin, **en particulier lors d'études sur les effets de la température et des nutriments, l'évaporation de l'eau** des systèmes (microcosmes et mésocosmes) peut également conduire à une augmentation des concentrations en ions **présents dans l'eau.**

Dans notre étude en mésocosmes, l'analyse des concentrations en ions, et les ajouts en nutriments (dont ils dépendaient) ont été effectués de manière hebdomadaire. Cette façon de procéder a permis de pouvoir ajuster les ajouts de nutriments aux **concentrations présentes dans l'eau de chaque canal expérimental, afin de combler les potentielles différences entre canaux d'un même traitement, mais également d'empêcher les dérives des concentrations voulues liées aux flux entre compartiments (eau, biofilm, litières, invertébrés).** Cependant, la fréquence de ces ajouts a peut-être été insuffisante pour générer des concentrations en nutriments constantes entre deux **ajouts. Par exemple, l'analyse des concentrations en nutriments a révélé une forte concentration initiale en P (0,187 mg/L en moyenne ; liée à l'eau de source utilisée pour remplir les canaux).** La semaine suivante, la concentration moyenne en P des canaux était 10 fois inférieure aux concentrations initiales (0,016 mg/L). Certaines semaines, les concentrations en P étaient même inférieures à la limite de détection des dosages. Ces observations témoignent du fait que les nutriments ont été très rapidement stockés par les organismes, et que cela a pu générer une limitation en P entre deux ajouts dans les canaux, quel que soit le traitement auquel ils étaient soumis. Enfin, les concentrations cibles des canaux étaient sous forme de ratios N:P (33 et 100), **impliquant que l'ajout de N dépendait de la concentration en P.** Cependant, la concentration en P diminuant, il est possible que les concentrations en nutriments aient été trop faibles (en particulier après quelques semaines) pour induire une différence de réponse des organismes (hyphomycètes aquatiques, micro-organismes du biofilm ou macro-invertébrés) entre les différents traitements.

Dans les milieux contrôlés, les effets des contraintes abiotiques dépendent donc **fortement des réglages (valeurs moyennes et variations) choisis par l'expérimentateur**, mais également des composants biotiques auxquels ces contraintes sont imposées.

B.3. Maîtrise des variables biotiques

Les études en laboratoire nécessitent de recréer des milieux artificiellement, et **donc d'y introduire des organismes vivants. Pour cela, il est possible de choisir des organismes issus de cultures ou d'élevages, comme par exemple des souches microbiennes isolées en laboratoire, ou encore de les prélever dans la nature. Cette première méthode permet de contrôler le nombre d'espèces et/ou d'individus** introduits, mais également de diminuer le nombre de facteurs environnementaux (par exemple, les polluants) auxquels les organismes sont exposés. Cependant, elle nécessite premièrement de disposer de ces cultures ou élevages. Même avec les techniques actuelles, **il n'est pas toujours possible d'élever ou de cultiver** tous les organismes en laboratoire. Ceci est particulièrement vrai pour les micro-organismes. Par ailleurs, les souches conservées en laboratoire peuvent perdre certaines de leurs capacités. Deuxièmement, elle mène obligatoirement à une simplification marquée de **la complexité des milieux en termes d'interactions biotiques (diversité, structure des communautés et des réseaux trophiques)**, ce qui entraîne une déviation par rapport **aux conditions naturelles présentes dans l'environnement**. A l'inverse, les études qui prélèvent des organismes *in situ* pour les introduire dans les milieux recréés en **laboratoire permettent de s'assurer de travailler avec des espèces et des assemblages** naturels mais simplifiés, plus représentatifs des communautés présentes dans l'environnement. Cette seconde méthode comporte néanmoins des inconvénients, **puisqu'elle nécessite une identification exhaustive des individus prélevés, en particulier lorsqu'ils sont introduits selon des critères précis (identité, nombre, taille, âge, sexe,...)**. De plus, les milieux dans lesquels ces organismes sont prélevés sont soumis à de multiples facteurs environnementaux, comme par exemple la présence des parasites ou de polluants, qui peuvent avoir impacté les individus et les communautés avant leur introduction dans les milieux artificiels contrôlés. Dans nos études en

milieux contrôlés, les organismes ont été prélevés dans des cours d'eau de référence, afin de diminuer les expositions possibles à divers contaminants.

Enfin, il **semble important de noter que ces prélèvements, lorsqu'ils sont importants (nombre d'individus) et/ou fréquents (échantillonnage répété au cours du temps),** peuvent avoir des conséquences négatives sur le maintien des populations et le fonctionnement des écosystèmes source. Au total, pour nos deux études en milieu contrôlés, cela représente 4.104 macro-invertébrés sacrifiés suite à nos **expérimentations, bien que le nombre d'organismes prélevés et morts au laboratoire ait été conséquemment plus important du fait du tri et de la sélection d'individus au cas par cas (espèce, taille).** Les micro-organismes (biofilm et hyphomycètes **aquatiques) ont également été prélevés dans des cours d'eau de référence,** puis introduits dans les milieux contrôlés en densités équivalentes.

Quel que soit le choix de la provenance des organismes, des réponses observées dans des milieux expérimentaux ne contenant **qu'un seul organisme (ou une seule espèce)** peuvent différer de celles observées dans des milieux dans lesquels plusieurs **organismes et/ou plusieurs espèces peuvent entrer en interaction. C'est notamment l'un des résultats majeurs d'une étude effectuée en microcosmes menée par Jérémy Jabiol, et à laquelle j'ai contribué (Encadré 2 ; Annexe 2).** Cette étude a donc permis de mettre en évidence que les réponses peuvent être très différentes en fonction des **processus, des individus, des espèces et des assemblages d'espèces étudiés. En particulier, les interactions entre individus d'espèces différentes peuvent modifier les réponses des processus auxquels ils participent, incrémentant ainsi la difficulté à anticiper les effets des variables abiotiques sur les écosystèmes naturels.**

Effets de la température et de la disponibilité en azote sur les réseaux trophiques **des cours d'eau** : variations entre processus, entre **organismes et entre niveaux d'organisation biologique**

L'objectif de cette étude était d'évaluer les effets simples et interactifs de la **température et de l'azote sur le métabolisme et la décomposition des litières** dans différents contextes de complexité trophique.

Cette étude s'est déroulée en deux parties : en premier lieu, une expérimentation de consommation des litières (dix disques de noisetier inoculés avec des décomposeurs microbiens) a été menée en microcosmes exposés à quatre niveaux de température (8 ; 10 ; **12 et 14°C**), **quatre niveaux d'azote** ([N]= 0,7 ; 1,4 ; 2,1 et 2,8 mg.L⁻¹) et trois scénarios de complexité trophique. La décomposition des disques a été mesurée : en **absence d'invertébrés (Scenario 1)** ; avec trois individus appartenant à une seule de ces trois espèces : *Gammarus* (Scenario 2a), *Potamophylax* (Scenario 2b) et *Sericostoma* (Scenario 2c) ; ou avec les trois espèces ensemble, représentées chacune par un individu de chaque espèce (Scenario 3).

En second lieu, la respiration des micro-organismes (3 des 10 disques) a été mesurée pour toutes **les combinaisons de température et d'azote, en absence de macro-invertébrés. Les 7 disques restants ont permis d'évaluer la biomasse fongique.** La respiration individuelle de chacun des macro-invertébrés a été mesurée pour chacune des conditions de température dans laquelle il a été préalablement acclimaté (en microcosme, pendant 48h) mais uniquement pour la condition de concentration la plus faible en azote (sans ajout ; 0,7 mgN.L⁻¹).

Les résultats montrent une augmentation exponentielle des processus microbiens de décomposition des litières et de respiration avec la température (modèle d'Arrhenius, énergie d'activation (E_a) = 0,56 et 1,00 eV pour la dégradation de la litière et la respiration, respectivement). La décomposition microbienne des litières était **légèrement plus élevée à des niveaux intermédiaires de disponibilité en azote qu'au niveau le plus faible tandis que la respiration n'a pas été influencée par les différentes concentrations en azote.** Les champignons aquatiques ont atteint une biomasse plus élevée et immobilisé plus d'azote à haute qu'à basse température. Cependant, tandis que la biomasse fongique semblait atteindre un plateau entre 10-**12°C**, **l'effet de la saturation en azote des litières sur la biomasse fongique était moins évident.**

Concernant la consommation des litières et la respiration des macro-invertébrés en condition mono-spécifique, des différences ont été observées entre les espèces et en fonction du processus étudié. De manière générale, les processus contrôlés par les invertébrés dans les différents scénarios (excepté la dégradation des litières par les *Sericostoma* ; Scénario 2c) ont augmenté avec la température (E_a = 0,47-1,15 eV) **jusqu'à une valeur maximale observée à température intermédiaire (11,5-15,8°C**, selon les espèces et les processus). Au-dessus de cette température, les vitesses des processus

ont diminué. La disponibilité en azote n'a pas eu d'effet significatif sur la consommation des litières par les invertébrés, sauf dans le scénario 2b (*Potamophylax*) pour lequel une consommation plus importante a été mesurée à des niveaux intermédiaires (1,4 et 2,1 mgN.L⁻¹).

Enfin, dans le scénario 3 (présence de 3 individus de différentes espèces), la température n'a pas influencé de façon significative la décomposition des litières. Celle-ci a cependant été influencée par la disponibilité en azote, avec un taux de décomposition des litières significativement plus élevé dans les traitements avec la plus forte disponibilité en azote (2,8 mgN.L⁻¹), en comparaison avec les traitements présentant la teneur en azote la plus faible (0,7 mgN.L⁻¹). Comparés à des taux de décomposition évalués à partir des scénarios mono-espèce (2a, 2b et 2c), ces résultats révèlent un potentiel effet négatif de l'association de ces 3 espèces sur les processus de décomposition. Ces effets négatifs ayant été observés à des niveaux élevés de température (12 et 14 °C) ainsi qu'à des niveaux de faible disponibilité en azote (0,7 mgN.L⁻¹), ils permettent de déceler un impact de ces deux paramètres (température et azote) sur les interactions biotiques.

En conclusion, un des résultats les plus marquants de cette étude est que la température avait le plus souvent un effet stimulant plus fort sur la respiration des décomposeurs que sur la décomposition des litières. Par ailleurs, les énergies d'activation calculées pour chaque processus différaient sensiblement d'une espèce à l'autre (scénarios 2a, 2b et 2c), et surtout d'un niveau d'organisation à l'autre (scénarios 1, 2 et 3).

Ces résultats soulèvent des questions sur la façon dont les décomposeurs répondent à leurs besoins énergétiques à haute température et suggèrent que le réchauffement climatique pourrait favoriser la transformation du carbone organique en CO₂ et accélérer ainsi la perte de carbone par les réseaux alimentaires des cours d'eau de tête de bassin versant. Nos résultats s'écartent des attentes fondées sur les relations universelles entre la température et le métabolisme individuel (théorie métabolique de l'écologie). Cela semble indiquer que ces relations sont plus complexes, et que l'intégration de cette complexité dans nos hypothèses est nécessaire pour prévoir les conséquences du réchauffement sur les processus des écosystèmes.

Cette étude fera l'objet d'une publication, un article a été soumis à FreshWater Biology (Annexe 2).

Dans notre étude en mésocosmes, nous avons reproduit une communauté naturelle très simplifiée mais fonctionnellement diversifiée, composée de micro-organismes (biofilm et hyphomycètes aquatiques ; en assemblages naturels) et de quatre espèces de macro-invertébrés (généralistes : *Gammarus fossarum*, détritivores : *Sericostoma personatum* et *Odontocerum albicorne*, râcleurs : *Epeorus sylvicola*). De plus, les 259 gammares introduits dans chaque canal expérimental ont été sélectionnés selon 3 classes de taille (4-6 mm, 6-8 mm, 10-12 mm), afin d'obtenir une distribution de taille représentative des populations naturelles. Cependant, **multiplier les espèces, les organismes et les compartiments complique l'analyse des réponses aux facteurs abiotiques**, puisque des interactions entre compartiments et communautés peuvent modifier les réponses des uns et des autres et entraîner des biais **dans l'analyse de l'influence de ces facteurs. Par exemple, si la température augmente la production de biofilm, mais que cette augmentation de température s'accompagne également d'une augmentation de la consommation du biofilm par les macro-invertébrés**, on peut alors se demander *comment mesurer la part d'augmentation de production de biofilm médiée par la température?* Dans notre étude en mésocosmes, la plupart de nos hypothèses sur les effets de la température et de la disponibilité en nutriments **n'a pas été validée**. Ces hypothèses étaient basées en grande partie sur des observations d'expériences en microcosmes. Ce constat en conditions semi-contrôlées suggère que la complexité des communautés biologiques pourrait grandement affecter la réponse des écosystèmes à de multiples facteurs de stress.

Enfin, les méthodes d'étude la biodiversité sont nombreuses, et font désormais de plus en plus appel aux outils **d'analyse moléculaire**. Ces outils présentent de nombreux avantages par rapport aux méthodes classiques, comme **l'identification des espèces et le comptage au microscope ou à l'œil nu**. Ces méthodes classiques sont souvent fastidieuses, demandant de solides connaissances en taxonomie, et peuvent entraîner **des erreurs d'identification, des surestimations ou des sous-estimations de la diversité**. Cependant, le développement des approches moléculaires **n'en est encore**

qu'à ses débuts, et il est important de confronter les résultats obtenus via les deux méthodes.

Notre étude menée dans la source tempérée de Chaudefontaine nous a permis **d'effectuer une comparaison** de ces deux approches (microscopique et moléculaire) pour **l'identification des espèces d'hyphomycètes aquatiques**. **En effet, la méthode la plus couramment utilisée est basée sur l'identification des spores (ou conidies), dont la morphologie observable au microscope est caractéristique d'une espèce d'hyphomycète aquatique**. Cette méthode se base sur deux principes fondamentaux : 1) les espèces présentes sur les litières sont capables de libérer des spores (sporulation) et 2) les conditions expérimentales sont favorables à la sporulation de toutes les espèces présentes. Cependant, les progrès réalisés **en terme d'analyses moléculaires (séquençage de l'ADN) pourraient permettre de s'affranchir de ces deux contraintes, et ainsi révéler la présence d'espèces non sporulantes, indétectables par la méthode microscopique**. Par ailleurs, ces analyses pourraient apporter des informations sur la colonisation des litières par d'autres taxons fongiques, n'appartenant pas au groupe des hyphomycètes aquatiques, et qui sont à l'heure actuelle encore peu connus. Ainsi, au cours de l'expérimentation conduite au printemps le long du gradient de température du ruisseau de Chaudefontaine, des disques de feuilles d'aulne ont été immergés et récupérés en même temps que les disques utilisés pour l'identification microscopique des espèces sporulantes. L'ADN fongique associé à ces disques a été extrait, amplifié par PCR, puis séquencé. Les résultats du séquençage ont permis la comparaison des espèces identifiées par les deux méthodes. Sur 18 espèces d'hyphomycètes identifiées par la méthode microscopique, **11 ont été également identifiées après séquençage** (Annexe 3, Table A3). Il est à noter que les fortes ressemblances morphologiques de plusieurs espèces d'un même genre ont pu entraîner des erreurs d'identification par la méthode microscopique (e.g. *Triscelophorus acuminatus* vs *monosporus*). Par ailleurs, il est possible que les amorces sélectionnées ne s'hybrident pas avec certains gènes fongiques, ainsi, certaines espèces n'ont pas été retrouvées au séquençage (e.g. *Goniopila monticola*, *Heliscella stellata*, *Heliscus lugdensis*). En revanche, la méthode moléculaire a permis d'identifier 8 espèces supplémentaires (pour un total de 20 espèces d'hyphomycètes), mais également de mettre en évidence la présence d'autres groupes fongiques sur les litières. Ces résultats mettent en évidence l'intérêt de ces deux méthodes et ouvrent des

perspectives de recherche sur le rôle des espèces fongiques ne faisant pas partie des hyphomycètes aquatiques mais qui pourraient être impliquées dans la dégradation de la matière.

Anticiper les effets des contraintes abiotiques imposées aux écosystèmes nécessite de prendre en compte leur complexité naturelle, en termes de variabilité et de biodiversité. Pour cela, la connaissance du fonctionnement et des liens entre les compartiments biotiques **doit être bien maîtrisée, à l'aide d'expériences en milieux contrôlés**. Cependant, ces facteurs biotiques peuvent également être affectés par **d'autres** facteurs environnementaux (que la température et les nutriments), et les résultats des expériences en microcosmes, qui permettent de comprendre certains **mécanismes, doivent être confrontés aux résultats obtenus en conditions réelles, c'est-à-dire couplées à des études sur le terrain**.

C. VERS UNE MEDIATION SCIENTIFIQUE

La décomposition des litières, candidate parfaite pour la science participative ?

La connaissance du fonctionnement des écosystèmes constitue un prérequis nécessaire pour mieux comprendre les effets de changements environnementaux auxquels nous sommes confrontés et au rang desquels une inquiétude de plus en plus **partagée concerne l'évolution** actuelle du climat. Le recyclage de la matière organique **et les flux d'énergie et de matière, et finalement d'éléments associés sont indispensables au bon fonctionnement de la biosphère**. Il s'agit là de notions particulièrement importantes à comprendre. La compréhension du fonctionnement des écosystèmes et de leurs réactions aux changements globaux demande nécessairement de disposer de bases élémentaires qui a priori peuvent apparaître difficile voir rébarbatives **à assimiler pour les acteurs de la société qu'il s'agisse des décideurs, des gestionnaires ou tout simplement du grand public**. Pour autant, **l'apprentissage par l'expérimentation peut représenter un outil intéressant mettant en œuvre l'observation, la déduction et l'interprétation, qui sont autant de composantes**

de la démarche scientifique. Pour cela, **l'étude de la décomposition de la matière** organique végétale par la méthode des sacs à litière peut représenter une méthode simple à déployer pour mieux comprendre les flux de matières et les acteurs biologiques impliqués.

C.1. **L'expérimentation de décomposition en sacs à litières** : un lien possible entre le grand public et le milieu de la recherche

La méthode des sacs à litières présente de nombreux avantages qui facilitent son utilisation et la rendent accessible au grand public. Premièrement, elle nécessite peu de matériel onéreux, et qui sera réutilisable ultérieurement : du grillage plastique à mailles larges (en vente dans tous les magasins de bricolage et de jardinerie), du tissu à mailles fines (qui peut être fourni par les laboratoires), et du fil nécessaires à la **confection des sacs, de quoi les attacher (piquets, fers à béton) dans l'écosystème étudié** et une balance de précision (par exemple, le modèle Ohaus YA302, précision 0,05g, à moins de 35 euros).

Deuxièmement, la collecte des feuilles mortes qui serviront à remplir les sacs se fait à **l'automne au moment de l'abscission**, et coïncide notamment avec le premier trimestre de l'année scolaire. Elle permet de se familiariser avec le terrain avant l'arrivée de l'hiver, et peut être couplée à la confection d'un herbier afin de bien différencier et reconnaître les différentes espèces **d'arbre grâce à l'identification des feuilles**. De nombreux ouvrages sont disponibles pour cela. Citons par exemple pour la France métropolitaine, le guide Encyclopédie visuelle des arbres & arbustes (Dupérat et Polese 2008, éditions Artémis). Cette **première approche de l'identification des essences** permet de se familiariser avec le concept de biodiversité qui peut par la suite être **étendu à d'autres groupes systématiques, initier des inventaires à l'échelle locale** (établissement scolaire, quartier urbain, jardin,..) et éventuellement permettre la participation à des programmes de science participative (par exemple Vigie-Nature). **Durant les quelques semaines qui suivent l'échantillonnage des feuilles, celles-ci sont mises à sécher à température ambiante**. Cette étape permet également de prendre **conscience que le vivant est en grande partie composé d'eau, et que sa proportion** varie en fonction des espèces. Cette période peut permettre la mise au point du protocole

(comparaison des essences d'arbre, choix de la quantité de feuilles à mettre dans les sacs et nombre de sacs ou répliques, de l'emplacement et de la durée d'immersion des sacs, ...) et d'amorcer la réflexion autour d'une démarche scientifique.

Troisièmement, la réalisation des étapes du protocole peut occuper régulièrement les élèves au cours de leur année scolaire : depuis la réalisation des dispositifs, en passant par leur installation puis leur récupération sur le terrain, l'identification des invertébrés, jusqu'aux étapes de séchage et pesée des feuilles et, enfin aux calculs des taux de décomposition. Ce protocole peut donc être assimilé à un projet annuel, pour lequel il est important d'établir un compte rendu, présentant à la fois la problématique, les hypothèses de départ, le protocole, les résultats et les conclusions et perspectives.

L'étude de la décomposition des litières, sous forme de projet, peut s'inscrire dans la partie consacrée au développement durable des programmes scolaires tout en sensibilisant à la protection de la nature, et peut mobiliser plusieurs disciplines (sciences de la vie et de la terre, mathématiques, physique/chimie, technologie). Enfin, elle permet aux élèves de se familiariser avec la démarche scientifique et expérimentale, et de mettre en application des connaissances appréhendées lors des enseignements. Elle a également l'avantage de présenter et de mieux faire connaître les métiers de la recherche, de faire collaborer et mettre en relation plusieurs établissements (dans le cadre d'une comparaison entre cours d'eau, essences, régions, ...). En retour, la science participative permet d'apporter à la recherche et aux scientifiques, des données et des observations à plus large échelle spatiale. En effet, la décomposition des litières est une candidate facilement réalisable pour l'étude et le suivi de la santé des milieux naturels sur l'ensemble du territoire et des espaces accessibles à tous. Ce type de données à large échelle permettrait ainsi d'approfondir des questions intéressantes sur des phénomènes spatiaux de décomposition (variabilité géographique de la vitesse de décomposition) en lien avec certains aspects des changements globaux (e.g. variations de température, précipitations, rayonnement incident). Ainsi, les « sciences participatives » permettent de répondre à la demande croissante des citoyens et des collectivités d'être acteurs de la recherche, constituent un moyen de sensibiliser le grand public à la question environnementale. Elles donnent également une puissance d'acquisition de données facilement accessibles aux chercheurs, en permettant la création de bases de données considérables.

C.2. **Initiatives menées dans le cadre de l'ANR Functional Streams**

Cette demande croissante en médiation scientifique a fait partie intégrante du projet ANR Functional Streams, à laquelle une tâche à part entière a été consacrée. Dans ce cadre, plusieurs initiatives, partagées entre le LIEC (Metz) et EcoLab (Toulouse) ont **été développées. Tout d'abord, nous avons profité de la création d'une mare pédagogique abritant de nombreuses espèces d'invertébrés aquatiques au collège Charlemagne dans les Vosges (Bruyères) en 2015 pour proposer aux professeurs d'y mener une expérimentation de décomposition, mais également dans la rivière toute proche, la Vologne. Par la suite, des échanges avec des professeurs de SVT, Physique-Chimie et Technologie de deux collèges de Meurthe-et-Moselle (Dombasle-sur-Meurthe et Lunéville), ont mené à des expérimentations de décomposition des litières effectuées par des classes de 6^{ème} et de 5^{ème}. Au collège Julienne Farenc (Dombasle-sur-Meurthe), ces expérimentations ont fait partie du projet « la rivière, une ressource à préserver » **qui a permis à ce collège d'obtenir le label de collège pilote** « La Main à la pâte ». Un collège pilote « la Main à la pâte » vise à favoriser au sein des classes, une pratique des sciences et de la technologie attrayante, créative, contemporaine et formatrice, en s'appuyant sur des relations privilégiées avec des chercheurs, des ingénieurs et des techniciens. Les collèges pilotes forment un réseau national de 80 établissements situés pour moitié d'entre eux en zone d'éducation prioritaire ou en zone rurale (pour en savoir plus : <http://www.maisons-pour-la-science.org/node/20698>; voir aussi <http://www.maisons-pour-la-science.org/node/11313>)**

Les élèves ont été guidés par leurs professeurs dans l'élaboration du protocole, avec pour objectif comprendre le processus de décomposition de la matière organique, de se familiariser avec les acteurs invertébrés et fongiques, mais également d'évaluer l'état écologique du cours d'eau à proximité de leur collège, et de comparer leurs résultats et observations entre collèges. Cette comparaison a permis aux élèves d'émettre des hypothèses à propos des différences observées, et d'amorcer une discussion. Par ailleurs, plusieurs visites du LIEC ont été organisées, dans le but de présenter aux élèves un laboratoire et les métiers de la recherche en lien avec leur expérimentation. Ces échanges se sont déroulés sous la forme d'ateliers (réseaux trophiques, invertébrés, litières, champignons aquatiques, approche cartographique d'un cours d'eau). Par

ailleurs dans le cadre de ce **projet ANR**, deux sessions de formation à l'écologie des cours d'eau se déroulent chacune sur deux jours couplant approche sur le terrain et en salle, à destinations d'enseignants de collèges en collaboration avec la Maison pour la Science de Nancy.

A Toulouse, deux autres initiatives ont été mises en place. Tout d'abord, des formations destinées aux enseignants d'écoles primaires ont été proposées. Elles comprenaient un aspect technique avec une sortie terrain au cours duquel les sacs à litières ont été présentés, ainsi qu'une partie plus théorique associée à l'analyse des résultats. Les enseignants ont bénéficié d'un soutien matériel (sacs, balances,...) et un forum destiné aux questions des professeurs a été créé. En parallèle, une collaboration entre le laboratoire EcoLab et le service éducatif de l'observatoire Midi-Pyrénées (OMP) a abouti à l'élaboration d'un kit de décomposition qui comportait des tubes à percer pouvant contenir des litières ou des disques de cellulose ainsi qu'un livret explicatif permettant la construction un pénétromètre (Fig. 7). Accompagné d'un poster ludique (Annexe 4), ce kit a été proposé par l'OMP aux établissements de l'académie de Toulouse dont une vingtaine se sont portés volontaires pour l'essayer et exposé au forum des Nouvelles Initiatives en Médiation Scientifiques à Toulouse en juin 2018. Ces travaux, réalisés en collaboration avec Thibaut Rota avec l'aide de Jérémy Jabiol, Franck Gilbert, ont reçu des échos positifs. Afin de faciliter les échanges, les analyses et de regrouper les données, une page web sur le site de l'OMP a également été créée et est disponible à l'adresse suivante : <https://kitdecompo.obs-mip.fr>.



Figure 7. Tubes et disques de cellulose (à gauche), pénétromètre (à droite)

Au terme du projet ANR, les résultats de cette tâche ont révélé une différence importante entre la facilité théorique de la méthode de décomposition en sacs à litière

et sa mise en application en conditions réelles. En effet, seules les classes des collèges de Meurthe-et-Moselle ont mené l'expérimentation à son terme (respectivement dans le Sanon à Dombasle-sur-Meurthe et dans la Meurthe à Lunéville), comparé leurs résultats et restitué leur expérience sous forme de vidéo en français et en allemand (<https://youtu.be/JIHOEChTiHs>). Le collège de Bruyères (Vosges) a mené une expérimentation mais les résultats ne nous ont pas été communiqués à ce jour. A Toulouse, les enseignants de primaire ont rencontré de nombreux obstacles pratiques, **qui n'ont pas permis d'aboutir à des résultats. Enfin, aucun des établissements de l'académie de Toulouse qui étaient volontaires pour utiliser le kit « décompo » n'a** donné de retour sur son utilisation, ni partagé de résultats sur la page web dédiée.

Ces premières initiatives de science participative autour de la décomposition ont donc abouti à des succès qui attestent de sa faisabilité concrète, mais également à des échecs qui ont permis de mieux appréhender les difficultés à palier **afin d'instaurer un réseau** pérenne.

C.3. Perspectives de développement (Comment instaurer un réseau fonctionnel ?/ Comment palier aux difficultés ?)

Malgré ces échecs, la multiplicité des initiatives menées a apporté des pistes utiles pour le développement futur **d'un réseau fonctionnel de sciences participatives**. Le premier point à considérer concerne **les difficultés techniques d'une** expérimentation à réaliser sur le terrain. En effet, la méthode des sacs à litières se **réalise à l'extérieur, et repose donc sur** plusieurs critères fondamentaux. En premier **lieu, il repose sur l'accès sans danger aux cours d'eau** ce qui peut être compliqué eut égard au transport éventuel et au coût associé, à **la nécessité d'avoir plusieurs** accompagnateurs et aux aléas climatiques (crue notamment). Une fois les sacs mis en **place, d'autres aléas peuvent expliquer le manque résultats, comme par exemple la** **perte des sacs, qui, s'ils ne sont pas solidement attachés, où s'ils ont subi une crue** importante, peuvent être emportés par le courant. Deuxièmement, le protocole **implique d'anticiper et de combiner les contraintes liées aux calendriers** « scolaire » (heures de cours, vacances et jours fériés) et « scientifique » (prise en compte des moments de collecte des feuilles, pose et retrait des sacs à litières). Troisièmement, des

sorties sur le terrain nécessitent la présence d'accompagnateurs. Ce dernier point est particulièrement contraignant pour les enseignants de primaire qui assurent souvent seuls leurs enseignements. En revanche, les enseignants du secondaire ont la possibilité de porter ce projet commun au sein de plusieurs matières scolaires (SVT, physique/chimie, technologies, langues,...), permettant ainsi à un plus grand nombre **d'encadrants de participer aux sorties.**

La seconde piste pour rendre ce réseau fonctionnel réside certainement dans les aspects relationnels entre professeurs et chercheurs. En ce sens, les différentes initiatives menées ont différé sur plusieurs points qui pourraient expliquer une partie des différents degrés de succès observés. Dans les cas où la volonté des professeurs **d'effectuer l'expérimentation est la même, les interactions régulières avec les** chercheurs (questions-réponses, explications, échanges de documentation,...) semblent indispensables au bon déroulement **de l'expérimentation. En effet, le manque d'interactions régulières entre chercheurs et enseignants pourrait expliquer l'échec rencontré avec le kit « décompo ».** Par ailleurs, la rencontre entre les élèves et les chercheurs semble constituer un moyen **d'établir un lien de réciprocité, qui** responsabilise les élèves vis-à-vis de leur expérimentation, et les implique plus profondément dans le rôle de chercheur. Par exemple, la visite du laboratoire plonge les élèves dans le milieu de la recherche, et représente ainsi pour eux un moment **d'échange essentiel et concret, pendant lequel l'expérimentation n'est plus un exercice d'école, mais une réelle mission à accomplir.**

In fine, ces projets de sciences participatives devraient permettre **d'acquérir des données de bonne qualité pour qu'elles soient exploitables à la fois pour les chercheurs et le grand public, mais aussi par les acteurs politiques et les gestionnaires.** Il est donc **nécessaire de garder à l'esprit que la** qualité des données acquises par le biais des sciences participatives dépend de la prise en compte efficace de ces aspects techniques **et relationnels. La mise en place du réseau n'en étant qu'à ses débuts, il est certain que** la qualité et la quantité des données augmentent avec le temps (professeurs répétant **l'expérimentation d'une année sur l'autre et s'appropriant de mieux en mieux le** protocole), mais aussi avec le bouche-à-oreille (meilleure autonomie des enseignants). **En effet, le bon retour d'expérience de certains professeurs peut permettre d'en inciter d'autres à faire la même expérimentation, et donc à agrandir le réseau.**

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au regard des résultats obtenus lors de cette thèse, des données acquises ces dernières années sur la décomposition des litières, et de la problématique des changements environnementaux, ce travail confirme que 1) la température et les nutriments ont des effets complexes sur les processus de décomposition des litières **dans les cours d'eau** ; 2) la prise en compte de facteurs environnementaux supplémentaires tels que la saisonnalité et la dynamique temporelle semble indispensable pour mieux appréhender les effets mesurés en milieux naturels ou semi-naturels ; et 3) que les interactions biotiques entre individus et entre compartiments jouent un rôle important dans la variabilité des réponses observées.

Au travers d'études réalisées selon différentes approches (microcosmes, mésocosmes, *in natura*), ce travail de thèse présente des résultats variés, qui reflètent la complexité de la mesure des effets de la température et des nutriments (Fig. 8). Certaines de nos études (*in natura* au sein de 12 cours d'eau et en microcosmes ; encadrés 1 et 2 ; annexes 1 et 2 ; Fig. 8, première et dernière colonnes) concluent à une augmentation de la transformation de la matière organique en CO₂, via une **augmentation de l'activité des micro-organismes à de plus fortes températures. **D'autres études (*in natura* ; chapitres 1 et 2 et en mésocosmes ; chapitre 3) ne mettent en évidence aucune différence dans les taux de décomposition microbienne mesurés aux différentes températures (de +1°C à +5°C). Concernant la réponse des macro-invertébrés à l'augmentation de la température, nous avons observé une augmentation de la décomposition totale et de la taille des déchetes (gammare) en mésocosmes (chapitre 3), ainsi que de la consommation et de la respiration des invertébrés en microcosmes. Dans ce dernier cas, nous avons également observé une diminution de la décomposition et de la respiration des macro-invertébrés après un certain seuil de température, dépendant du processus et de l'espèce considérée. Les résultats de ces études reflètent bien la divergence des données existantes dans la littérature, et ne semblent pas particulièrement liés au type d'approche utilisée. Par****

exemple, concernant la décomposition microbienne, l'étude corrélative *in situ* (encadré 1) et l'étude en microcosmes (encadré 2) aboutissent toutes deux à une augmentation de la transformation de la matière organique en CO₂ (Fig. 8), tandis que les études réalisées en source tempérée (chapitres 1 et 2) et en mésocosmes (chapitre 3) **concluent à l'absence d'effet significatif de la température sur les taux de décomposition microbienne**. Dans nos études, nous avons donc mesuré soit une **accélération de la décomposition avec la température, soit une absence d'effet** ; mais jamais de diminution. Ces résultats concordent avec les résultats de la méta-analyse effectuée par Amani et al. (2019), qui montrent un effet de la température **indépendamment du type d'étude (microcosmes ou *in situ*; corrélatives ou manipulatives *in situ*)**, de la composition de la communauté de décomposeurs étudié (microbes seuls ou microbes et macro-invertébrés) **et de l'identité de la litière**. Cependant, les données acquises *in situ* (travaux réalisés au cours de cette thèse, données de la littérature) restent insuffisantes pour anticiper avec certitude les conséquences des changements environnementaux tels que la température sur les **processus fonctionnels des ruisseaux de tête de bassin versant**. Plus d'études, réalisées à large échelle, permettraient d'affiner la compréhension des conséquences de ces changements. Ces études, représentant un suivi de l'état écologique des cours d'eau sur l'ensemble du territoire, pourraient voir le jour sous forme d'expériences de sciences participatives, avec le développement d'un homologue européen du « Leaf Pack Network » mis en place depuis plusieurs années aux Etats-Unis (Stroud™ Water Research Center).

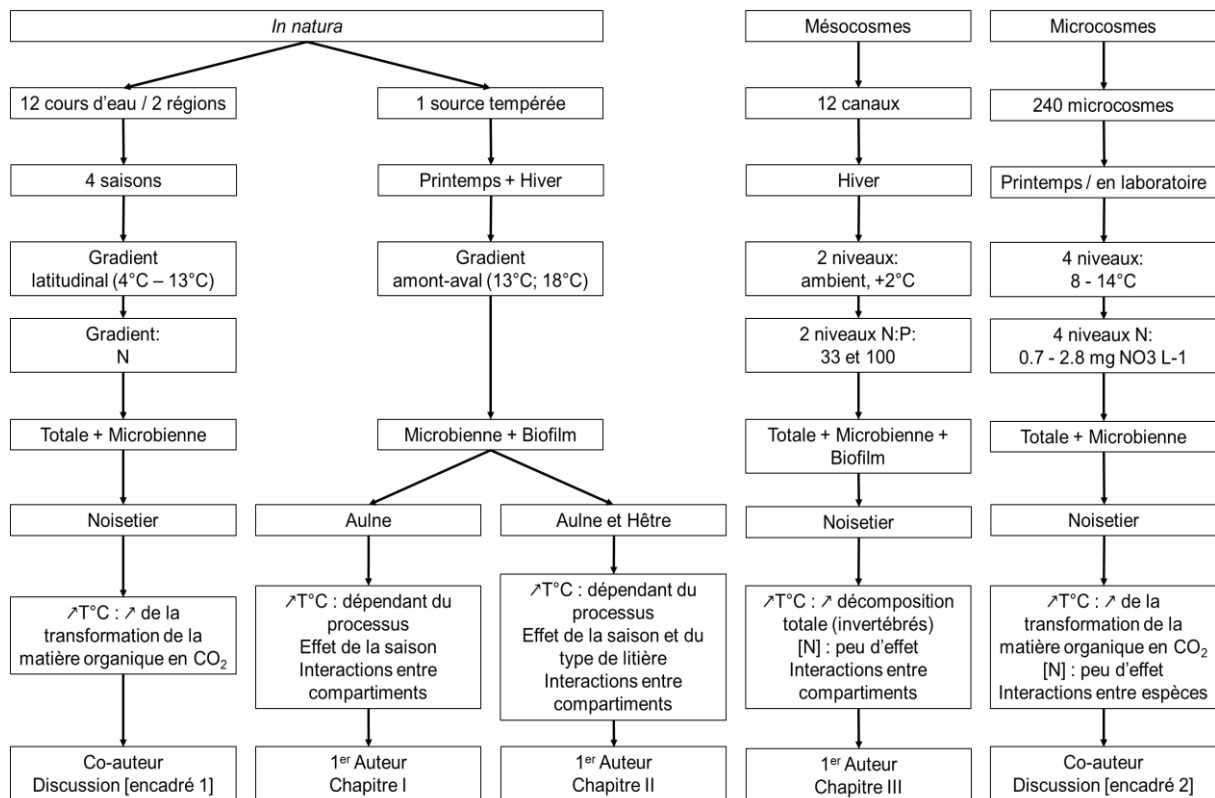


Figure 8. Schéma synthétique des caractéristiques (type d'étude, nombre de milieux testés, saison, niveaux de température et de nutriments testés, objets de l'étude, litière utilisée, principaux résultats, rôle dans la mise en place des études et dans la rédaction des publications et place dans la thèse) des différentes approches utilisées durant ce travail de thèse.

Un des résultats les plus marquants de ce travail de thèse concerne l'influence des variations saisonnières sur la décomposition des litières, indépendamment de la température (chapitres 1 et 2). Cette influence des saisons, généralement assimilée aux variations de température dans nos régions tempérées, a pu être décelée grâce à **une source tempérée, utilisée comme site d'étude** à deux saisons. Les résultats de ces études ont révélé un effet significatif de la saison sur les processus de décomposition et sur la concentration chlorophyllienne du biofilm. De plus, il semble important de considérer les aspects temporels de ces processus dynamiques : **dans l'étude des effets de la température et/ou des nutriments sur la décomposition des litières, la sélection d'une date de prélèvement ou d'une autre peut entraîner des différences majeures d'interprétation et/ou d'observation de ces effets.** Par exemple, au printemps, nous avons observé une corrélation entre la température et la concentration en chlorophylle-*a* du biofilm après 28 jours (Fig. 9, en blanc) ; **cependant, cette corrélation n'est pas**

retrouvée avec les concentrations en chlorophylle-*a* après 42 jours (Fig. 9, en gris). Il **peut donc y avoir un biais, lié à la sélection volontaire ou involontaire d'une unique date de prélèvement pour quantifier un processus dynamique, qui évolue au cours du temps.** Cela est particulièrement **vrai pour l'étude du biofilm, dont nous n'avons mesuré que la phase de colonisation d'un substrat nouveau** (carreaux de céramique placés *in situ* ou en mésocosmes). De fait, **qu'en serait-il si l'on menait une étude sur des substrats naturels immergés depuis longtemps ?**

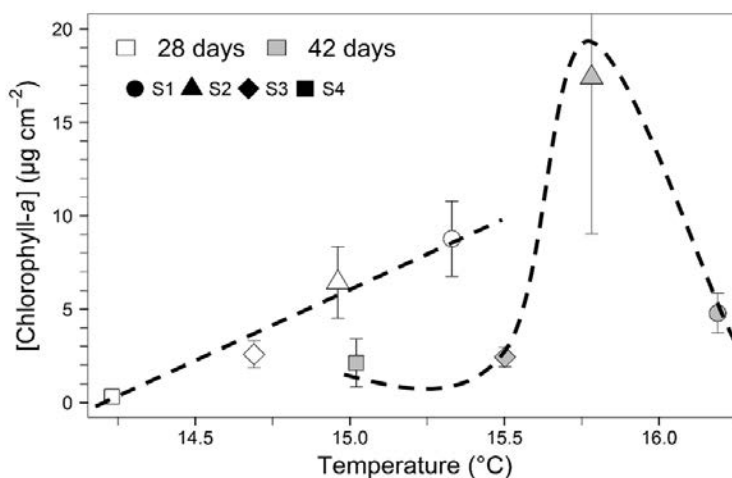


Figure 9. Concentration en chlorophylle-*a* \pm SE du biofilm après 28 jours (en blanc) et après 42 jours (en gris) en fonction de la température.

La prise en compte de la dynamique, via la sélection de plusieurs dates, peut permettre de révéler des effets, parfois opposés, à différents stades du processus de décomposition des litières. En particulier, nous avons observé (chapitre 3) que la sporulation des hyphomycètes aquatiques peut être plus sensible aux facteurs de stress (c.-à-d. la température) dans les phases plus avancées de la décomposition des litières, lorsque le mycélium restant survit sur un substrat de feuille plus dégradé (après 52 jours). Enfin, les effets de valeurs extrêmes de température, qui sont par ailleurs conjuguées à des **stress hydriques comme c'est le cas de manière récurrente dans les cours d'eau de tête de bassin versant**, devraient être intégrées aux études qui s'intéressent le plus souvent uniquement aux valeurs moyennes.

La dernière conclusion de ce travail de thèse concerne le rôle des interactions entre individus et compartiments biotiques dans la modulation des réponses des processus aux facteurs de stress tels que la température ou la disponibilité en nutriments. Dans nos études, les interactions entre compartiments (décomposeurs et producteurs primaires ; chapitres 1, 2 et 3) **et entre individus d'espèces différentes** (encadré 2) sont impliquées dans la variabilité des réponses observées face aux facteurs de stress. Dans certains cas, nous avons pu mettre en évidence des interactions mutualistes (chapitres et 2) et des interactions de compétition (chapitre 2) entre les décomposeurs hétérotrophes et les autotrophes du biofilm. Concernant les **communautés microbiennes, l'identification d'espèces non hyphomycètes** (Annexe 3) qui jouent certainement un rôle direct ou indirect dans la décomposition de la matière organique, **met en évidence l'intérêt du développement des méthodes moléculaires (bases de données permettant l'identification des taxons après séquençage)** et ouvre des perspectives de recherche à ce sujet. Dans notre étude en mésocosmes (chapitre 3), nous avons observé un impact des invertébrés sur la production de biofilm (effets top-down), **qui ont limité l'augmentation de la biomasse du biofilm dans les conditions** de température et de disponibilité en nutriments élevés. Cela concorde avec les observations de Greenwood & Rosemond (2005) qui ont montré que les macro-invertébrés (brouetteurs) étaient capables de contrôler presque totalement l'augmentation de la biomasse du biofilm après enrichissement expérimental en nutriments. Cette étude suggère que la complexité des communautés biologiques pourrait grandement influencer la réaction des écosystèmes à de multiples facteurs de stress et que les interactions entre les organismes doivent être explicitement prises en compte dans l'étude des impacts des changements environnementaux sur le fonctionnement des écosystèmes. Enfin, comme chaque espèce possède un **preferendum** face aux facteurs écologiques, qui définit leur valence écologique (espèces **sténoèces, qui ne tolèrent qu'une gamme étroite de variation de tous les facteurs** écologiques de leur milieu ; ou euryèces, capables de coloniser de nombreux milieux), **il est essentiel d'anticiper comment les espèces les moins tolérantes aux variations de** température (sténothermes), en particulier celles qui sont inféodées aux milieux froids (sténothermes des milieux froids), vont réagir à l'augmentation des températures. Et dans le cas où elles seraient remplacées ou disparaîtraient, leur place au sein des communautés, les interactions dans lesquelles elles sont impliquées dans les écosystèmes doivent être mieux connus. Dans notre étude en microcosmes (encadré

2), nous avons observé une diminution des performances de décomposition des **individus en mélange d'espèces lorsqu'ils étaient exposés à des niveaux de température et d'azote élevés. Cela suggère que les conditions du milieu ont un effet** sur les interactions biotiques, même dans des conditions de communautés très simplifiées. Les effets des changements environnementaux sur la décomposition de la litière au niveau individuel et au niveau communautaire nécessitent une plus ample considération dans les études à venir (Landeira-Dabarca 2019).

En conclusion, l'utilisation de différentes approches (*in situ*, en mésocosmes ou en microcosmes) au cours de ce travail de thèse a permis d'obtenir un ensemble de résultats complémentaires pour mieux comprendre les effets des changements environnementaux sur les processus écosystémiques. Ces résultats mettent l'accent sur la complexité des mécanismes impliqués dans la réponse des écosystèmes à ces changements, et apportent des indications utiles à la gestion et à la conservation des milieux aquatiques.

REFERENCES

- Albariño R., Díaz-Villanueva V. & Canhoto C. (2008). The effect of sunlight on leaf litter quality reduces growth of the shredder *Klapopteryx kuscheli*. *Freshwater Biology* 53, 1881–1889
- Alexander R.B., Boyer E.W., Smith R.A., Schwarz G.E. & Moore R.B. (2007). The Role of Headwater Streams in Downstream Water Quality1: The Role of Headwater Streams in Downstream Water Quality. *JAWRA Journal of the American Water Resources Association* 43, 41–59.
<https://doi.org/10.1111/j.1752-1688.2007.00005.x>
- Amani M., Graça M.A. & Ferreira V. (2019). Effects of elevated atmospheric CO₂ concentration and temperature on litter decomposition in streams: A meta-analysis. *International Review of Hydrobiology* 104, 14–25
- Arsuffi T.L. & Suberkropp K. (1984). Leaf Processing Capabilities of Aquatic Hyphomycetes: Interspecific Differences and Influence on Shredder Feeding Preferences. *Oikos* 42, 144.
<https://doi.org/10.2307/3544786>
- Baldy V., Gessner M.O. & Chauvet E. (1995). Bacteria, fungi and the breakdown of leaf litter in a large river. *Oikos*, 93–102
- Bellard C., Bertelsmeier C., Leadley P., Thuiller W. & Courchamp F. (2012). Impacts of climate change on the future of biodiversity: Biodiversity and climate change. *Ecology Letters* 15, 365–377.
<https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01736.x>
- Benfield E.F. (1997). Comparison of litterfall input to streams. *Journal of the North American Benthological Society* 16, 104–108
- Benfield E.F. (2006). Decomposition of leaf material. In: *Methods in stream ecology*, 2nd ed. (Eds F.R. Hauer & G.A. Lamberti), pp. 711–720. Academic Press/Elsevier, San Diego, Calif.
- Berg M.P., Kiers E.T., Driessen G., Van Der HEIJDEN M., Kooi B.W., Kuenen F., et al. (2010). Adapt or disperse: understanding species persistence in a changing world. *Global Change Biology* 16, 587–598
- Blois J.L., Zarnetske P.L., Fitzpatrick M.C. & Finnegan S. (2013). Climate change and the past, present, and future of biotic interactions. *Science* 341, 499–504
- Boyero L., Pearson R.G., Gessner M.O., Barmuta L.A., Ferreira V., Graça M.A., et al. (2011). A global experiment suggests climate warming will not accelerate litter decomposition in streams but might reduce carbon sequestration. *Ecology Letters* 14, 289–294
- Boyero L., Pearson R.G., Hui C., Gessner M.O., Pérez J., Alexandrou M.A., et al. (2016). Biotic and abiotic variables influencing plant litter breakdown in streams: a global study. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 283, 20152664.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2664>
- Bradshaw W.E. & Holzapfel C.M. (2006). Evolutionary response to rapid climate change. *Science* 312, 1477–1478
- Brown J.H., Gillooly J.F., Allen A.P., Savage V.M. & West G.B. (2004).

- Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology* 85, 1771–1789
- Butchart S.H.M., Walpole M., Collen B., van Strien A., Scharlemann J.P.W., Almond R.E.A., et al. (2010). Global Biodiversity: Indicators of Recent Declines. *Science* 328, 1164–1168. <https://doi.org/10.1126/science.1187512>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.05.002>
- Canhoto C., de Lima J.L.M.P. & de Almeida A.T. (2013). Warming up a stream reach: design of a hydraulic and heating system. *Limnology and Oceanography: Methods* 11, 410–417. <https://doi.org/10.4319/lom.2013.11.410>
- Cannon, W.B., 1932. *The Wisdom of the Body*. W.W. Norton and Company, inc., New York, pp: 294. Williams, R. and V. Williams, 1993. *Anger Kills*. HarperCollins, New York, ISBN-10: 0060976233, pp: 256.
- Chamier A.-C. & Dixon P.A. (1982). Pectinases in leaf degradation by aquatic hyphomycetes I: the field study. *Oecologia* 52, 109–115
- Crist E., Mora C. & Engelman R. (2017). The interaction of human population, food production, and biodiversity protection. *Science* 356, 260–264
- 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. <https://doi.org/10.2307/1296676>
- Cummins K.W., Sedell J.R., Swanson F.J., Minshall G.W., Fisher S.G., Cushing C.E., et al. (1983). Organic matter budgets for stream ecosystems: problems in their evaluation. In: *Stream ecology*. pp. 299–353. Springer.
- Dang C.K., Gessner M.O. & Chauvet E. (2007). Influence of conidial traits and leaf structure on attachment success of aquatic hyphomycetes on leaf litter. *Mycologia* 99, 24–32
- 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, 1604–1613. <https://doi.org/10.1890/12-0606.1>
- Diaz R.J. & Rosenberg R. (2008). Spreading Dead Zones and Consequences for Marine Ecosystems. *Science* 321, 926–929. <https://doi.org/10.1126/science.1156401>
- Díaz-Villanueva V., Font J., Schwartz T. & Romaní A.M. (2011). Biofilm formation at warming temperature: acceleration of microbial colonization and microbial interactive effects. *Biofouling* 27, 59–71. <https://doi.org/10.1080/08927014.2010.538841>
- Dupérat M. & Polese J.-M. (2008). *Encyclopédie visuelle des arbres & arbustes*. Artemis.
- Easterling D.R. (2000). Climate Extremes: Observations, Modeling, and Impacts. *Science* 289, 2068–2074. <https://doi.org/10.1126/science.289.5487.2068>

- Elser J.J., Bracken M.E.S., Cleland E.E., Gruner D.S., Harpole W.S., Hillebrand H., et al. (2007). Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* 10, 1135–1142. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01113.x>
- Erismann J.W., Grennfelt P. & Sutton M. (2003). The European perspective on nitrogen emission and deposition. *Environment International* 29, 311–325. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(02\)00162-9](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00162-9)
- Fenoy E., Casas J.J., Díaz-López M., Rubio J., Guil-Guerrero J.L. & Moyano-López F.J. (2016). Temperature and substrate chemistry as major drivers of interregional variability of leaf microbial decomposition and cellulolytic activity in headwater streams. *FEMS microbiology ecology* 92
- Fernandes I., Seena S., Pascoal C. & Cássio F. (2014). Elevated temperature may intensify the positive effects of nutrients on microbial decomposition in streams. *Freshwater Biology* 59, 2390–2399
- Ferreira V. & Canhoto C. (2014). Effect of experimental and seasonal warming on litter decomposition in a temperate stream. *Aquatic Sciences* 76, 155–163. <https://doi.org/10.1007/s00027-013-0322-7>
- Ferreira V. & Canhoto C. (2015). Future increase in temperature may stimulate litter decomposition in temperate mountain streams: evidence from a stream manipulation experiment. *Freshwater Biology* 60, 881–892. <https://doi.org/10.1111/fwb.12539>
- Ferreira V., Castagneyrol B., Koricheva J., Gulis V., Chauvet E. & Graça M.A. (2014a). A meta-analysis of the effects of nutrient enrichment on litter decomposition in streams. *Biological Reviews*, 90, 3, 669–688
- Ferreira V. & Chauvet E. (2011a). Future increase in temperature more than decrease in litter quality can affect microbial litter decomposition in streams. *Oecologia* 167, 279–291. <https://doi.org/10.1007/s00442-011-1976-2>
- Ferreira V. & Chauvet E. (2011b). Synergistic effects of water temperature and dissolved nutrients on litter decomposition and associated fungi. *Global Change Biology* 17, 551–564. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02185.x>
- Ferreira V., Chauvet E. & Canhoto C. (2014b). Effects of experimental warming, litter species, and presence of macroinvertebrates on litter decomposition and associated decomposers in a temperate mountain stream. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 72, 206–216. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2014-0119>
- Ferreira V., Gulis V. & Graça M.A. (2006). Whole-stream nitrate addition affects litter decomposition and associated fungi but not invertebrates. *Oecologia* 149, 718–729
- Fisher S.G. & Likens G.E. (1973). Energy Flow in Bear Brook, New Hampshire: An Integrative Approach to Stream Ecosystem Metabolism. *Ecological Monographs* 43, 421–439. <https://doi.org/10.2307/1942301>
- Follstad Shah J.J., Kominoski J.S., Ardón M., Dodds W.K., Gessner M.O., Griffiths N.A., et al. (2017). Global synthesis of the temperature

- sensitivity of leaf litter breakdown in streams and rivers. *Global Change Biology* 23, 3064–3075. <https://doi.org/10.1111/gcb.13609>
- Francoeur S.N. (2001). Meta-analysis of lotic nutrient amendment experiments: detecting and quantifying subtle responses. *Journal of the North American Benthological Society* 20, 358–368
- Franken R.J.. (2008). *Habitat variation and life history strategies of benthic invertebrates*.
- Galloway J., Aber J.D., Erisman J.W., Seitzinger S.P., Howarth R.W., Cowling E.B., et al. (2003). The nitrogen cascade. *BioScience* 53, 341–356
- Galloway J.N., Townsend A.R., Erisman J.W., Bekunda M., Cai Z., Freney J.R., et al. (2008). Transformation of the Nitrogen Cycle: Recent Trends, Questions, and Potential Solutions. *Science* 320, 889–892. <https://doi.org/10.1126/science.1136674>
- Geraldes P., Pascoal C. & Cássio F. (2012). Effects of increased temperature and aquatic fungal diversity on litter decomposition. *Fungal Ecology* 5, 734–740. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2012.05.007>
- Gessner M.O., Chauvet E. & Dobson M. (1999). A Perspective on Leaf Litter Breakdown in Streams. *Oikos* 85, 377. <https://doi.org/10.2307/3546505>
- Gillooly J.F., Brown J.H., West G.B., Savage V. & Charnov E. (2001). Impact of landscape management on the genetic structure of red squirrel populations. *Science* 293, 2248–2251
- Graça M.A.S., Ferreira R.C.F. & Coimbra C.N. (2001). Litter processing along a stream gradient: the role of invertebrates and decomposers. *Journal of the North American Benthological Society* 20, 408–420. <https://doi.org/10.2307/1468038>
- Greenwood J.L. & Rosemond A.D. (2005). Periphyton response to long-term nutrient enrichment in a shaded headwater stream. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62, 2033–2045
- Greig H.S., Kratina P., Thompson P.L., Palen W.J., Richardson J.S. & Shurin J.B. (2012). Warming, eutrophication, and predator loss amplify subsidies between aquatic and terrestrial ecosystems. *Global Change Biology* 18, 504–514. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2011.02540.x>
- Gulis V., Ferreira V. & Graca 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2006.01615.x>
- Gulis V. & Suberkropp K. (2003a). Effect of inorganic nutrients on relative contributions of fungi and bacteria to carbon flow from submerged decomposing leaf litter. *Microbial Ecology* 45, 11–19
- Gulis V. & Suberkropp K. (2003b). Interactions between stream fungi and bacteria associated with decomposing leaf litter at different levels of nutrient availability. *Aquatic Microbial Ecology* 30, 149–157
- Gulis V., Suberkropp K. & Rosemond A.D. (2008). Comparison of Fungal Activities on Wood and Leaf Litter in Unaltered and Nutrient-Enriched Headwater Streams. *Applied and Environmental*

- Microbiology* 74, 1094–1101.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01903-07>
- Guo F., Kainz M.J., Valdez D., Sheldon F. & Bunn S.E. (2016). High-quality algae attached to leaf litter boost invertebrate shredder growth. *Freshwater Science* 35, 1213–1221.
<https://doi.org/10.1086/688667>
- Guschina I.A. & Harwood J.L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in lipid research* 45, 160–186
- Halvorson H.M., Barry J.R., Lodato M.B., Findlay R.H., Francoeur S.N. & Kuehn K.A. (2018). Periphytic algae decouple fungal activity from leaf litter decomposition via negative priming. *Functional Ecology*, 33, 1, 188–201.
<https://doi.org/10.1111/1365-2435.13235>
- Harley C.D.G. (2011). Climate Change, Keystone Predation, and Biodiversity Loss. *Science* 334, 1124–1127.
<https://doi.org/10.1126/science.1210199>
- Hughes L. (2000). Biological consequences of global warming: is the signal already apparent? *Trends in Ecology & Evolution* 15, 56–61
- IPCC (2014). IPCC Summary for policymakers. In: *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Field, C.B., V.R. Barros, D.J. Dokken, K.J. Mach, M.D. Mastrandrea, T.E. Bilir, M. Chatterjee, K.L. Ebi, Y.O. Estrada, R.C. Genova, B. Girma, E.S. Kissel, A.N. Levy, S. MacCracken, P.R. Mastrandrea, and L.L. White (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1–32.
- IPCC (2018). Summary for Policymakers. In: *Global warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty* [V. Masson-Delmotte, P. Zhai, H. O. Pörtner, D. Roberts, J. Skea, P. R. Shukla, A. Pirani, W. Moufouma-Okia, C. Péan, R. Pidcock, S. Connors, J. B. R. Matthews, Y. Chen, X. Zhou, M. I. Gomis, E. Lonnoy, T. Maycock, M. Tignor, T. Waterfield (eds.)].
- Irons J.G., Oswald M.W., Stout R. & Pringle C.M. (1994). Latitudinal patterns in leaf litter breakdown: is temperature really important? *Freshwater biology* 32, 401–411
- Jarvie H.P., Smith D.R., Norton L.R., Edwards F.K., Bowes M.J., King S.M., et al. (2018). Phosphorus and nitrogen limitation and impairment of headwater streams relative to rivers in Great Britain: A national perspective on eutrophication. *Science of The Total Environment* 621, 849–862.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.128>
- Jourdan J., O’Hara R.B., Bottarin R.,** Huttunen K.-L., Kuemmerlen M., Monteith D., et al. (2018). Effects of changing climate on European stream invertebrate communities: A long-term data analysis. *Science of The Total Environment* 621, 588–599.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.242>
- Jyväsjärvi J., Marttila H., Rossi P.M., Ala-Aho P., Olofsson B., Nisell J., et al. (2015). Climate-induced warming

- imposes a threat to north European spring ecosystems. *Global Change Biology* 21, 4561–4569.
<https://doi.org/10.1111/gcb.13067>
- Kaushik N. K. and Hynes H. B. N., 1971. The fate of the dead leaves that fall into streams. *Archiv für Hydrobiologie*, 68: 465-515.
- 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
- Landeira-Dabarca A., Pérez J., Graça M.A.S. & Boyero L. (2019). Joint effects of temperature and litter quality on detritivore-mediated breakdown in streams. *Aquatic Sciences* 81.
<https://doi.org/10.1007/s00027-018-0598-8>
- Lecerf A., Risnoveanu G., Popescu C., Gessner M.O. & Chauvet E. (2007). Decomposition of diverse litter mixtures in stream. *Ecology* 88, 219–227.
- Lowe W.H. & Likens G.E. (2005). Moving Headwater Streams to the Head of the Class. *BioScience* 55, 196.
- Martínez A., Larrañaga A., Pérez J., Descals E. & Pozo J. (2014). Temperature affects leaf litter decomposition in low-order forest streams: field and microcosm approaches. *FEMS Microbiology Ecology* 87, 257–267.
<https://doi.org/10.1111/1574-6941.12221>
- Melillo J.M., Naiman R.J., Aber J.D. & Linkins A.E. (1984). Factors controlling mass loss and nitrogen dynamics of plant litter decaying in northern streams. *Bulletin of Marine Science* 35, 341–356
- Merritt R.W., Cummins K.W., Berg M.B., 2008. *An introduction to aquatic insects of North America*. Kendall/Hunt Publ. Co. Dubuque: 1158 pp.
- Meyer J.L., Strayer D.L., Wallace J.B., Eggert S.L., Helfman G.S. & Leonard N.E. (2007). The Contribution of Headwater Streams to Biodiversity in River Networks1: The Contribution of Headwater Streams to Biodiversity in River Networks. *JAWRA Journal of the American Water Resources Association* 43, 86–103.
<https://doi.org/10.1111/j.1752-1688.2007.00008.x>
- Minshall G.W. (1978). Autotrophy in Stream Ecosystems. *BioScience* 28, 767–771.
<https://doi.org/10.2307/1307250>
- Minshall G.W. (1967). Role of allochthonous detritus in the trophic structure of a woodland springbrook community. *Ecology* 48, 139–149
- Moghadam F.S. & Zimmer M. (2014). Effects of Warming and Nutrient Enrichment on How Grazing Pressure Affects Leaf Litter–Colonizing Bacteria. *Journal of Environment Quality* 43, 851.
<https://doi.org/10.2134/jeq2013.12.0503>
- Moghadam F.S. & Zimmer M. (2016). Effects of warming, nutrient enrichment and detritivore presence on litter breakdown and associated microbial decomposers in a simulated temperate woodland creek. *Hydrobiologia* 770, 243–256.
<https://doi.org/10.1007/s10750-015-2596-3>
- Moore J.C., Berlow E.L., Coleman D.C., Ruitter P.C., Dong Q., Hastings A., et al. (2004). Detritus, trophic dynamics and biodiversity. *Ecology Letters* 7, 584–600.
<https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00606.x>

- Nelson D., Benstead J.P., Huryan A.D., Cross W.F., Hood J.M., Johnson P.W., et al. (2017). Experimental whole-stream warming alters community size structure. *Global Change Biology* 23, 2618–2628. <https://doi.org/10.1111/gcb.13574>
- Noel L., Bärlocher F., Culp J.M. & Seena S. (2016). Nutrient enrichment and flow regulation impair structure and function of a large river as revealed by aquatic hyphomycete species richness, biomass, and decomposition rates. *Freshwater Science* 35, 1148–1163. <https://doi.org/10.1086/689180>
- O’Gorman E.J., Benstead J.P., Cross W.F., Friberg N., Hood J.M., Johnson P.W., et al. (2014).** Climate change and geothermal ecosystems: natural laboratories, sentinel systems, and future refugia. *Global Change Biology* 20, 3291–3299. <https://doi.org/10.1111/gcb.12602>
- O’Gorman E.J., Zhao L., Pichler D.E., Adams G., Friberg N., Rall B.C., et al. (2017).** Unexpected changes in community size structure in a natural warming experiment. *Nature Climate Change* 7, 659
- Parmesan C. & Yohe G. (2003). A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature* 421
- 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
- Payne R.J., Dise N.B., Stevens C.J., Gowing D.J., BEGIN Partners, Dupre C., et al. (2013). Impact of nitrogen deposition at the species level. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 984–987. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214299110>
- Pérez J., Martínez A., Descals E. & Pozo J. (2018). Responses of Aquatic Hyphomycetes to Temperature and Nutrient Availability: a Cross-transplantation Experiment. *Microbial Ecology*, 76, 2, 328–339
- Pilgrim J.M., Fang X. & Stefan H.G. (1998). Stream temperature correlations with air temperatures in Minnesota: implications for climate warming. *JAWRA Journal of the American Water Resources Association* 34, 1109–1121
- Ripple W.J., Wolf C., Newsome T.M., Galetti M., Alamgir M., Crist E., et al. (2017). **World scientists’ warning to humanity: a second notice.** *BioScience* 67, 1026–1028
- Rowe J.M., Meegan S.K., Engstrom E.S., Perry S.A. & Perry W.B. (1996). Comparison of leaf processing rates under different temperature regimes in three headwater streams. *Freshwater Biology* 36, 277–288
- Sabater S., Elozegi A., Acuña V., Basaguren A., Muñoz I. & Pozo J. (2008). Effect of climate on the trophic structure of temperate forested streams. A comparison of Mediterranean and Atlantic streams. *Science of The Total Environment* 390, 475–484. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.10.030>
- Sala O.E. (2000). Global Biodiversity Scenarios for the Year 2100. *Science* 287, 1770–1774. <https://doi.org/10.1126/science.287.5459.1770>
- Santonja M., Fernandez C., Gauquelin T. & Baldy V. (2015). Climate change effects on litter decomposition: intensive drought leads to a strong decrease of litter mixture interactions. *Plant and Soil* 393, 69–82. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2471-z>

- Sinclair B., Marshall K.E., Sewell M.A., Willett C.S., Slotsbo S., Dong Y., et al. (2016). Can we predict ectotherm responses to climate change using thermal performance curves and body temperatures? *Ecology Letters* 19, 1372–1385
- Smith V.H. (2003). Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems - a global problem. *Environmental Science and Pollution Research* 10, 126–139
- Sridhar K.R. & Bärlocher F. (2000). Initial colonization, nutrient supply, and fungal activity on leaves decaying in streams. *Applied and environmental microbiology* 66, 1114–1119
- Steffen W., Crutzen P.J. & McNeill J.R. (2007). The Anthropocene: Are Humans Now Overwhelming the Great Forces of Nature. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 36, 614–621.
- Strahler, A. N. (1952). Hypsometric (area-altitude) analysis of erosional topography. *Geological Society of America Bulletin*, 63(11), 1117-1142.
- Suberkropp K. (1995). The influence of nutrients on fungal growth, productivity, and sporulation during leaf breakdown in streams. *Canadian Journal of Botany* 73, 1361–1369
- Suberkropp K. & Arsuffi T.L. (1984). Degradation, growth, and changes in palatability of leaves colonized by six aquatic hyphomycete species. *Mycologia* 76, 398–407
- Suberkropp K., Godshalk G.L. & Klug M.J. (1976). Changes in the Chemical Composition of Leaves During Processing in a Woodland Stream. *Ecology* 57, 720–727. <https://doi.org/10.2307/1936185>
- Terblanche J.S., Klok C.J. & Chown S.L. (2004). Metabolic Rate Variation in *Glossina pallidipes* (Diptera: Glossinidae): Gender, Ageing and Repeatability. *Journal of Insect Physiology* 50, 419–428
- Thomas C.D., Cameron A., Green R.E., Bakkenes M., Beaumont L.J., Collingham Y.C., et al. (2004). Extinction risk from climate change. *Nature* 427, 145
- Vannote, Minshall, Cummins, Sedell & Cushing (1980). The River Continuum Concept. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 130–137
- Visser M.E. (2008). Keeping up with a warming world; assessing the rate of adaptation to climate change. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 275, 649–659. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0997>
- Vitousek P.M. & Howarth R. (1991). Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochemistry* 13, 87–115
- Vörösmarty C.J., McIntyre P.B., Gessner M.O., Dudgeon D., Prusevich A., Green P., et al. (2010). Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature* 467, 555–561. <https://doi.org/10.1038/nature09440>
- Wallace J.B., Eggert S.L., Meyer J.L. & Webster J.R. (1997). Multiple trophic levels of a forest stream linked to terrestrial litter inputs. *Science* 277, 102–104
- Walther G.-R., Post E., Convey P., Menzel A., Parmesan C., Beebee T.J., et al. (2002). Ecological responses to recent climate change. *Nature* 416, 389–395
- Webster J.R. & Benfield E.F. (1986). Vascular Plant Breakdown in Freshwater Ecosystems. *Annual Review of Ecology and*

- Systematics* 17, 567–594.
<https://doi.org/10.1146/annurev.es.17.110186.003031>
- Woodward G., Dybkjaer J.B., Ólafsson J.S., Gíslason G.M., Hannesdóttir E.R. & Friberg N. (2010). Sentinel **systems on the razor's edge: effects** of warming on Arctic geothermal stream ecosystems: Impacts of warming on Icelandic stream ecosystems. *Global Change Biology* 16, 1979–1991.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.02052.x>
- Ylla I., Canhoto C. & Romaní A.M. (2014). Effects of Warming on Stream Biofilm Organic Matter Use Capabilities. *Microbial Ecology* 68, 132–145.
<https://doi.org/10.1007/s00248-014-0406-5>
- Ziegler, S. E., & Lyon, D. R. (2010). Factors regulating epilithic biofilm carbon cycling and release with nutrient enrichment in headwater streams. In *Global Change and River Ecosystems—Implications for Structure, Function and Ecosystem Services* (pp. 71-88). Springer, Dordrecht.

ANNEXES

“Seasonality reveals temperature effects on stream
ecosystem functioning”

(Jabiol et al., in prep)

Jérémy Jabiol^{1,2} | Alice Gossiaux² | François Guérold² | Michael Danger² | Antoine
Lecerf¹ | Pascal Poupin² | Franck Gilbert¹ | Eric Chauvet¹

¹Ecolab – Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement, Université de
Toulouse, UPS, CNRS, INPT, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France

²LIEC – Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, Université
de Lorraine, UMR 7360, Avenue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

Abstract

Most studies focusing on the consequences of global warming on ecosystem processes use either manipulative (field or laboratory experiments) or natural temperature gradients. Among them, latitudinal gradients received considerable attention despite obvious limitations. Conversely, the temperature effects across seasons received considerably less attention, though seasonality provides wide temperature gradients while keeping most other abiotic factors constant. An obvious argument against this approach is the phenology of organisms, which can lead to substantial variations in food web structure, population density and community structure.

In this study, using litter decomposition in streams as a model ecosystem process, we tested the hypothesis that seasonal variations of temperature could be an appropriate alternative to evaluate temperature effects in a natural context. Using litter bags (both coarse and fine mesh), we measured litter decomposition process in 12 streams (located in 2 regions) across 4 seasons. We also described decomposer (aquatic fungi and invertebrate detritivores) communities in each stream and season.

As expected, we found substantial variations of decomposer communities (density, diversity, species composition) across seasons. However, these differences did not always covary with temperature, and never exceeded the variations across streams within seasons. Besides, the temperature effects on litter decomposition we report (activation energy = 0.54 and 0.65 eV in fine and coarse mesh bags, respectively) are remarkably close to values reported from previous studies, either based on latitudinal or manipulative gradients of temperature. Taken together, these results suggest that seasonal temperature variations can be useful (at least as useful as more conventional approaches) to investigate on the temperature effects on ecosystem processes.

Key-words: Streams – litter decomposition – temperature – seasons – aquatic hyphomycetes – detritivores

Introduction

A growing number of studies aim at quantifying the consequences of global warming on ecosystem processes. Though, this evaluation is technically and scientifically challenging. Strategies used to evaluate temperature effects often have to balance between degree of realism, relevance of the targeted temporal and spatial scales, and our ability to disentangle between temperature effects and the influence of confounding factors. For instance, a common alternative to laboratory experiments is to use natural biogeographical temperature gradients such as latitude and altitude. This allows studying ecosystems in realistic contexts, with community compositions that reflect long term adaptations (e.g. population dynamics) to climatic conditions.

In contrast, very few studies compared processes across seasons to infer on temperature effects on ecosystem processes. Yet, it allows wide temperature gradients – as wide as along thousands of km along latitude – while ensuring a relative stability of many abiotic factors other than temperature (and light availability). The most obvious shortcoming against this approach is the well-known variations of community structure, composition and physiological state of the biota across seasons (phenology). For instance, seasonality drives the timing of plant bud breaking, flowering and leaf senescence, which influences resource availability to primary consumers. In animals, birth, reproduction and metamorphosis exhibit a strong seasonality, which leads to important variations of population density and community structure across seasons. However, in this perspective, the seasonal temperature gradient could be neither worse **nor better than more ‘conventional’ latitudinal and altitudinal temperature gradients** to study temperature effects. Many biotic and abiotic parameters actually vary along these gradients in extents that could exceed seasonal variations.

Leaf litter decomposition is a primary source of carbon for many terrestrial and aquatic food webs on Earth. Understanding temperature effects on leaf decomposition is essential, since it can have important feedbacks on biodiversity and climate by influencing the detrital carbon mineralization vs. sequestration balance. In streams, leaf litter decomposition involves both microbes and metazoans, dominated respectively by aquatic fungi and arthropods. Several studies described the variations of litter decomposition in streams along latitudinal gradients. Though, many biotic and abiotic parameters vary across biomes in these ecosystems. For instance, plant litter

quality as well as the timing of their input in streams vary considerably between tropical and temperate areas, with many tropical trees exhibiting lower quality and more protracted litterfall than most temperate trees. Decomposer communities also contrast between tropical and northern areas, with both detritivore and aquatic hyphomycete diversity being usually much lower under the tropics. Despite of these limitations, coherent patterns emerged from such studies, with a general stimulation of microbial decomposition with temperature, while the relative contribution of invertebrates seems to decrease with increasing temperature.

In this manuscript, we suggest that seasonal temperature variations could be appropriate to study temperature effects in stream ecosystem processes, as we expect seasonal variations in abiotic (except temperature) and biotic factors to be lower than along latitudinal gradients (for a similar temperature range). We measured litter decomposition rates in 4 seasons across 12 streams and quantified the temperature effects on process rates using the Arrhenius model. Moreover, we investigated on the covariation between decomposer communities and temperature along the temperature gradient. We addressed the hypothesis that temperature variations across seasons have similar effects on litter decomposition process than previously reported from latitudinal or manipulative gradients, meaning that temperature is the primary driver of seasonal variations of process rates. We also expected that variations in decomposer community (density, diversity, species composition) would be lower across seasons than across streams, thus giving support to the use of seasonal temperature gradients to study temperature effects. Finally, because of a generally high species redundancy among microbial species, apparent temperature effects on microbial decomposition are expected to better reflect the temperature dependency of metabolism than for invertebrates mediated decomposition, for which higher variability can be expected.

Material and methods

Study sites

The study was carried out concomitantly in forested headwater streams of the Vosges and Montagne Noire (6 streams in each region), two medium altitude (culminating at 1424 and 1210 m a.s.l., respectively) mountain ranges. Moreover, the

experiment was replicated in each region at 4 different periods of the year (once per season) to maximize the range of water temperature, which was continuously monitored using data loggers (Hobo Pendant UA-001-08, Onset Computer Corp., Massachusetts, USA) during the course of the experiments. Stream water chemistry was monitored three times per season and is reported in Appendix 1. In each stream and season, 4 standard 1/10 m² Surber samples were made in representative microhabitats, *i.e.* in similar riffles than where litter bags were placed (see below). Invertebrates were promptly fixed and preserved in 70% ethanol (final concentration). They were counted, identified to the family or genus level (depending on the taxonomic group) and assigned to functional feeding groups using Tachet et al. (2010) identification key. To determine aquatic hyphomycete communities, 3 replicates of 100 mL of stream water for each stream and season was filtered on membrane filters (SMWP, 5 µm pore size; Millipore, Bedford, MA, USA) and stained with Trypan blue (0.05% in 60% lactic acid). The spores trapped on the filters were identified and counted under the microscope at × 200 (Gessner, Bärlocher & Chauvet 2003).

Experimental set-up

In each of the 12 streams, litter bags containing 4.00 ± 0.02 g of air-dried hazelnut (*Corylus avellana* L.) leaf litter were deployed. Litter used in both regions was collected in the surroundings of the Montagne Noire just after abscission. Litter bags included fine mesh bags (0.5 mm) that allowed access to micro-organisms only while excluding detritivorous macroinvertebrates, and coarse mesh bags (10 mm) in which the whole decomposer community could access. Each stream included six replicates of coarse and fine mesh bags, deployed in the stream bed as six blocks located in distinct and representative stream sections.

Mesh bags were retrieved from the streams after 35, 28, 28 and 29 days for the winter, spring, summer and autumn experiments, which corresponded to a leaf mass remaining averaging ca. 70 and 40 % of initial dry mass in fine and coarse mesh bags, respectively. Litter bags were brought back to the laboratory in cool boxes, and leaves were cleaned under tap water, dried at 65°C to constant weight and dry mass determined to the nearest 0.01 g. Ash free dry mass (AFDM) of each sample was then determined by ignition of ca. 250 mg subsample of grounded litter (1.5 mm) at 550°C

for 3h. Because a flood occurred in the Montagne Noire during winter, the experiment was repeated in the same period during the consecutive year in this region.

Litter decomposition rates in fine and coarse mesh bags were calculated from the exponential decay after linear transformation (Graça 2005) in which:

$$M_t = M_0 e^{-kt} \quad (1)$$

with M_t and M_0 the final and initial AFDM, respectively, k the decomposition rate and t the time (days). Invertebrate induced decomposition rate (k_{inv}) was evaluated following Lecerf (2017) as follows:

$$k_{inv} = k_c - \frac{k_f - k_c}{\log(k_f) - \log(k_c)} \quad (2)$$

with k_c and k_f the decomposition rates in fine and coarse mesh bags, respectively.

Statistical analyses

Variations of temperature, conidia density and species richness and detritivore density and species richness were investigated using ANOVAs, with season, region and streams (nested into region) as factors. Moreover, the effect of temperature on conidia density and species richness and detritivore density and species richness was assessed using linear regressions. For these analyses, richness and density terms were log transformed to meet ANOVA and regression assumptions (checked graphically). Community composition of conidia and detritivores were compared along the temperature gradient as well as across seasons, regions and streams using a PERMANOVAs after standardization (Hellinger transformation) (Legendre) of species abundances.

Finally, temperature effects on decomposition rates were addressed using the Arrhenius model after linearization, which allowed calculating the activation energy of decomposition rates (microbial, total, and invertebrate-driven). We included, in separate analyses (ANCOVAs), the effects of season and region in the linearized Arrhenius model together with their interaction with temperature effect. This allowed to determine if the activation energy estimations varied across seasons, regions or streams (i.e. based on seasonal or regional temperature gradients). Moreover, because we used type I sum of squares (i.e. terms added sequentially), this allowed testing for regional and seasonal effects that are independent of temperature.

Results

Temperature reached 12.56 °C (averaged over each experimental period) in the warmest stream during summer, while it was as low as 3.51°C in the coldest stream during winter, leading to a *ca.* 9°C gradient between extreme temperatures. It was primarily influenced by season ($p < 0.001$) with the lowest average temperature occurring during winter, and the highest during summer. Differences also occurred between regions ($p < 0.001$) with higher temperature in the Montagne Noire streams. Comparatively weak variation occurred across streams within regions ($p = 0.098$; Fig.A1.1).

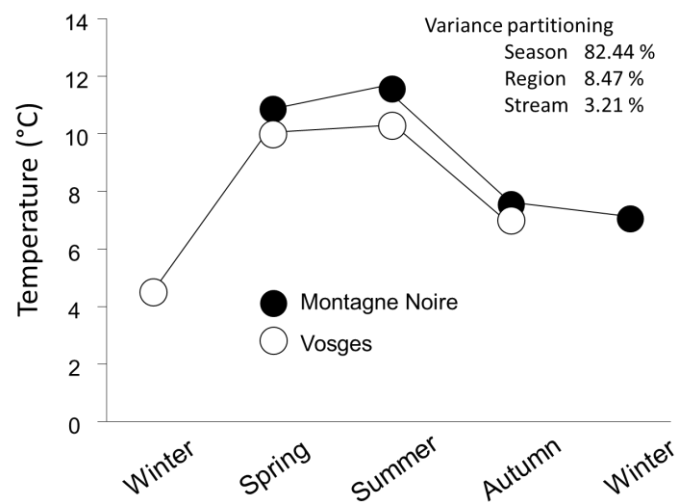


Figure A1.1 Temperature variations across seasons and regions (averaged between streams and over the experiment duration). Variance partitioning indicates the proportion of temperature variation explained by season, region and stream, respectively.

Decomposition rates in fine mesh bags (averaged per stream \times season) ranged from 0.009 ± 0.001 to 0.0317 ± 0.0048 day⁻¹. Decomposition was faster in coarse mesh bags, and ranged from 0.013 ± 0.003 to 0.172 ± 0.037 day⁻¹. Both were significantly stimulated by increased temperature following an Arrhenius relationship (Activation energy = 0.54 and 0.65 eV, respectively; Fig. A1.2a, b). By contrast, the effect of temperature on invertebrate-driven decomposition, was not significant, which was due to both lower estimate of activation energy (0.33 eV) and higher variability (Fig. A1.2c). ANCOVAs revealed significant variations of decomposition rates across season

(k_f , k_c and k_{inv}) and regions (k_c and k_{inv}) that were independent of temperature (Table A1.1). However, no significant interaction occurred between these factors and temperature (Table A1.1), indicating that activation energy estimate did not vary significantly, be it calculated using the seasonal or inter-regional temperature gradient.

Table A1.1 P-values from ANOVAs testing for the effects of temperature, season and region, as well as interaction between temperature and these factors on decomposition rates (microbial: k_f , invertebrate-driven: k_{inv} and total: k_c). Temperature is included using the linearized Arrhenius model. % sum of squares are provided. Since we used type I sums of squares, the effects reported for season and region are not influenced by temperature variations among seasons and regions.

	Df	Microbial	Invertebrates	Total
Temperature	1	<0.001	0.702	0.003
Season	3	0.017	0.005	0.002
Region	1	0.421	0.012	0.026
Temperature × Season	3	0.917	0.671	0.467
Temperature × Region	1	0.341	0.878	0.356
Residuals	38			

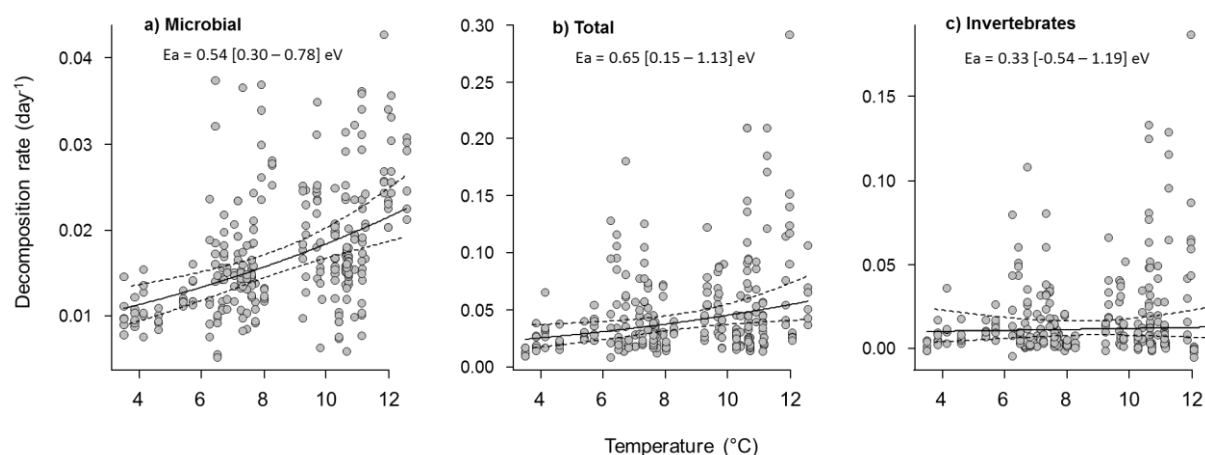


Figure A1.2 Relationships between temperature and decomposition rates in fine mesh bags (a), coarse mesh bags (b) and due to invertebrate activity (c) addressed following Lecerf 2017. Regression lines are Arrhenius regressions and dotted lines decipher the 95% confidence intervals. Activation energies (E_a) are provided with 95% confidence intervals.

Communities of both microbial decomposers and detritivorous invertebrates exhibited variations across seasons, regions and streams (Table A1.2; Fig. A1.3). These variations, however, were not always related to temperature changes. For instance, conidial and detritivore density were not influenced by temperature *per se*, though considerable variations occurred among seasons and regions, respectively. Species richness followed opposite patterns between microbial decomposers and invertebrates. Conidial diversity increased with temperature while detritivore species richness decreased with temperature. Detritivore species richness variations across streams were high (even within regions), while a similar portion of the conidial species richness variability was explained by season, region and stream identity. Finally, stream identity was the primary driver of species community composition for both detritivore and fungal assemblages, though season had a substantial effect as well. Temperature *per se* appeared to have little influence on the species assemblages over our regional and seasonal gradients.

Table A1.2 Temperature effect (1st column) and partitioning of the variance (columns 2-4) due to seasonal and spatial (inter and intra-regional) variations in decomposer density, richness and species composition. For decomposers density and richness, temperature effect assessment and variance partitioning were carried out using regression and ANOVA. For community composition, they were carried out using PERMANOVA (see Material & Methods). The temperature column indicates the sign of the temperature effect when significant (otherwise n.s), and the portion of variance explained by temperature for PERMANOVA. All other values are percentage of explained variance, with significant effects identified by a star (otherwise n.s)

	Temperature	Season	Region	Stream
Conidia density	n.s	56.47 % *	1.22 % n.s	5.77 % n.s
Conidia species richness	+	24.14 % *	24.46 % *	19.13 % n.s
Conidia species composition	3.83 %	21.23 % *	9.03 % *	26.99 % *
Detritivore density	n.s	3.54 % n.s	47.64 % *	30.02 % *
Detritivore species richness	-	9.34 % *	6.75 % *	43.35 % *
Detritivore species composition	1.81 %	10.74 % *	14.13 % *	35.11 % *

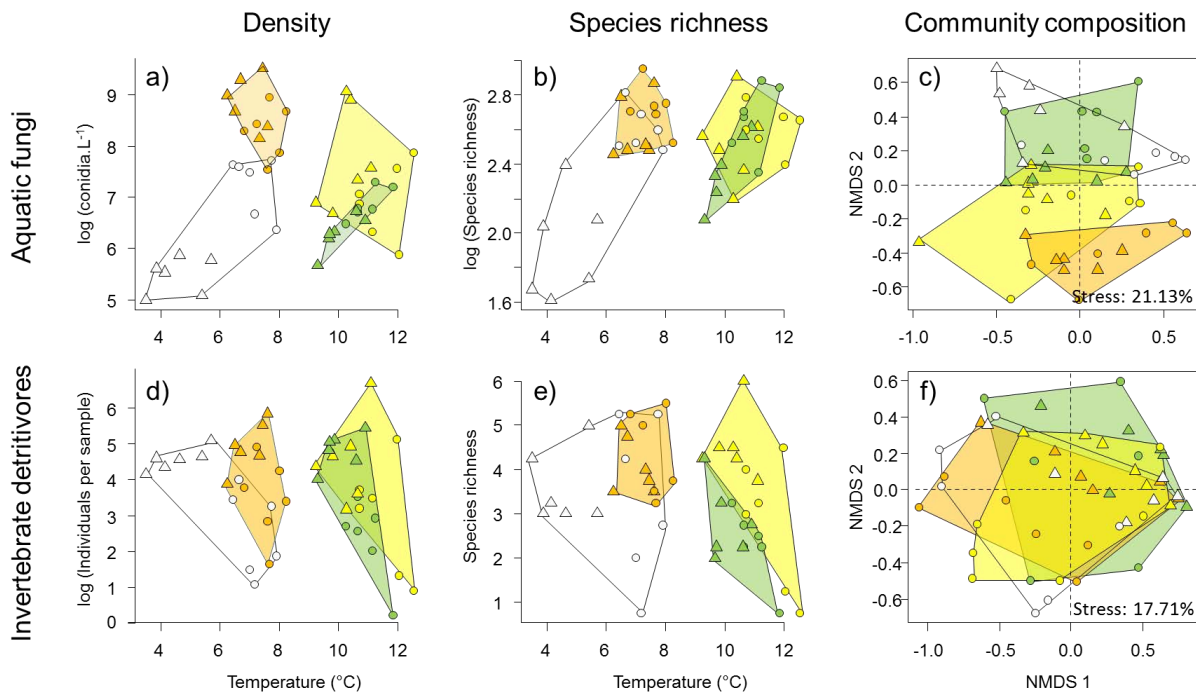


Figure A1.3 Variations of decomposer (up: aquatic fungi and down: invertebrate detritivores) density (a, d) and species richness (b, e) along the temperature gradient, and NMDS (c, f) illustrating the variation of species community composition across seasons, regions and streams. Each symbol is the average of 6 replicates (in a, b, d, e), 3 replicates (in c) and 4 replicates (in f). Triangles and circles are streams from the Vosges and Montagne Noire, respectively. White: winter, green: spring, yellow: summer and orange: autumn

Discussion

The chief outcome of this study is to establish that seasonal temperature variations can be useful to investigate on temperature effects on ecosystem processes, despite phenological seasonal variations that act on resources and consumer. Using temperature variations across 4 seasons and 2 regions, we found activation energy for litter decomposition rates in streams that are consistent with existing knowledge. Our estimate of microbial decomposition activation energy (0.54 eV) is remarkably close to values previously reported from laboratory experiments (0.42 – 0.60 eV calculated from Ferreira & Chauvet 2011a,b; Jabiol et al. in prep.: 0.56 eV), manipulative stream experiments (calculated from Ferreira & Canhoto 2015: 0.42 – 0.71 eV), and from large scale latitudinal gradients (e.g. Follstad-Shah et al. 2017: 0.37 eV; Boyero et al. 2011: 0.46 eV). Temperature effects on litter decomposition in coarse mesh bags is less clear

and strongly depends on the context: both nil (Boyero et al. 2011) and positive effects ($E_a = 0.16 - 0.88$ eV depending on the litter species) have been reported so far along latitudinal gradients, manipulative (Ferreira & Canhoto 2015: nonsignificant to 0.86 eV depending on the season) and laboratory experiments (Jabiol et al. in prep.: non-significant to 0.86 eV, depending on the detritivore assemblage). Accordingly, the results we report here (0.65 eV) support the fact that positive effects of temperature on decomposition in coarse mesh bags are mostly due to higher microbial (0.54 eV) but not invertebrate (0.33 eV, non-significant) decomposition.

These congruence with past studies occurs despite substantial effect of season on decomposer communities. Among the seasonal changes we report in decomposer communities, some were not monotonically related to temperature. For instance conidia and detritivore density were high in autumn (despite cold temperature) and low in spring (despite warm temperature) because population dynamics are synchronized with litter availability in streams. Community structure and composition were not significantly affected by temperature *per se*, but seasonal effects were always much weaker than inter- and intra-regional variations. An exception is conidia species richness, for which we found substantial temperature and seasonal influence. However, there is no evidence that aquatic species richness has a strong influence on microbial litter decomposition, since considerable functional redundancy seems to occur among species. It is thus unlikely that seasonal shifts in decomposer community structure and composition biased our estimate of activation energies. It may have, however, add statistical noise and explain the non-significance of temperature effects on invertebrate-driven decomposition.

Changes that are not related to density and community composition also occur across seasons. For instance, many detritivorous invertebrates are insect larvae with terrestrial imagines. Insect larvae individual biomass and nutrient requirements may thus be at their highest just before emergence (in spring for most taxa), leading to substantial shifts in per capita feeding rates and feeding preferences. Moreover, as a result of terrestrial plant phenology, plant litter availability in streams is scarce in spring and summer. This could increase the appetite of our experimental litter bags and lead to an overestimation of invertebrate litter consumption during the warmest seasons. However, such biases would have led to overestimations of the activation energy for invertebrate activity, which we estimated as negligible. Light availability also

exhibits strong seasonal variations. It may have a direct effect on aquatic hyphomycete activity, and stimulates the growth of aquatic primary producers. Phototrophic biomass can constitute alternative resources to decomposers, or influence heterotrophic microbial pathways through priming effect. It is thought to potentially have an indirect influence on the seasonal variations of litter decomposition (Gossiaux et al. 2019), though the exact outcomes of such interactions remain poorly predictable.

Even though strong variations in decomposer communities and activities occur across seasons, our results show that seasonal temperature variations are a powerful tool to investigate on temperature effects on ecosystem processes. It allows broad temperature gradients in natural, realistic contexts (contrary to laboratory experiments) that can be replicated in as many systems as needed (contrary to thermal springs or manipulative stream experiments). Moreover, the seasonal repetition of experiments in a single place minimizes the variations of many other – potentially confounding – factors, such as stream morphology, water chemistry, catchment scale context that occur when studying large scale spatial gradients. Even the variations of decomposer communities, which can be high across seasons, appeared much lower than across streams located in the same region, and even more so across distant biogeographic areas (i.e. different biomes). This, together with the general consistency of our results with existing data, are a strong support to the use of seasonal temperature gradients as a surrogate of longer term (e.g. decades) temperature variations to study global warming effects on ecosystem processes.

Acknowledgments

We are grateful to Sylvain Lamothe and Philippe Wagner for technical assistance, Frederic Julien and Philippe Rousselle for stream water analyses, and Jonathan Bouquerel for invertebrate identification. The experiment is part of the *FunctionalStreams* project funded by the French National Research Agency [grant ANR-14-CE01-0009-01].

References

- Boyero L., Pearson R.G., Gessner M.O., Barmuta L.A., Ferreira V., Graça M.A., et al. (2011). A global experiment suggests climate warming will not accelerate litter decomposition in streams but might reduce carbon sequestration. *Ecology Letters* 14, 289–294
- Ferreira V. & Canhoto C. (2015). Future increase in temperature may stimulate litter decomposition in temperate mountain streams: evidence from a stream manipulation experiment. *Freshwater Biology* 60, 881–892. <https://doi.org/10.1111/fwb.12539>
- Ferreira V. & Chauvet E. (2011a). Future increase in temperature more than decrease in litter quality can affect microbial litter decomposition in streams. *Oecologia* 167, 279–291. <https://doi.org/10.1007/s00442-011-1976-2>
- Ferreira V. & Chauvet E. (2011b). Synergistic effects of water temperature and dissolved nutrients on litter decomposition and associated fungi. *Global Change Biology* 17, 551–564. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02185.x>
- Follstad Shah J.J., Kominoski J.S., Ardón M., Dodds W.K., Gessner M.O., Griffiths N.A., et al. (2017). Global synthesis of the temperature sensitivity of leaf litter breakdown in streams and rivers. *Global Change Biology* 23, 3064–3075. <https://doi.org/10.1111/gcb.13609>
- Gessner M.O. Bärlocher F. & Chauvet E. (2003) Qualitative and quantitative analyses of aquatic hyphomycetes in streams in: *Freshwater Mycology* (Tsui & Hyde eds), pp 127-157. Fungal Diversity Press, Hong Kong
- Gossiaux A., Jabiol J., Poupin P., Chauvet E. & Guérol F. (2019). Seasonal variations overwhelm temperature effects on microbial processes in headwater streams: insights from a temperate thermal spring. *Aquatic Sciences* 81:30. <https://doi.org/10.1007/s00027-019-0627-2>
- Graça M.A.S., Bärlocher F. & Gessner M.O. eds (2005). *Methods to study litter decomposition: a practical guide*. Springer, Dordrecht ; New York.
- Lecerf A. (2019) Methods for estimating the effect of litterbag mesh size on decomposition *Ecological Modelling* 362, 65-68
- Tachet H., Richoux P., Bournaud M. & Usseglio-Polatera P. (2010). ***Invertébrés d'eau douce: systématique, biologie, écologie***, CNRS éditions.

“Temperature effects on a detritus-based stream food web: variations across processes, organisms and levels of biological organization”

(Jabiol et al., in prep)

Jérémy Jabiol^{1,2} | Alice Gossiaux² | Antoine Lecerf¹ | Thibaut Rota¹ | François Guérold² | Michael Danger² | Pascal Poupin² | Franck Gilbert¹ | Eric Chauvet¹

¹Ecolab – Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement, Université de Toulouse, UPS, CNRS, INPT, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France

²LIEC – Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, Université de Lorraine, UMR 7360, Avenue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

Abstract

1. Temperature is known to stimulate metabolism with knock-on effects on multiple biological processes. These effects may however vary across processes, types of organisms or levels of biological organization. They can also vary with nutrient availability, with potentially stronger temperature effects when nutrients are not limiting. This context dependence of temperature effects on processes questions our ability to anticipate their consequences on ecosystems in a changing world.
2. In headwater streams, the decomposition of allochthonous leaf litter is a key process supporting food webs and ecosystem functions. It is driven by the activity of both microbial decomposers and invertebrates, and is known to respond to both temperature and nutrient availability. Heterotrophic stream food webs are highly tractable and a perfect test ground to investigate the variations of temperature effects on processes across types of organisms (microbes vs. invertebrates), resource availability levels (nutrient concentration) and levels of biological organization (from individual to ecosystem).
3. In a microcosm experiment, we measured the effects of temperature (4 levels) and nitrogen (N) availability (4 levels) on 2 biological processes (decomposers' respiration and litter decomposition) in different contexts of food web complexity. The latter included one treatment without invertebrate decomposers (microbial decomposers only), 3 single invertebrate taxa (*Gammarus*, *Potamophylax* and *Sericostoma*) treatments, and one mixed invertebrate taxa treatment (3 species altogether).
4. Microbial processes increased nearly exponentially with temperature (Arrhenius model, activation energy = 0.56 and 1.00 eV for litter decomposition and respiration), while invertebrate-driven processes increased (activation energy = 0.47–1.15 eV) up to a maximal value at an intermediate temperature (11.5–15.8°C depending on species and process), above which process rates decreased. By contrast, litter consumption in mixed invertebrate species treatments was not significantly influenced by temperature, because of a negative effect of species mixing occurring above 12°C. N had a weaker

influence, only slightly stimulating litter consumption by mixed-species invertebrates, which limited the scope for synergies with temperature effects.

5. Our results raise issues about how aquatic litter consumers meet their energy requirements at high temperature, and suggest that a general consequence of warming could be loss of C by headwater streams food webs. In several aspects, our results deviate from expectations based on universal relationships between temperature and individual metabolism (e.g. metabolic theory of ecology), suggesting that we may need to move forward toward less simplistic assumptions to predict the consequence of warming on ecosystem processes.

Keywords: Temperature – Nitrogen – Litter decomposition – Respiration – Decomposers

Introduction

Understanding the consequences of global changes for ecosystems is currently one of the major challenges for ecologists. Air temperature is expected to increase by up to 4 °C by the end of the century (Collins et al. 2013). Deep impacts of temperature change have been documented on virtually all levels of biological organizations, from individual to ecosystems, as temperature is a prominent driver of biological activities that sustain life and major biogeochemical cycles. Temperature effect on individual performance and its consequences on population dynamics and species distribution are relatively well understood whereas mounting evidence indicates that temperature affects carbon (C) uptake, transformation, and release by freshwaters at various spatial and temporal scales (Yvon-Durocher et al. 2012). Although these findings convey the idea that temperature response of ecological processes is predictable, both inconsistent results from different case studies or tested environmental conditions and considerable variation unexplained by temperature call for caution when extrapolating findings. We currently still lack sufficient mechanistic understanding of how temperature effect scales up across different levels of biological organizations.

In streams and rivers, temperature is expected to increase concomitantly with air temperature (0.6–1.0 °C for each degree of increase in air temperature; Eaton & Scheller 1996), and the trend in surface water warming may be exacerbated by local-scale hydrological alteration and land-use (e.g. riparian forest clearing, presence of dams, channelization; Poole & Berman 2001). Plant litter decomposition is a fundamental ecological process in river networks (Petersen & Cummins 1974), fueling heterotrophic ecosystems with energy in headwaters (Wallace et al. 1997) and delivering C products downstream that is stored in sediments or incorporated into biomass. Litter decomposition involves complex food webs, which typically include various organisms such as micro-organisms (bacteria and fungi) and detritivorous macro-invertebrates (Gessner et al. 1999; Graça 2001). The activity of micro-organisms, dominated by aquatic hyphomycetes (Suberkropp 1992), is known to increase litter palatability (digestion of refractory litter components) and to improve its nutritive value for macro-consumers, both by increasing litter nutrient content and changing the nature of detritus C compounds (Krauss et al. 2011).

Positive effects of water temperature on leaf decomposition have been widely reported in headwater streams (e.g., Ferreira & Canhoto 2014; Martínez et al. 2014). Temperature effect on decomposer biomass and per capita activity should result in changes in litter decomposition rate (Dang et al. 2009). Biological activity of fungal decomposers and detritivores is likely to increase with temperature, reaching a stress level above which individual performance declines (cf. Thermal Performance Curves; Dang et al. 2009; Galic & Forbes 2017). The scarcity of detritivores in tropical areas and clear trends for cold-adaptation (Irons et al. 1994; Boyero et al. 2012) suggest that rising part of the temperature-decomposition relationship occurs over a narrow temperature range and the scope for negative warming effect on decomposition by detritivores is large. This hypothesis is supported by results from Friberg et al. (2009) who found small shredder numbers in the warmest stream investigated. Dominant fungal decomposer communities often comprise both warm- and cold-adapted species, notably in temperate streams (Gessner et al. 1993), suggesting that species replacement along temperature gradient will lead to enhancement of temperature effect over a large temperature range. In tropical streams, aquatic fungal decomposers tend to be as scarce as detritivores (Duarte et al. 2016; Sahadevan 2019), but could be substituted by a higher biomass of litter associated bacteria (Graça et al. 2016).

Individual metabolic rate sets the pace at which energy and materials flow in and out organisms, providing a straightforward rationale for linking physiological responses of litter consumer to temperature and its effect on litter decomposition. A universal temperature dependence of metabolic rate demonstrated over a broad range of taxa (Gillooly et al. 2001; Brown et al. 2004) should sustain a consistently predictable temperature effect on plant litter decomposition rate. However, mixed empirical support from streams indicates that metabolic constraints over litter consumers may not be the unique driver of temperature-decomposition relationship (Boyero et al. 2011; Follstad-Shah et al. 2017; Gossiaux et al. 2019). Boyero et al. (2011) suggested that adaptation of stream detritivores to cold environments may dampen temperature dependence of litter decomposition rate through compensation of microbial vs invertebrate activity as temperature changes. Follstad-Shah et al. (2017) further reported temperature dependence of decomposition rate lower than expected based on metabolism but similar to that reported for exoenzyme activity, which would ultimately mediate temperature effects on microbial decomposition and conditioning.

The latter study further indicates that temperature change might differentially affect litter decomposition rate depending on the quality of leaf litter prior incubation or the climatic region where decomposition occurs (Follstad-Shah et al. 2017). These findings together with several other results point toward the fact that response of litter decomposition to temperature might be more complex and less predictable than generally expected based on individual metabolic response.

Mounting evidence indicates that temperature increase challenges the ability of consumers to meet their nutritional requirement (Lemoine & Burkepile 2012). Resource availability and quality to microbial decomposers and detritivores should be therefore important in mediating the temperature sensitivity of litter decomposition rate (e.g. Ott et al. 2012). Microbial decomposers strongly rely on dissolved nutrients to meet their requirement for biomass and exoenzyme production (Cheever et al. 2012; Gulis et al. 2017). Dissolved nutrients also benefit to detritivores as nutrient immobilization in microbial biomass increases litter palatability through lessening stoichiometric imbalance between detritivore needs and their resources (Manning et al. 2015; Frainer et al. 2016). Nutrient availability could thus mediate the response of litter consumers and overall decomposition rate to temperature. Results from laboratory microcosm experiments suggest that temperature enhances nutrient use efficiency of microbial consumers and that temperature and nutrient availability act synergistically to determine microbial decomposition rate (Ferreira & Chauvet 2011; Fernandes et al. 2014). Detritivores may better cope with energetic challenge posed by increased temperature through feeding on nutrient-enriched resources. However, such synergistic effect may not be apparent if high nutrient loading negatively affects detritivore performance as suggested in previous study hinting at reduced detritivore-mediated decomposition of plant litter in highly eutrophic streams (Woodward et al. 2012). An integrated understanding of how different consumer types respond to joint effect of temperature rising and nutrient input (e.g. for inorganic N, caused by agricultural practices or atmospheric deposition) is essential if we are to understand the impact of global changes on litter decomposition.

In this study, we sought to gain a better mechanistic understanding of how water temperature influences litter decomposition rate by examining the metabolic response of microbial decomposers and invertebrate detritivores to rising temperature and whether detritivores can influence temperature effect on litter decomposition rate. In

a controlled laboratory experiment we manipulated temperature along with nutrient availability in fully factorial fashion so as to test for the role of resource availability and quality to litter consumer in mediating temperature effect on decomposition. We focused on inorganic nitrogen as nutrient since it is among the main drivers of stream eutrophication across Europe (Galloway et al. 2008) and is an important element potentially mediating temperature effect on decomposition (Fernandes et al. 2014). Mixed-species assemblages were used to assess temperature effect on microbial decomposers whereas it was possible for detritivores to obtain both species-specific and assemblage-level responses. Our main expectation deriving from the metabolic theory of ecology (Brown et al. 2004) were that the Arrhenius model with an activation energy of 0.65 eV describes well the pattern of respiration and litter decomposition rates along the temperature gradient. However, different activation energies were expected between response variables (respiration vs consumption) due to possible mismatch between energy demand and resource intake, between osmotrophs (microbial decomposers) and phagotrophs (invertebrate detritivores), between levels of biological organization (population vs assemblage of invertebrates) due to averaging effects, and across nitrogen gradient, for instance through releasing consumers from exacerbated resource limitation at high temperature.

Material & methods

Litter inoculation and microbial activity

Hazelnut (*Corylus avellana* L.) leaf litter was collected just after abscission in the Montagne Noire during fall 2016, and air dried at room temperature. 12-mm leaf disks (each including a single secondary vein) were then cut using a cork borer and allocated to the different nutrient-by-temperature treatment combinations. Batches of 240 leaf disks were placed in sixteen 500 mL Erlenmeyer flasks and autoclaved at 121°C during 20 min in 300 mL of demineralized water.

After autoclaving, 300 mL of a microbial spore suspension was added to each Erlenmeyer flask. To obtain the spore suspension, approximately 400 g (dry mass) of alder and oak leaf litter had been distributed in 4 fine mesh bags placed in the Peyreblanque stream for 21 days prior to the experiment. Litter bags were then

retrieved from the stream and transported to the laboratory in cooler boxes. Leaves were carefully rinsed with tap water before being placed in 10 L buckets filled with demineralized water, under constant agitation and aeration at 12 °C. Inoculation of the Erlenmeyer flasks with the resulting suspension was performed after 48 h. The density and identity of aquatic hyphomycete conidia in this inoculum were controlled based on microscopic examination of 200 conidia on 3 replicates of 10 mL of conidial suspension, filtered on a 5 µm membrane and fixed with 0.5 % Trypan blue in 60 % lactic acid. Each 10 mL aliquot contained *ca.* 11,000 conidia (10,926 ± 1721 SD) belonging to 8-11 species. Conidial assemblages were dominated by *Flagellospora curvula*, *Articulospora tetracladia*, *Alatospora acuminata*, and *Tetrachaetum elegans* (40.2, 33.7, 10.0 and 7.0 % of total conidia, respectively). After 48 h, conidial suspension was replaced by 300 mL of filtered (Whatman International, Florham Park, NJ, U.S.A.; 0.45 µm pore size) stream water with or without addition of KNO₃ **depending on N treatment. Water originated from the Corbières stream (43°27'11" N, 2°16'49"E, 880 m asl), a circumneutral oligotrophic stream of the Montagne Noire,** was used for this purpose. The stream water with or without KNO₃ was renewed 3 times a week during the subsequent 2 weeks.

Four different N levels were used, with one ‘ambient’ treatment, corresponding to the stream N concentration (0.71 mg L⁻¹ ± 0.01 SD, *n* = 3), and 3 enriched treatments with KNO₃ addition of 0.7, 1.4 and 2.1 mg N L⁻¹ (final concentrations 0.71, 1.41, 2.11 and 2.81 mg N L⁻¹). **This range reflects the “natural” variations of N concentrations** among streams in the Montagne Noire. One Erlenmeyer flask from each nutrient treatment was allocated to one temperature among four (8, 10, 12 or 14 °C), leading to a total of 16 (*i.e.*, 4 × 4) N × temperature combinations. Temperature levels correspond to a natural range of variations that occurs during spring – the season at which the experiment was carried out – in the Montagne Noire streams. Temperature treatments were achieved by regulating the temperature in large containers (30 × 52 × 16 cm) filled with 8 L of tap water and used as a water bath. All the Erlenmeyer flasks belonging to the same temperature treatment were placed in the same water bath, in which temperature was constantly monitored using data loggers (HOBO Temperature DataLogger; Onset Computer Corporation, Bourne, MA, USA). During microbial inoculation, oxygen supply and leaf disk agitation were carried out by a homogenous aeration using a Pasteur pipette.

Feeding experiment and leaf decomposition

After 14 days of inoculation, batches of 10 leaf disks from the different N × temperature combinations were distributed to microcosms. All remaining leaf disks were frozen for later analyses. Microcosms consisted in plastic containers (11 × 8 × 3 cm) supplied with homogenous substratum (*ca.* 40 g of sand, grain size < 2 mm). They were filled with 100 mL of filtered stream water with or without added KNO₃ depending on N treatment and placed in the water bath at the corresponding temperature. Each microcosm contained either no invertebrate (control), 3 individuals belonging to the same species (single-species treatments), or 3 individuals belonging to 3 different species (mixed-species treatment). These species included a freshwater crustacean *Gammarus fossarum* Koch and 2 caddisfly larvae, namely *Sericostoma personatum* Kirby & Spence and *Potamophylax cingulatus* Stephens. *Potamophylax* larvae were collected in the Peyreblanque stream, while *Sericostoma* and *Gammarus* originated from nearby streams (Alzeau and Corbières, respectively). All invertebrates were acclimated to laboratory conditions for 7 days and starved for 3 days prior to the experiment, at the temperature corresponding to the treatment they were attributed to. All N × temperature combinations were fully crossed with the 5 invertebrate conditions (control, 3 single-species treatments, one mixed-species treatment), and all combinations were replicated 3 times which led to a total of 16 × 5 × 3, *i.e.* 240, microcosms.

The feeding experiment ended at different times according to the rate at which leaf disks were consumed in each detritivore treatment. It lasted *ca.* 6, 24, 30 and 52 hours for *Potamophylax*, mixed-species treatment, *Gammarus* and *Sericostoma*, respectively. At the end of the experiment, 7 leaf disks from the control microcosms (without detritivores) were collected and freeze-dried for later ergosterol analysis. The 3 other leaf disks were used to measure microbial respiration. Disks from other detritivore treatments as well as detritivore individuals were frozen, freeze-dried and weighed to the nearest 0.01 mg to determine invertebrate consumption rates. Leaf microbial decomposition rate was expressed as the difference between initial and final litter dry mass divided by time. Invertebrate consumption rate was calculated as the difference between dry mass of consumed and control (*i.e.* from the corresponding

treatment without invertebrates) leaf disks, and was expressed per invertebrate dry mass and time.

Respiration measurements

Respiration was measured after the end of the feeding experiment on batches of 3 control leaf disks (from treatments without invertebrates), as well as on additional (*i.e.* not used in the feeding experiment) individuals of the 3 detritivore species (\times 12 replicates). Analyses were performed in climatic chambers using 24-wells microplates with one oxygen sensor spot at the bottom of each well (SDR SensorDish®; PreSens Precision Sensing, Regensburg, Germany). Microbial respiration was measured in all temperature \times N combinations, while invertebrate respiration was assessed in stream water only (no KNO₃ addition). Each invertebrate individual was tested at a single temperature at which it was acclimated for 48 h prior to the assay. After the assay, invertebrates and leaf disks were frozen, freeze-dried and weighed to the nearest 0.01 mg. At each assay, wells containing water only were used as blanks.

Each assay ran for up to 1 h, with the first 10 min being excluded from the analysis. For invertebrates, assays were stopped when O₂ concentration fell below 80 $\mu\text{mol O}_2 \text{ L}^{-1}$, a threshold below which O₂ concentration decrease became non-linear. Oxygen consumption rates were then calculated as the O₂ concentration decrease per unit of time, and respiration rates as the mass of C emitted per units of time and litter or invertebrate dry mass, while assuming a respiratory quotient equal to 1 (*i.e.* one mole of CO₂ emitted for each mole of O₂ consumed). The 3 leaf disks were pooled with the 7 remaining leaf disks and used for ergosterol analysis. Temperature inside the chambers were constantly monitored during the respiration assays using smart button data loggers.

Ergosterol and elemental analyses

N litter analyses were performed on extra batches of 10 leaf disks after microbial inoculation for each combination of N \times temperature. N litter concentration was determined using a CHN analyzer (Flash 200, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) on ground material (mixer mill Retsch MM200; Retsch, Haan, Germany). Ergosterol content of the leaf disks, as a biomarker for fungal biomass, was determined

by High Performance Liquid Chromatography after extraction in alkaline methanol and purification of the extract by means of solid-phase extraction (Gessner 2005). Fungal biomass was determined from a standard conversion factor between ergosterol content and fungal biomass (5.5 mg ergosterol per g of mycelium; Gessner & Chauvet 1993).

Statistical analyses

To investigate the temperature effect on processes, we used the linearized Arrhenius relationship between log-transformed process rates and temperature (Gillooly et al. 2001). This allowed us to determine the activation energy of the process, which can be used for comparison of temperature effects across processes and studies.

$$\ln(I) = \ln(i_0) - Ea \times (1/kT)$$

where I is the process rate, i_0 a normalization constant independent of temperature, Ea the activation energy (eV), k the Boltzmann constant (8.672×10^{-5} eV K⁻¹) and T the temperature (K).

One ANCOVA model was performed for each process (respiration and leaf decomposition) and organism separately (i.e. microbes, invertebrate single-species and mixed-species) to test for the combined effects of temperature and N concentration. Because we did not expect a linear response of processes to N availability, N was included as a factor in the models. For microbial processes, litter N content and fungal biomass, the statistical analyses were performed on the average values of samples originating from the same Erlenmeyer flask to avoid pseudo-replication. For invertebrates, because processes followed hump-shaped relationships, ANCOVAs (using the Arrhenius model) were fitted on the rising part of the curves (i.e. excluding the highest temperature level), while gross N effects were tested separately using ANOVAs (with TukeyHSD post-hoc comparisons) including the entire temperature gradient.

The ratio between respiration and consumption rate, which scales with the proportion of detrital C converted into decomposer biomass, was compared between organisms and along the temperature gradient using an ANCOVA with species identity and temperature as explanatory variables. ANCOVAs were also used to compare fungal

biomass and litter N content among temperature (continuous) and N availability (factor, 4 levels) treatments. For each ANCOVA model, the comparison between N availability levels was performed using Tukey HSD test when N availability had a significant effect.

Finally, the effect of invertebrate species mixing on leaf consumption rates was addressed using the comparison between observed and expected values of this process (Chapman et al. 1988):

$$\text{Mixing effect} = (\text{Observed} - \text{Expected}) / \text{Expected}$$

where Observed values are the feeding rates in 3-species assemblages while Expected values are based on the sum of the average feeding rates of each taxa in single-species treatments. Mixing effects were considered significant when the 95% confidence interval did not overlap 0.

All statistics were performed using R 3.3.1 (R core team, 2016).

Results

General trends

A two-fold range (ca. 8-16°C) was achieved for water temperature when assessing respiration rate of microbial communities on leaf litter and individual detritivores. Due to practical limitation, a lower upper temperature level (ca. 14°C) was achieved during experiment assessing litter decomposition rate. Response variables tended to be greater at high vs low temperature. Temperature effects were stronger on respiration than on litter consumption rates for all organisms. It resulted in a significant decrease of C ingestion efficiency (Decomposition / respiration ratio) along the temperature gradient, though with contrasting severity across organisms (Fig. A2.1). N addition had less consistent and most often weaker effects on response variables than temperature. The lack of significant interaction indicate that N addition did not alter temperature effects (Table A2.1).

Table A2.1 *P*-values associated with ANCOVA models testing for the effect of temperature, nitrogen treatments and their interaction on microbial and invertebrate processes as well as N and fungal biomass litter content. For microbial and invertebrate processes, the temperature effect was fitted according to the Arrhenius linearized model (see Material & Methods), while for litter N and fungal biomass, a linear relationship was assumed. N treatments were included as a factor. Significant *p* values are given in bold.

			Temperature	Nitrogen	Interaction	
			(df = 1)	(df = 3)	(df = 3)	
Microbial	Leaf mass loss	mg C d ⁻¹	0.036	0.058	0.539	
	Respiration	mg C mg litter DM ⁻¹ d ⁻¹	<0.001	0.698	0.616	
Litter	N content	% of litter DM	0.017	0.067	0.116	
	Fungal biomass	% of litter DM	0.003	0.933	0.843	
Invertebrates	<i>Gammarus</i>	Consumption	mg C mg invert. DM ⁻¹ d ⁻¹	0.001	0.609	0.226
	<i>Potamophylax</i>	Consumption	mg C mg invert. DM ⁻¹ d ⁻¹	0.021	0.109	0.827
	<i>Sericostoma</i>	Consumption	mg C mg invert. DM ⁻¹ d ⁻¹	0.118	0.494	0.645
	Mixed-species	Consumption	mg C mg invert. DM ⁻¹ d ⁻¹	0.877	0.032	0.460

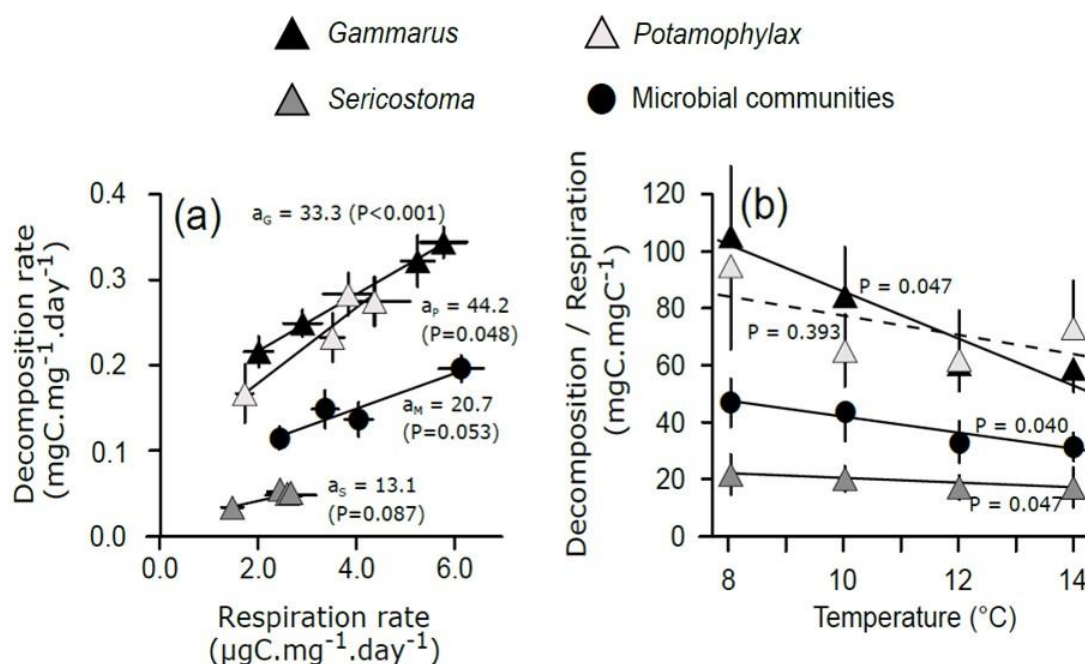


Figure A2.1 (a) Relationship between decomposition and respiration in the different organisms. For each organism, the 4 symbols correspond to the different temperature treatments. The slope of the regression between respiration and leaf decomposition rates is given for each organism (a_G : *Gammarus*, a_P : *Potamophylax*, a_S : *Sericostoma*, a_M : micro-organisms) together with the corresponding *P*-values (b) Variation of the decomposition / respiration ratio along the temperature gradient in the different organisms. Regression lines (dotted if non-significant) are provided together with the *P*-values of the regression. In (a), horizontal and vertical error bars are *SE*. To calculate errors associated with the ratio of average decomposition and respiration rates, we used a propagation of uncertainty assuming that the relative error of the ratio equals the sum of the relative errors of leaf decomposition and respiration rates

Microbial decomposers

Microbial respiration and to a lesser extent decomposition increased nearly exponentially along the temperature gradient (Fig. A2.2a, d) and this effect was independent of nitrogen content (ANCOVA; interaction temperature \times N: P; Table A2.1). Activation energies estimated overall nitrogen levels were 1.00 eV and 0.56 eV for respiration and decomposition rates, respectively (Table A2.1). Fungi achieved higher biomass and immobilized more nitrogen at high vs low temperature (Table A2.1) and this temperature effect seems to reach a plateau between 10-12°C for fungal biomass whereas saturation was less evident for litter N content (Fig. 3).

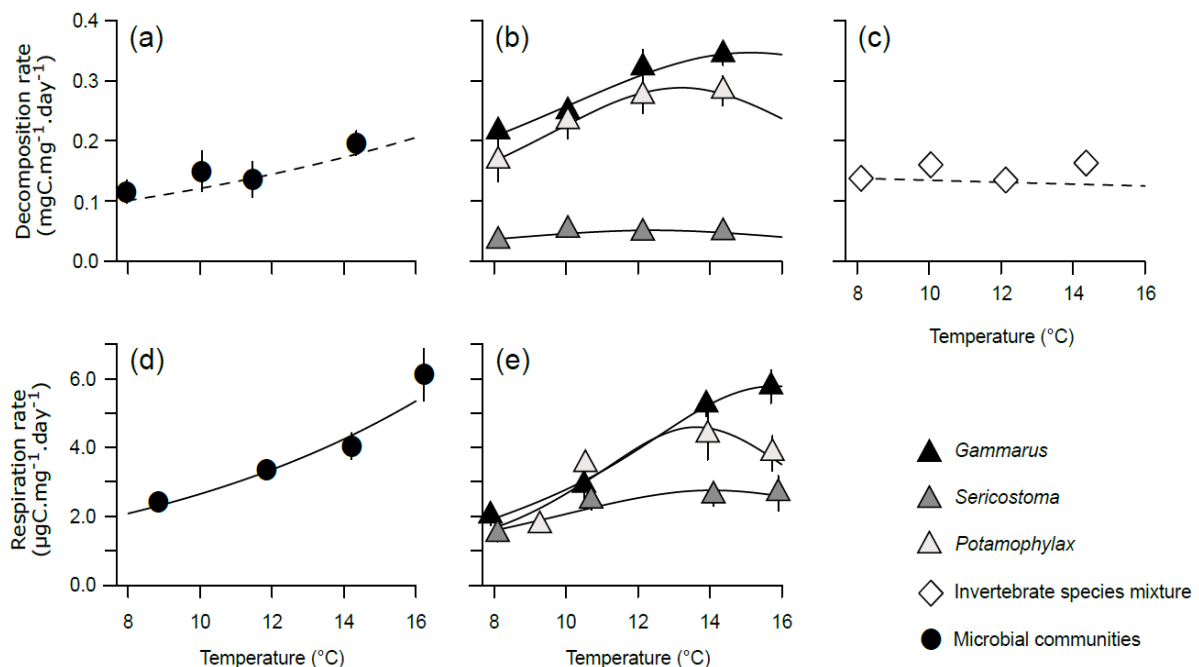


Figure A2.2 Average (\pm SE, $n = 12$) litter decomposition (a-c) and respiration rates (d-e) along the temperature gradient in microbial communities (a,d), invertebrate single species treatments (b,e), and invertebrate species mixture (c). The regression lines (Lorentzian and Arrhenius model) are provided, with the dotted line indicating non-significant fits

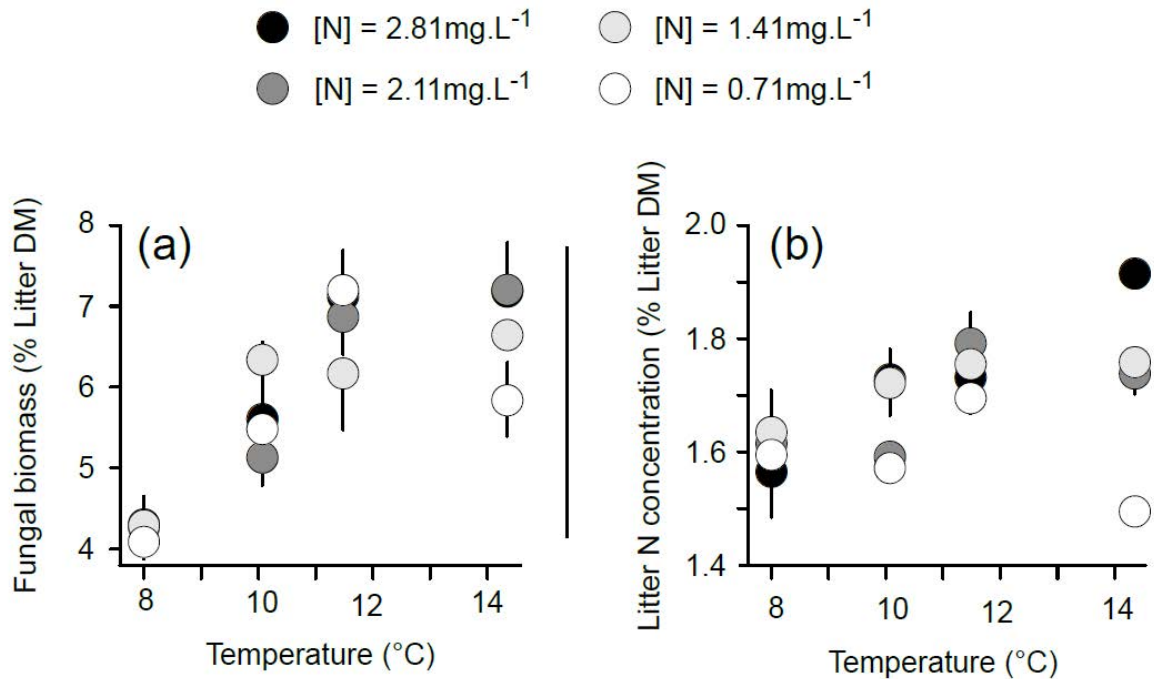


Figure A2.3 Average (\pm SE, $n = 12$) (a) Fungal biomass and (b) N litter concentration along the temperature gradient in different N availability treatments

Leaf microbial decomposition was slightly higher at intermediate than at the lowest N level (ANCOVA Table A2.1; Fig. A2.4a) while respiration was not significantly influenced by N concentration (ANCOVA Table A2.1; Fig. A2.4d). N effects on microbial leaf decomposition were not reflected by changes in fungal biomass (ANCOVA; Table A2.1) and litter N content, though the latter effect was close to significance level (ANCOVA; Table A2.1), with slightly lower N litter content in the N-poor ($1.59\% \text{ litter DM} \pm 0.11 \text{ SD}$) than in the N-rich treatment ($1.74\% \text{ litter DM} \pm 0.14 \text{ SD}$).

Table A2.2 Activation energy ($\pm SE$) of the Arrhenius models linking respiration and leaf decomposition rates to temperature for the different organisms and levels of biological organization. Significant estimates are given with the symbol *, and non-significant estimates with *n.s.*

	Respiration	Leaf decomposition
Microbial community	$1.00 \pm 0.15^*$	$0.56 \pm 0.25^*$
<i>Gammarus</i>	$1.15 \pm 0.19^*$	$0.69 \pm 0.19^*$
<i>Potamophylax</i>	$0.99 \pm 0.29^*$	$0.86 \pm 0.36^*$
<i>Sericostoma</i>	$0.55 \pm 0.20^*$	0.47 ± 0.31 n.s
Detritivore mix	-	0.12 ± 0.15 n.s

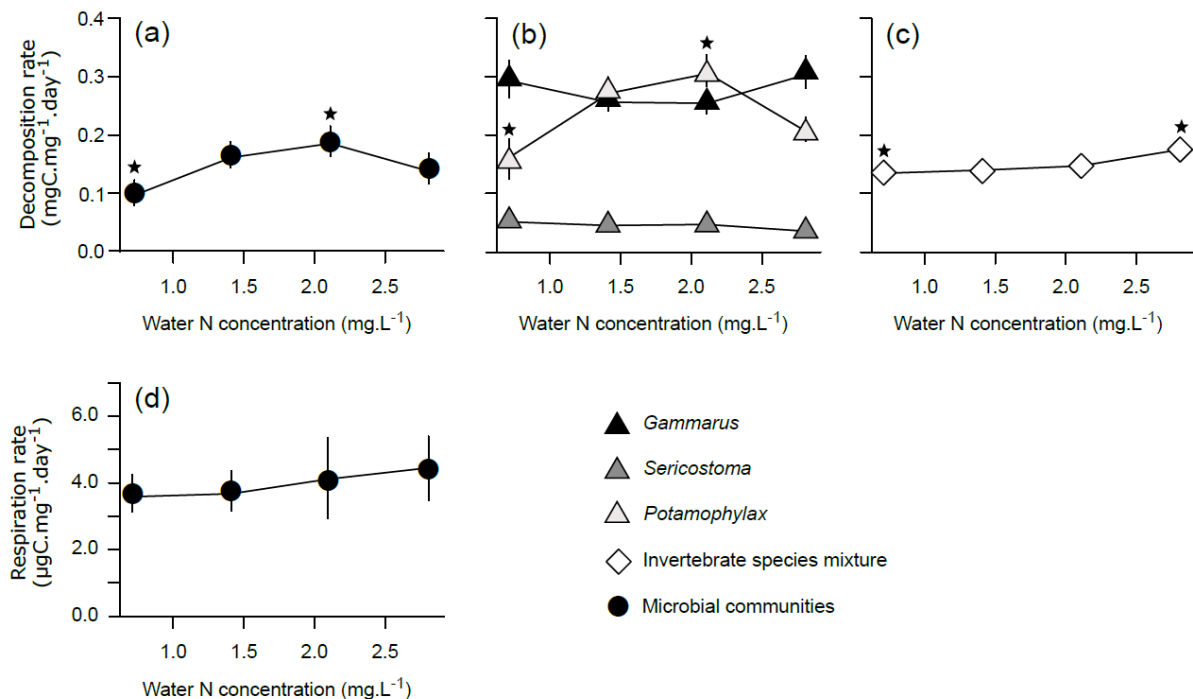


Figure A2.4 Average ($\pm SE$, $n = 12$) litter decomposition (a-c) and respiration rates (d) along the N availability gradient in microbial communities (a,d), invertebrate single species treatments (b), and invertebrate species mixture (c). Stars indicate the N treatments for which the response variable significantly differ from each other for a given decomposer assemblage (TukeyHSD)

Detritivores

Temperature stimulated detritivore respiration and leaf litter consumption until ca. 14°C, temperature above which activities began levelling out or declined slightly (Fig. A2.2b, e). Activation energies calculated for each process without the highest temperature tested differed substantially among species, with ca. 2-fold differences between extreme (Table A2.2). When calculated across detritivore species, activation energies were 0.93 eV (± 0.15 SE) for respiration rate and 0.56 eV (± 0.23 SE) for litter consumption rate. When the three detritivore species were mixed together, activation energy for litter consumption rate decomposition mediated by the 3 detritivore species was close to 0 eV (0.12 ns; Fig. A2.2c). This result arises because detritivore mixing led to antagonistic effect on litter mass loss at the high temperature levels (12 and 14°C) whereas additive mass loss was recorded at low temperature (Fig. A2.5).

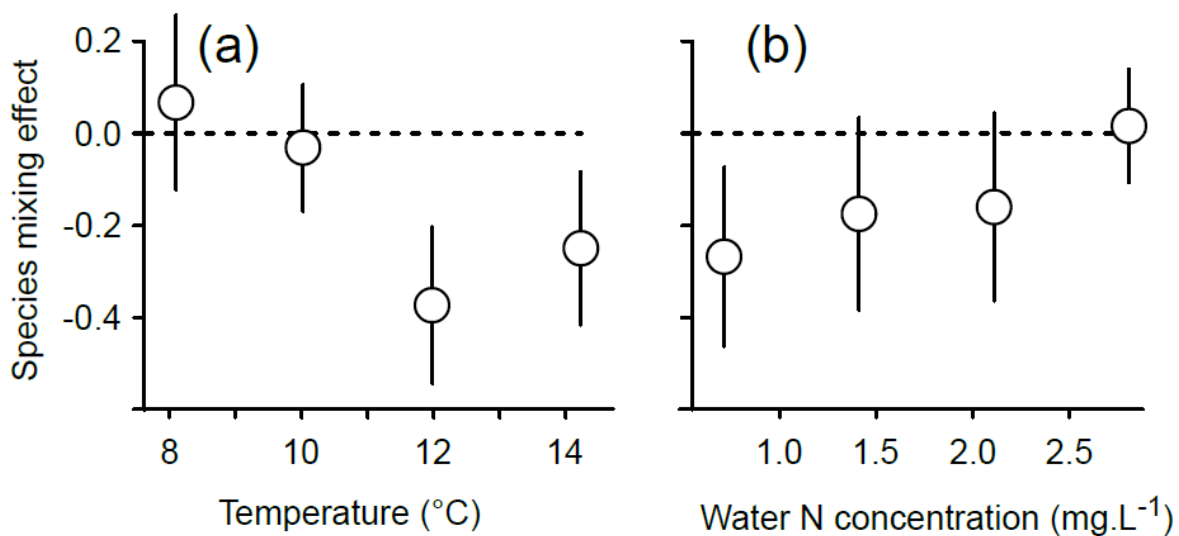


Figure A2.5 Detritivore species mixing effect ($\pm 95\%$ CI) on leaf consumption rates along the (a) temperature and (b) N availability gradients

Leaf consumption by invertebrates was not significantly affected by dissolved N availability in single detritivore species treatments (ANOVAs: *Gammarus*: $p = 0.269$; *Sericostoma*: $p = 0.074$) except for *Potamophylax* (ANOVA: $p = 0.017$) with the highest consumption occurring at an intermediate N concentration. Leaf consumption in mixed-species treatments increased with N availability, with a significantly higher

consumption in the N-rich than in the N-poor treatment (Fig. A2.4c). This result occurs together with a significant negative diversity effect on leaf consumption in the N-poor treatment only (Fig. A2.5b).

Discussion

A striking pattern across our results is that temperature had most often a stronger stimulating effect on respiration rate of litter consumers than on litter decomposition rate. These results raise fundamental questions on how these consumers meet their energy requirements at high temperature, since apparent exploitation of energy and nutrients from leaf litter does not increase as fast as metabolic cost. If we assume rates of resource consumption to be proportional to amounts of assimilated energy and nutrients by litter consumers, temperature rise may actually decrease the conversion of litter material into consumer biomass and exoenzymes. Previous studies have reported negative temperature effect on carbon use efficiency in microbial decomposers (Allison et al. 2010) and ingestion efficiency in animals (Rall et al. 2010). This provides a rationale for why previous studies found activation energy of litter decomposition rate assessed in streams and rivers to be lower than values expected based on the temperature sensitivity of metabolic rate (Boyero et al. 2011; Follstad-Shah et al. 2017). As rate of litter mass loss by microbial decomposers and invertebrate does not increase with temperature as fast as microbial respiration rate, we can also expect that warming will promote transformation of litter carbon into CO₂ and therefore accelerate the return of aquatic detrital carbon to the atmosphere (Boyero et al. 2011).

Here we report a strong difference in the temperature sensitivity of microbial vs detritivore-mediated decomposition as activation energy of litter consumption rate by the 3-species detritivore assemblage is nearly 5 fold lower than that estimated for the microbial decomposer assemblage. Temperature invariance of litter decomposition rate in streams along latitudinal gradient has been associated with a greater diversity and abundance of detritivores in cold vs warm climatic zone (Dobson et al. 2002), leading to higher leaf consumption by detritivores at high latitudes while microbial litter decomposition follows the opposite pattern (Irons et al. 1994; Boyero et al. 2011,

2012). In our study, as detritivore density and diversity were set constant, temperature invariance of litter consumption rate in detritivore assemblages was mediated by per capita effects. Two nonexclusive mechanisms can explain this result: (1) detritivore species displayed variable response to temperature and therefore they may complement each other along the temperature gradient (i.e. insurance hypothesis; Yachi & Loreau, 1999) and (2) shift from neutral to antagonistic interspecific interaction as species mixing effect shift from neutral below 11°C to negative above this value, probably because increased detritivore foraging activity exacerbate competition for leaf litter consumption. These two mechanisms may be prevalent where local detritivore diversity is high, notably in temperate region (Boyero et al. 2012), although per capita effects might, in fact, be small compared with demographic response in mediating temperature effect on litter decomposition. For instance, the positive effect of temperature on microbial decomposition might in part arise from increased fungal biomass, possibly in combination with positive per capita effects.

These findings support the idea that the relative importance of microbial decomposers and detritivores to litter decomposition may shift along temperature gradients, towards higher microbial contribution with increasing temperature. In contrast, Follstad-Shah et al. (2017) did not report difference in the temperature sensitivity of litter decomposition assessed in the field, whether it was driven by microbial decomposers alone in fine mesh bags or together with detritivores in coarse mesh bags. This study however suggests that temperature sensitivity estimated by the mean of Arrhenius model can be variable depending on the climatic region (e.g. tropical vs temperate) and litter quality (see also Gonçalves et al. 2013), for instance. Previous studies have suggested that nutrient availability, too, could drive variation in temperature response of litter decomposition (Ferreira & Chauvet 2011; Fernandes et al. 2014). Here we did not detect a significant interaction between N-availability and temperature despite plausible mechanisms from which this pattern may arise (Cross et al. 2015). High growth or activity, as entailed by increased temperature, has to be fueled with the necessary elements (i.e. nutrients) that can be limiting in the environment (as N is for microbial decomposers) (Ferreira et al. 2015). Relaxing this limitation may thus ensure them to achieve higher biomass per unit of detrital carbon and higher production of exoenzyme per biomass unit, providing condition for larger temperature effect size. We found that microbial decomposition was actually limited

below inorganic N concentration of 1 mgN L⁻¹, but no clear pattern was found for fungal biomass or N immobilization. This weakness of N effect reduced the scope for strong synergies with temperature effect on microbial but also on detritivore litter consumption, since nutrient effects on detritivore litter consumption are mediated by microbial litter conditioning (Manning et al. 2015).

Our study is based on short term exposure of organisms to temperature change and short term measurement of decomposition rates, precluding generalization to consequences of climate warming for *in natura* litter decomposition. However, our results help understand reported patterns of temperature effect on litter decomposition assessed in the field and inform future research. An important point to make here is to recognize the complexity of patterns and processes underlying temperature effect on litter decomposition. The metabolic theory of ecology provides a valuable framework to describe broad-scale patterns of temperature sensitivity of litter decomposition rate and eventually to quantify it. However, systematic deviation from, and large noise around, prediction of the heuristic metabolic theory of ecology model suggest that we must move forward toward less simplistic assumptions. Results obtained for detritivores show that (1) the assumption of monotonicity does not hold, (2) species are not equal in how their performance change with temperature, and (3) litter consumer metabolism is not the primary constraint over temperature response of litter decomposition.

Acknowledgments

We are grateful to Sylvain Lamothe for technical assistance and Didier Lambrigot for ergosterol analyses, Frederic Julien for litter nutrient analyses. The experiment is part of the FunctionalStreams project funded by the French National Research Agency [grant ANR-14-CE01-0009-01]

References

- Allison, S. D., Wallenstein, M. D., Bradford, M. A. (2010) Soil-carbon response to warming dependent on microbial physiology. *Nature Geoscience*, 3, 336–340.
- Boyero, L., Pearson, R. G., Dudgeon, D., Ferreira, V., Graça, M. A. S., Gessner, M. O., ... Zúñiga, C. (2012) Global patterns of distribution in stream detritivores: implications for biodiversity loss in changing climates. *Global Ecology and Biogeography*, 21, 134–141.
- Boyero, L., Pearson, R. G., Gessner, M. O., Barmuta, L. A., Ferreira, V., Graça, M. A. S., ... West, D. C. (2011) A global experiment suggests climate warming will not accelerate litter decomposition in streams but might reduce carbon sequestration. *Ecology Letters*, 14, 289–294.
- Brown, J. H., Gillooly, J. F., Allen, A. P., Savage, V. M., West, G. B. (2004) Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology*, 85, 1771–1789.
- Chapman, K., Whittaker, J. B., Heal, O. W. (1988) Metabolic and faunal activity in litters of tree mixtures compared with pure stands. *Agriculture, Ecosystems, Environment*, 24, 33–40.
- Cheever, B.M., Kratzer, E.B., Webster, J.R. (2012) Immobilization and mineralization of N and P by heterotrophic microbes during leaf decomposition. *Freshwater Science*, 31, 133–147.
- Collins, M., Knutti, R., Arblaster, J., Dufresne, J.-L., Fichet, T., Friedlingstein, P., ..., Wehner, M. (2013) Long-term climate change: Projections, commitments and irreversibility. In T. F. Stocker, D. Qin, G. K Plattner, M. Tignor, S. K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex & P. M. Midgley (Eds.), *Climate Change 2013: The Physical Science Basis*. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge: Cambridge University Press.
- Cross, W. F., Hood, J. M., Benstead, J. P., Hury, A. D., Nelson, D. (2015) Interactions between temperature and nutrients across levels of ecological organization. *Global Change Biology*, 21, 1025–1040.
- 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, 122–131.
- Dobson, M., Mathooko, J. M., Magana, A., Ndegwa, F. K. (2002) Macroinvertebrate assemblages and detritus processing in Kenyan highland streams: more evidence for the paucity of shredders in the tropics? *Freshwater Biology*, 47, 909–919.
- Duarte, S., Bärlocher, F., Pascoal, C., Cássio, F. (2016) Biogeography of aquatic hyphomycetes: current knowledge and future perspectives. *Fungal Ecology*, 19, 169–181.
- Eaton, J. G., Scheller, R. M. (1996) Effects of climate warming on fish thermal habitat in streams on the United States. *Limnology and Oceanography*, 41, 1109–1115.
- Fernandes, I., Sahadevan, S., Pascoal, C., Cássio, F. (2014) Elevated temperature may intensify the positive effects of nutrients on microbial decomposition in streams. *Freshwater Biology*, 59, 2390–2399.
- Ferreira, V., Castagnyrol, B., Koricheva, J., 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., Canhoto, C. (2014) Effect of experimental and seasonal warming on litter decomposition in a temperate stream. *Aquatic Sciences*, 76, 155–163.
- 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.
- Follstad Shah, J. J., Kominoski, J. S., Ardón, M., Dodds, W. K., Gessner, M. O., Griffiths, N. A., ... Zeglin, L. H. (2017) Global synthesis of the temperature sensitivity of leaf litter breakdown in streams and rivers. *Global Change Biology*, 23, 3064–3075.
- Frainer, A., Jabiol, J., Gessner, M. O., Bruder, A., Chauvet, E., McKie, B. G. (2016) Stoichiometric imbalances between detritus and detritivores are related to shifts in ecosystem functioning. *Oikos*, 125, 861–871.
- Friberg, N., Dybkjær, 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.
- Galic, N., Forbes, V. E. (2017) Effects of temperature on the performance of a freshwater amphipod. *Hydrobiologia*, 785, 35–46.
- Galloway, J. N., Townsend, A. R., Erisman, J. W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J. R., Martinelli, L. A., Seitzinger, S. P., Sutton, M. A. (2008) Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science*, 320, 889–892.
- Gessner, M. O. (2005) Ergosterol as a measure of fungal biomass. In M. A. S. Graça, F. Bärlocher & M. O. Gessner (Eds.), *Methods to study litter decomposition – A practical guide* (pp 189–195). Dodrecht: Springer.
- Gessner, M. O., Chauvet, E., Dobson, M. (1999) A perspective on litter breakdown in streams. *Oikos*, 85, 377–384.
- Gessner, M. O., Thomas, M., Jean-Louis, A.-M. & Chauvet, E. (1993) Stable successional patterns of aquatic hyphomycetes on leaves decaying in a summer cool stream. *Mycological Research*, 97, 163–172.
- Gessner, M. O., Chauvet E. (1993) Ergosterol-to-biomass conversion factors for aquatic hyphomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 502–507.
- Gillooly, J. F., Brown, J. H., West, G. B., Savage, V. M., Charnov, E. L. (2001) Effects of size and temperature on metabolic rates. *Science*, 21, 2248–2251.
- Gonçalves, A. L., Graça, M. A. S., Canhoto, C. (2013) The effect of temperature on leaf decomposition and diversity of associated aquatic hyphomycetes depends on the substrate. *Fungal Ecology*, 6, 546–553.
- Gossiaux, A., Jabiol, J., Poupin, P., Chauvet, E., Guérol, F. (2019) Seasonal variations overwhelm temperature effects on microbial processes in headwater streams: insights from a temperate thermal spring. *Aquatic Sciences*, 81:30
- Graça, M. A. S. (2001) The role of invertebrates on leaf litter decomposition in streams – A review. *Hydrobiologia*, 86, 383–393.
- Graça, M. A. S., Hyde, K., Chauvet, E. (2016) Aquatic hyphomycetes and litter decomposition in tropical –

- subtropical low order streams. *Fungal Ecology*, 19, 182–189.
- Gulis, V., Kuehn, K. A., Schoettle, L. N., Leach, D., Benstead, J. P., Rosemond, A. D. (2017) Changes in nutrient stoichiometry, elemental homeostasis and growth rate of aquatic litter-associated fungi in response to inorganic nutrient supply. *Isme Journal*, 11, 2729–2739.
- Irons, 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.
- Krauss, G. J., Solé, M., Krauss, G. (2011) Fungi in freshwaters: ecology, physiology and biochemical potential. *FEMS Microbiology Ecology*, 35, 620–651.
- Lemoine, N. P., Burkepille, D. E. (2012) Temperature-induced mismatches between consumption and metabolism reduce consumer fitness. *Ecology*, 93, 2483–2489.
- Manning, D. W. P., Rosemond, A. D., Kominoski, J. S., Gulis, V., Benstead, J. P., Maerz, J. C. (2015) Detrital stoichiometry as a critical nexus for the effects of streamwater nutrients on leaf litter breakdown rates. *Ecology*, 96, 2214–2224.
- Martínez, A., Larrañaga, A., Pérez, J., Descals, E., Pozo, J. (2014) Temperature affects leaf litter decomposition in low-order forest streams: field and microcosm approaches. *FEMS Microbiology Ecology*, 87, 257–267.
- Ott, D., Rall, B. C., Brose, U. (2012) Climate change effects on macrofaunal litter decomposition: the interplay of temperature, body masses and stoichiometry. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 367, 3025–3032.
- Petersen, R. C., Cummins, K. W. (1974) Leaf processing in a woodland stream. *Freshwater Biology*, 4, 343–368.
- Poole, G. C., Berman, C. H. (2001) An ecological perspective on in-stream temperature: Natural heat dynamics and mechanisms of human-caused thermal degradation. *Environmental Management*, 27, 787–802.
- R Core Team (2016) *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rall, B. C., Vucic-Pestic, O., Ehnes, R. B., Emmerson, M., Brose, U. (2010) Temperature, predator–prey interaction strength and population stability. *Global Change Biology*, 16, 2145–2157.
- Sahadevan, S., Bärlocher, F., Sobral, O., Gessner, M. O., Dudgeon, D., McKie, B. G., ... Graça, M. A. S. (2019) Biodiversity of leaf litter fungi in streams along a latitudinal gradient. *Science of the Total Environment*, 661, 306–315.
- Suberkropp, K. (1992) Aquatic Hyphomycete Communities. In G. C. Carroll & D. T. Wicklow (Eds.), *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem*, Second Edition (pp. 729–747). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Wallace, J. B., Eggert, S. L., Meyer, J. L., Webster, J. R. (1997) Multiple trophic levels of a forest stream linked to terrestrial litter inputs. *Science*, 277, 102–104.
- Woodward, G., Gessner, M. O., Giller, P. S., Gulis, V., Hladyz, S., Lecerf, A., ..., Chauvet, E. (2012) Continental-scale effects of nutrient pollution on stream ecosystem functioning. *Science*, 336, 1438–1440.

Yachi, S., Loreau, M. (1999) Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: The insurance hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 1463–1468.

Yvon-Durocher, G., Caffrey, J. M., Cescatti, A., Dossena, M., del **Giorgio, P., Gasol, J. P., ...** Allen, A. P. (2012) Reconciling the temperature dependence of respiration across timescales and ecosystem types. *Nature*, 487, 472–476.

ANNEXE 3 – COMPARAISON DES APPROCHES MICROSCOPIQUE ET MOLECULAIRE POUR L'IDENTIFICATION DES ESPECES FONGIQUES ASSOCIEES AUX LITIERES

Table A3. Comparaison des taxons fongiques associés aux litières d'aulne immergées au printemps et en hiver dans une source tempérée (chapitre 1) détectés par approche microscopique (identification des conidies d'hyphomycètes aquatiques au microscope) et par approche moléculaire (identification par OTU après séquençage).


	Détection au microscope	Détection au séquençage
<i>Alatospora acuminata</i>	✓	✓
<i>Alatospora constricta</i>		✓
<i>Alatospora pulchella</i>	✓	✓
<i>Anguillospora crassa</i>	✓	✓
<i>Anguillospora longissima</i>		✓
<i>Articulospora tetracladia</i>	✓	✓
<i>Cladosporium cladosporioides</i>		✓
<i>Cladosporium sp.</i>		✓
<i>Clavariopsis aquatica</i>	✓	✓
<i>Clavatorspora longibrachiata</i>	✓	
<i>Flagellospora curvula</i>	✓	✓
<i>Goniopila monticola</i>	✓	
<i>Heliscella stellata</i>	✓	
<i>Heliscus lugdensis</i>	✓	
<i>Lemonniera terrestris</i>	✓	✓
<i>Leohumicola minima</i>		✓
<i>Lunulospora curvula</i>	✓	✓
<i>Tetrachaetum elegans</i>	✓	✓
<i>Tetracladium marchalianum</i>	✓	✓
<i>Triscelophorus acuminatus</i>		✓
<i>Tricelophorus monosporus</i>	✓	
<i>Tetracladium setigerum</i>		✓
<i>Tricladium attenuatum / Gyoerffyella sp. / Fontanospora fusiramosa</i>		✓
<i>Tricladium chaetocladium</i>	✓	✓
<i>Tricladium splendens</i>	✓	
<i>Tumularia aquatica</i>		✓
Total des espèces d'hyphomycètes aquatiques	18	20
Autres espèces fongiques		✓

ANNEXE 4 – POSTER PEDAGOGIQUE COLLABORATIF

La Décomposition

dans un monde durable

Alice Gossiaux¹ et Thibaut Rota², avec l'aide de Jérémie Jabiol² et de Franck Gilbert²



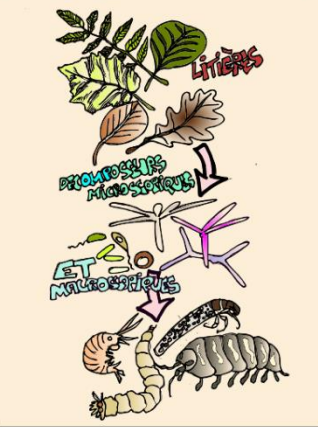
ANR

FunctionalStreams

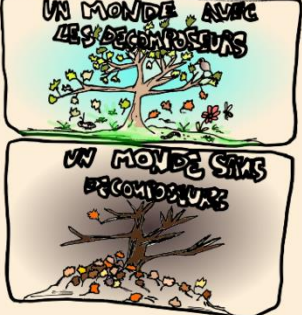
vous présentent

le KIT DECOMPO[®] !

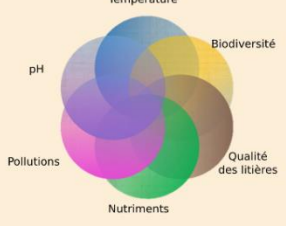
Décompo Quesako ?



Décomposition et développement durable ?




Un équilibre fragile

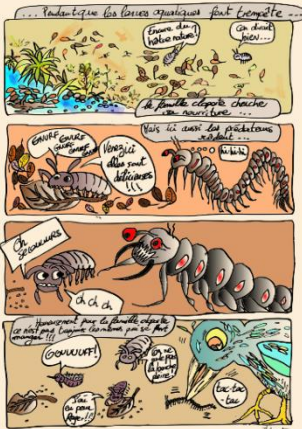


Sans **organismes décomposeurs** (macro-détritivores, bactéries, champignons), il n'y aurait plus de nutriments pour les plantes. En fragmentant et en digérant les feuilles mortes, les décomposeurs reminéralisent les détrit. Sans eux, ce sont les **cycles** du carbone, de l'azote et du phosphore qui seraient altérés. Ces décomposeurs étant sensibles à de nombreux **facteurs environnementaux**, la décomposition des litières donne une indication sur l'état des écosystèmes. Ainsi elle est une sentinelle du **développement durable**.

Des histoires à raconter ?




Décomposition en milieu aquatique




Décomposition en milieu terrestre

A vous de mener l'expérience avec le KIT DECOMPO[®]




PERTE RELATIVE DE MASSE DE LITIÈRE après 21 jours




Environnement	Essence	Perte relative (%)
AQUATIQUE (PRINTEMPS)	Aulne	53%
	Hêtre	13%
TERRESTRE (PRINTEMPS)	Aulne	42%
	Hêtre	9%
AQUATIQUE (AUTOMNE)	Aulne	68%
	Hêtre	18%

(plus de détails dans le Livret Pratique du Professeur)

Partenaires








Figure A4.1. Poster pédagogique réalisé en collaboration avec Thibaut Rota (doctorant à EcoLab) pour le service éducatif de l'Observatoire Midi-Pyrénées (OMP) et présenté lors du forum des Nouvelles Initiatives en Médiation Scientifique (NIMS).

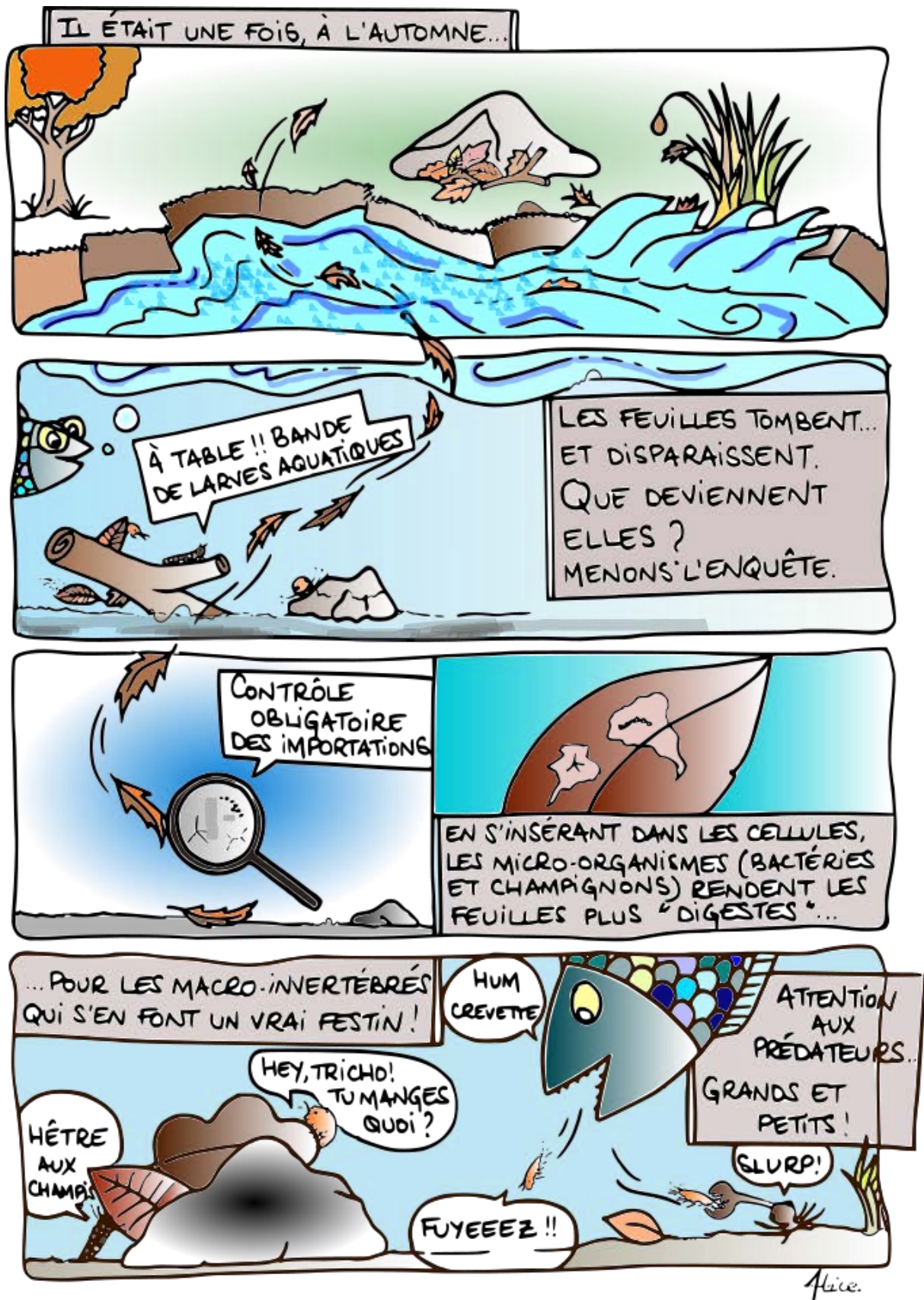


Figure A4.2 - Détail du poster. Bande dessinée racontant une histoire de décomposition dans une rivière. Dessin : Alice Gossiaux; colorisation: Thibaut Rota.

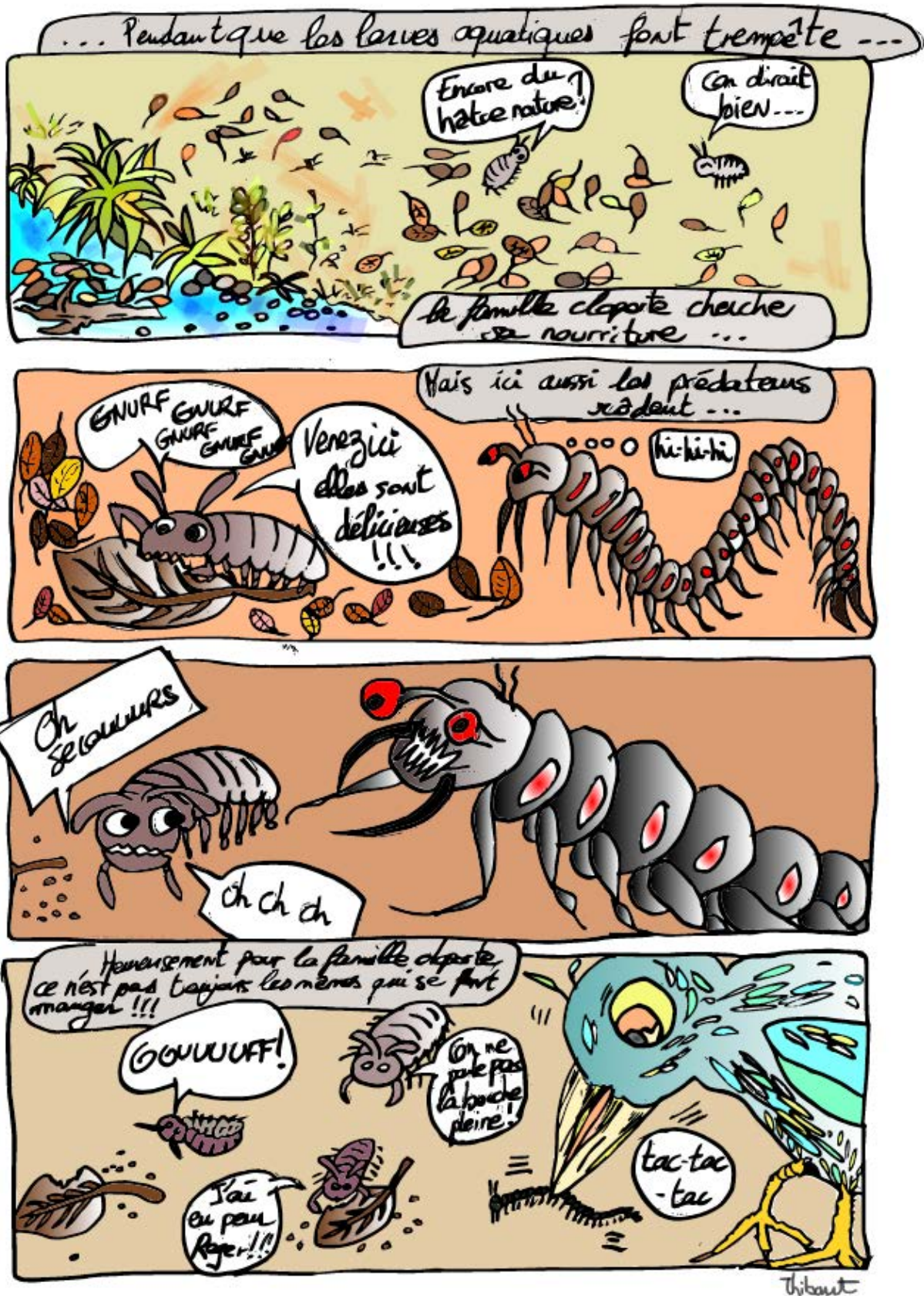


Figure A4.3 - Détail du poster. Bande dessinée racontant une histoire de décomposition en milieu terrestre. Dessin et colorisation : Thibaut Rota.

RÉSUMÉ / ABSTRACT

Dans le contexte actuel des changements environnementaux, de nombreuses pressions **menacent le fonctionnement et l'intégrité des milieux naturels**. Parmi ces pressions, **l'augmentation des températures et les modifications de la disponibilité des nutriments sont au cœur des préoccupations, en particulier concernant les écosystèmes aquatiques d'eau douce**. Pour les ruisseaux de tête de bassin versant, qui sont des écosystèmes fragiles **dont le fonctionnement est déterminant pour les masses d'eau situées à l'aval**, les conséquences de ces changements sont primordiales à anticiper afin de prévoir des mesures de gestion et de conservation de ces milieux qui rendent de nombreux services écosystémiques. **Le fonctionnement de ces cours d'eau repose principalement sur la décomposition de matière organique d'origine allochtone, qui constitue l'apport majeur de carbone des réseaux trophiques benthiques**. Dans une moindre mesure, la production primaire y est représentée par les organismes autotrophes du biofilm. En utilisant différentes approches (microcosmes, mésocosmes, *in natura*), les travaux de cette thèse visent d'abord à **comprendre comment les compartiments microbiens et macro-invertébrés, impliqués dans le fonctionnement des cours d'eau de tête de bassin, réagissent à l'augmentation des températures, puis tentent d'en démêler les effets conjoints de la modification de la disponibilité en nutriments, de la saisonnalité, de l'identité des espèces et des interactions biotiques sous-jacentes**. Les résultats obtenus lors de cette thèse démontrent que la température et les nutriments ont des effets complexes—potentiellement faibles, non-linéaires et parfois opposés aux résultats de la littérature—sur **les processus de décomposition des litières dans les cours d'eau**. De plus, ces travaux soulignent **l'importance de considérer les effets saisonniers et la dynamique temporelle pour mieux appréhender les processus mesurés en milieux naturels ou semi-naturels**. Enfin, **l'identité des espèces (litières, micro- et macro-organismes)**, leur rôle dans la communauté (groupes fonctionnels) et leurs interactions (antagonistes, facilitatrices) jouent un rôle clef dans la variabilité des réponses observées, en modulant, **par exemple, l'importance de la voie brune et verte dans le fonctionnement de ces systèmes**. Finalement, **la variabilité des effets de l'augmentation de la température et de la disponibilité en nutriments sur le fonctionnement des cours d'eau de tête de bassin versant, fortement liée au contexte et au niveau d'organisation biologique, ouvre de nombreuses perspectives de recherche, et notamment dans le cadre des sciences participatives**.

In the current context of environmental changes, many pressures threaten the functioning and integrity of natural environments. Among these pressures, concerns about increasing temperatures and changes in nutrients availability are rising, particularly for freshwater aquatic ecosystems. The consequences of these changes on headwater streams, which contribute to downstream water bodies and provide many ecosystem services, are essential to anticipate in order to plan management and conservation measures. Headwater streams functioning is mainly based on the decomposition of allochthonous organic matter, which is the major carbon input for benthic food webs. To a lesser extent, primary production is represented by the autotrophic organisms of biofilm. Using different approaches (microcosms, mesocosms, *in natura*), this thesis aims at understanding how microbial and macro-invertebrate compartments, involved in the functioning of headwater streams, react to temperature increases, and at disentangling the combined effects of nutrients availability changes, seasonality, species identity and underlying biotic interactions. The results of this thesis demonstrate that temperature and nutrients have complex effects on stream litter decomposition processes (potentially weak, non-linear and sometimes opposed to the results of the literature). In addition, these studies highlight the importance of taking seasonal effects and temporal dynamics into account in order to improve the understanding of the measured processes in natural or semi-natural environments. Finally, species identity (litter, micro and macro-organisms), species roles in the community (functional groups) and interactions among them (antagonists, facilitators) play a key role in the variability of observed responses, by modulating, for example, the importance of the brown and green pathways in the functioning of these systems. Finally, the variability of the effects of temperature increase and nutrient availability on the functioning of headwater streams, which is strongly linked to the context and level of biological organization, leads to many research opportunities, and in particular for citizen science.