



HAL
open science

De la communauté à l'individu : apport des traits des invertébrés benthiques dans la bio-évaluation des cours d'eau

Cédric Mondy

► **To cite this version:**

Cédric Mondy. De la communauté à l'individu : apport des traits des invertébrés benthiques dans la bio-évaluation des cours d'eau. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0221 . tel-01749314

HAL Id: tel-01749314

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749314v1>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



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 des Interactions Écotoxicologie,
Biodiversité, Écosystèmes (LIEBE)
UMR CNRS-UDL 7146, Metz

École Doctorale Sciences et Ingénieries
Ressources Procédés Produits Environnement
RP2E ED 410

THESE

Pour l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : Écotoxicologie, Biodiversité, Écosystèmes

Soutenue publiquement par

Cédric MONDY

le 4 octobre 2012

De la communauté à l'individu : apport des traits des invertébrés benthiques dans la bio-évaluation des cours d'eau

Directeur de thèse :	Philippe USSEGLIO-POLATERA	<i>Université de Lorraine (France)</i>
Rapporteurs:	Régis CEREGHINO Thierry CAQUET	<i>Université Paul Sabatier (France) INRA, Centre de Rennes (France)</i>
Examineurs :	Laure GIAMBERINI Emmanuel CASTELLA Matthias LIESS Nikolai FRIBERG Yorick REYJOL	<i>Université de Lorraine (France) Université de Genève (Suisse) UFZ - Helmholtz Centre for Environmental Research (Allemagne) Aarhus University (Danemark) Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques (ONEMA, France)</i>



Ce travail de thèse a bénéficié du soutien financier du Ministère de l'Écologie, du Développement Durable et de l'Énergie et de l'Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques.



Remerciements

Le moment est venu de fermer cette longue et enrichissante parenthèse qu'a été cette thèse et de remercier les nombreuses personnes qui ont contribué de près ou de loin à cette aventure.

Je tiens tout d'abord à remercier *Jean-François Férard* et *Pascale Bauda*, ancien et actuelle directeur du LIEBE pour leur accueil dans cette structure. Je tiens également à remercier *Paule Vasseur* pour m'avoir permis de suivre le Master recherche « Écotoxicologie et Biodiversité » et ainsi de réaliser le stage qui m'aura permis de découvrir ce monde fascinant des invertébrés benthiques que j'ai eu la chance d'explorer un peu plus durant ma thèse.

Je ne saurais comment exprimer de manière satisfaisante ma gratitude envers *Philippe Usseglio-Polatera*. Tout d'abord, un grand merci pour avoir pris le risque d'accepter qu'un jeune étudiant en Master, ne connaissant strictement rien aux invertébrés et aux traits, puisse réaliser auprès de vous ce stage dans lequel je me suis plongé (parfois littéralement). Ces quelques années passées à travailler avec vous m'ont apporté énormément tant du point de vue scientifique que personnel. Je vous suis particulièrement reconnaissant de m'avoir permis de mener ce travail avec une grande autonomie et de m'avoir fait confiance même quand je débarquais dans votre bureau avec des analyses peu orthodoxes en hydrobiologie (je suis sûr que vous commencez à apprécier de vous balader dans les forêts d'arbres conditionnels maintenant). Encore un grand merci pour m'avoir fait partager pendant ces années (et j'espère également dans les années futures) vos connaissances et votre esprit critique qui m'ont permis de commencer à me construire en tant que scientifique.

Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements aux personnes ayant accepté d'évaluer ce travail de thèse. Un grand merci à *Régis Céréghino* et *Thierry Caquet* qui ont accepté de rapporter ce travail de thèse. Merci également à *Laure Giamberini*, *Emmanuel Castella* et *Yorick Reyjol* pour avoir accepté de faire partie du jury. Many thanks to *Mathias Liess* and *Nikolai Friberg* for evaluating this PhD work despite the French language I used.

Je tiens tout particulièrement à remercier les nombreuses personnes sans qui ce travail de thèse n'aurait pas été possible.

Un GRAND merci à mon compatriote vosgien, *Philippe Wagner*, grâce à qui les nombreuses sorties terrain réalisées au cours du Master et de cette thèse sont devenues autant de moments de bonne humeur (bientôt une nouvelle représentation de notre célèbre numéro du tabouret) même quand on ne savait pas où on allait (tu te souviens de cette route forestière sans fin perdue dans le brouillard ?). Un grand merci à *Philippe Rousselle* pour sa gentillesse et pour m'avoir soulagé de la caractérisation physico-chimique de mes stations (encore désolé pour les échantillons supplémentaires à la dernière minute). Merci à *Michael Danger* pour m'avoir fait découvrir la stœchiométrie et à *Faustine Charmasson* pour les dosages du phosphore dans mes échantillons. Je tiens également à remercier *Nicolas Angeli*, *Christian Hossann* et *Claude Brechet* de l'INRA de Champenoux pour leur accueil et leur aide dans la réalisation des analyses isotopiques. Je tiens particulièrement à remercier *Marc Parant* pour son aide précieuse dans l'acquisition et l'interprétation des données protéomiques.

Je tiens également à remercier *Michel Masson* pour nous avoir permis de travailler chez lui sur la Maix et pour son accueil toujours chaleureux. Merci beaucoup pour les nombreuses discussions que nous avons eu autour d'un café toujours bienvenu.

Un grand merci à tous les stagiaires (*Tommy*, *Anne-Cyrielle*, *Yone*, *Eline* et *Pierre*) ainsi qu'à *Cédric bis* et *Nadia* pour leur aide sur le terrain et dans l'acquisition des données. Merci également à *Jean-Nicolas*, *Michael*, *Anatole*, *Evelyne*, *Vincent* et *Karen* pour m'avoir offert leur aide sur le terrain et dans la préparation des échantillons lorsque j'en ai eu besoin.

Cette thèse ne serait pas ce qu'elle est sans la précieuse (mais parfois rétive) base de données nationale. Je tiens donc à exprimer toute ma gratitude pour le travail réalisé (i) par les *DREAL* et *Agences de l'Eau* pour l'acquisition des données ainsi que leurs retours sur l'utilisation de l' I_2M_2 et (ii) par l'*ONEMA* (merci *Yorick*) et le *Ministère de l'environnement* pour avoir réussi la tâche complexe de faire discuter autour d'une même table les scientifiques et les gestionnaires, ce fut une expérience précieuse. Je tiens également à remercier les personnes travaillant à l'*IRSTEA* (anciennement *Cémagref*) ainsi qu'au pôle *ONEMA/IRSTEA* de Lyon qui ont permis la mise en place des processus de bancarisation et de validation des données. Une pensée donc pour *Jean-Gabriel*

Wasson et un grand merci à *André Chandesris, Nicolas Mengin, Martial Ferréol, Bertrand Villeneuve, Nolwenn Bougon* et *Marta Prieto Montes*. Je tiens tout particulièrement à remercier *Virginie Archambault* qui au cours de ces années m'a toujours témoigné son amitié et son soutien.

Un grand merci à toutes les personnes m'ayant permis d'avoir l'expérience la plus agréable possible de l'enseignement : *Valérie Grzybowski* et *Nathalie Kleinen* pour la gestion complexe des emplois du temps et des salles de cours ainsi qu'*Etienne Morhain* pour la préparation toujours exemplaire des salles de TP et du matériel pour les sorties terrain.

Un grand merci également à *Catherine Drui* et *Maryline Goergen* pour leur précieuse aide dans les méandres administratifs de l'université, du CNRS et de l'école doctorale. Merci à *Marie-Christine Peltre* pour avoir assuré avec efficacité et bonne humeur la liaison entre le LIEBE et l'Association Française de Limnologie (AFL). Je remercie également l'AFL pour m'avoir accordé une bourse afin de pouvoir participer au congrès de la SIL en Roumanie.

Merci à *Nathalie Nauer* pour pour ses « bonjour » matinaux plein de bonne humeur et à *Daniel Soubrouillard* pour ses « bonsoir » accompagnant la vérification scrupuleuse de la fermeture des portes et fenêtres. Merci beaucoup à *Mireille Ollivier* pour la livraison hebdomadaire du précieux infodoc et pour son rôle central dans la communication au sein du laboratoire.

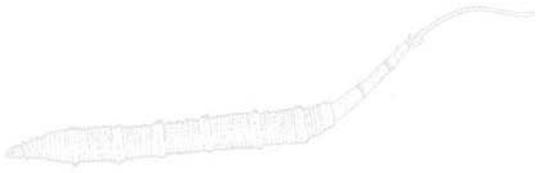
Merci à tous les doctorants, anciens ou non, qui ont croisé mon chemin. A ceux qui ont déjà terminé cette étape : *Jean-Marc, Chaffik, Manu, Pierre* (le nouveau coach sportif), *Didier, Olivier, Fanny* et à ceux qui sont encore sur le chemin : *Claudia, Julio, Evelyne* et *Nelly*.

Cette thèse aura aussi été l'occasion pour moi de rencontrer des personnes avec qui j'ai partagé bien plus que de la science et des pauses cafés/madeleines ou l'on réfléchissait à notre avenir après la thèse (*Anatole* toujours partant pour faire kébabiste ambulante ?). Un grand merci donc à *Vincent* et *Sophie* pour les soirées Hamburger/barbeuc à Fionville ; à *Vincent, Céline, Guillaume* (et *Minette*) pour votre générosité et votre hospitalité sans égale. *Vincent & Vince*, encore merci pour ces balades en kayaks avec café et madeleines au milieu de Madine, on se refait ça quand vous voulez. Merci à *Anne-So* dont la passion pour la nourriture bio nous aura parfois posé quelques soucis d'organisation mais toujours beaucoup de bonne humeur. A *Anatole* et

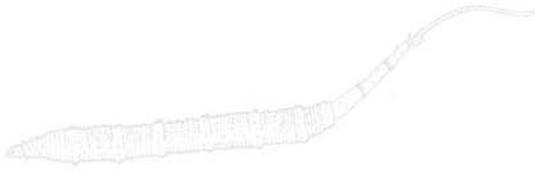
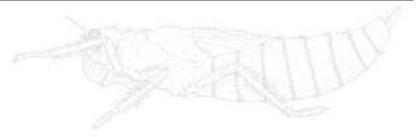
Laetitia, un grand merci pour avoir partagé avec nous de si nombreux moments (Fantastic'Art, Disneyland et Barcelone, que de bons souvenirs). Merci beaucoup à *Hela* dont la bonne humeur sans faille est toujours la bienvenue. A *Pascal* (et *Nat*) ainsi qu'à *Céline* avec qui j'ai partagé mon bureau ces dernières années, je vous souhaite le meilleur pour la suite.

Un grand merci à *Anne-Marie* que j'ai appris à connaître en dehors du laboratoire, il est toujours très agréable de partager avec toi une crêpe et une bolée de cidre en devisant sur tous les sujets imaginables. Merci à *Jérémy* et *Marie-Hélène* pour les bières partagées et pour les discussions qui me permettaient pendant quelques heures d'oublier la thèse et de découvrir le monde fascinant de l'archéologie.

A toute ma famille enfin, à *mes parents* un énorme merci pour m'avoir soutenu sans condition pendant toutes ces années, à *mes grand-parents* qui ont toujours montré de l'intérêt pour mon travail et à mon *p'tit frère* (ça y est j'ai enfin finis mes études). También quiero decir muchas gracias a los nuevos miembros de mi familia, *señor y señora Burga*. A *Fabi*, no sé cómo agradecerte por todo lo que me aportas sino que decirte que soy muy feliz que compartas tu vida conmigo.



Sommaire



<i>Chapitre I: Introduction Générale</i>	1
<i>Chapitre II: Matériel & méthodes</i>	21
2.1 – Base de données nationale.....	23
2.1.1 – La typologie des cours d'eau français.....	23
2.1.2 – Caractérisation des stations.....	27
2.1.3 – Les réseaux nationaux.....	28
2.1.4 – Techniques de prélèvement.....	31
2.1.5 – Technique de tri et d'identification.....	33
2.1.6 – Conclusion.....	35
2.2 – Sites d'étude dans les Vosges.....	36
2.2.1 – Situation géographique.....	36
2.2.2 – Caractérisation des stations.....	37
2.2.3 – Expériences in situ.....	46
2.2.4 – Conclusion.....	47
2.3 – Traits bio-écologiques.....	48
2.3.1 – La technique du codage flou.....	48
2.3.2 – Les traits bio-écologiques.....	51
2.3.3 – Conclusion.....	58
2.4 – Analyse des données : les arbres et forêts d'arbres de classification.....	59
2.4.1 – Principe.....	59
2.4.2 – Les arbres de classification et de régression (CART).....	62
2.4.3 – Les arbres d'inférence conditionnelle.....	63
2.4.4 – Les forêts d'arbres de classification.....	63
2.5 – Analyse des données : Logiciels utilisés.....	65
Partie I : Les traits bio-écologiques potentiels	67
<i>Chapitre III: Évaluation de la qualité écologique des cours d'eau Français</i>	69
Résumé.....	71
3.1 – Introduction.....	73
3.2 – Data.....	75
3.2.1 - Data collection.....	75
3.2.2 - Reach characterization.....	75

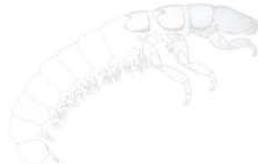
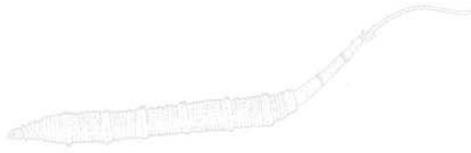
3.3 – Data analysis.....	77
3.3.1 - Metric identification and normalization.....	77
3.3.2 - Index development.....	80
3.3.3 – Final selection of the I ₂ M ₂ metric composition.....	84
3.3.4 - Ecological quality class boundaries.....	84
3.3.5 - Comparison of the I ₂ M ₂ with other indices.....	85
3.4 – Results.....	86
3.4.1 - Index development.....	86
3.4.2 - Ecological quality class boundaries.....	91
3.4.3 - Test of the I ₂ M ₂	91
3.4.4 – Correlation of the I ₂ M ₂ with the European intercalibration ICM _{Star} index.....	94
3.4.5 - Comparison of the I ₂ M ₂ , ICM _{Star} and IBGN discrimination efficiency.....	94
3.5 – Discussion.....	95
3.5.1 - Typology specificity.....	95
3.5.2 - Pressure specificity.....	95
3.5.3 – Selected metrics.....	97
3.5.4 – Ecological quality class boundaries.....	98
3.5.5 - I ₂ M ₂ efficiency.....	99
3.6 - Conclusion.....	99
<i>Chapitre IV :Évaluation des risques d'altération des cours d'eau Français.....</i>	<i>103</i>
Résumé.....	105
4.1 - Introduction.....	107
4.2 - Material & Methods.....	109
4.2.1 - Data collection.....	109
4.2.2 – Biotraits and trait-based metrics.....	110
4.2.3 – Statistical procedure.....	110
4.3 - Results.....	113
4.3.1 – Pressures co-occurrence.....	113
4.3.2 – Conditional Tree Forests.....	115
4.4 – Discussion.....	116
4.4.1 – The CTF approach: a promising tool for ecological risk assessment.....	117
4.4.2 – Multi-traits for investigating multi-pressure scenarii.....	118
4.5 – Conclusion.....	120

<i>Chapitre V: Pressions anthropiques et homogénéisation biologique</i>	125
Résumé.....	127
5.1 – Introduction.....	129
5.2 – Material & Methods.....	131
5.2.1 – Study sites.....	131
5.2.2 – Water chemistry.....	131
5.2.3 – Faunal sampling.....	132
5.3 – Data analyses.....	132
5.3.1 – Functional Homogenization.....	132
5.3.2 – Null models.....	135
5.3.3 – Functional homogenization with water quality gradients.....	136
5.4 – Results.....	137
5.4.1 – Water quality.....	137
5.4.2 – Faunal composition.....	137
5.4.3 – Relationship between community specialization and WQ gradient.....	138
5.5 – Discussion.....	143
5.6 – Conclusion.....	147
Partie II: De nouveaux traits pour étudier les niches écologiques réalisées	151

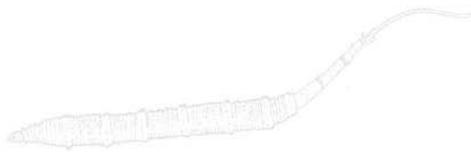
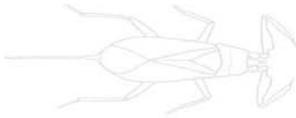
<i>Chapitre VI: Estimation des régimes alimentaires réalisés des invertébrés benthiques : une approche isotopique</i>	153
Summary.....	155
6.1 – Introduction.....	157
6.2 – Matériel & Méthodes.....	159
6.2.1 – Principe de l'approche isotopique.....	159
6.2.2 – Terrain.....	161
6.2.3 – Laboratoire.....	163
6.3 – Analyse des données.....	165
6.3.1 – Validation de la sélection de taxons.....	165
6.3.2 – De la signature isotopique au régime alimentaire.....	166
6.3.3 – Réponses différentielles du régime alimentaire (potentiel ou réalisé) entre les différents sites d'étude.....	172

6.4 – Résultats.....	172
6.4.1 – Validation des sélections de taxons utilisées dans les études isotopique et stœchiométrique.....	172
6.4.2 – Facteurs d'enrichissement trophique.....	173
6.4.3 – Sources de nourriture.....	175
6.4.4 – Régimes alimentaires.....	175
6.4.5 – Spécialisation alimentaire.....	183
6.4.6 – Compétition alimentaire.....	184
6.5 – Discussion.....	185
6.5.1 – Limitations de la méthode isotopique employée.....	185
6.5.2 – Transfert de la matière organique au sein des communautés benthiques.....	187
6.5.3 – Pressions anthropiques et structuration trophique des communautés benthiques	191
6.6 – Conclusion.....	196
<i>Chapitre VII : Une approche stœchiométrique du développement des invertébrés benthiques</i>	
.....	199
Summary.....	201
7.1 – Introduction.....	203
7.2 – Matériel & Méthodes.....	206
7.2.1 – Terrain.....	206
7.2.2 – Laboratoire.....	206
7.3 – Analyse des données.....	208
7.3.1 – Développement potentiel.....	208
7.3.2 – Traits stœchiométriques réalisés.....	209
7.3.3 – Réponses différentielles des estimateurs du développement entre les différents sites d'étude.....	209
7.4 – Résultats.....	210
7.4.1 – Qualité des sources de nourriture.....	210
7.4.2 – Vitesse de développement potentielle.....	212
7.4.3 – Traits stœchiométriques réalisés.....	215
7.5 – Discussion.....	219
7.5.1 – Qualité élémentaire des ressources alimentaires non animales.....	219
7.5.2 – Hypothèse de régulation de la vitesse de développement par les nutriments.....	222

7.6 – Conclusion : Les ratios élémentaires : des traits fonctionnels.....	226
<i>Chapitre VIII: Évaluation de l'utilisation d'un trait moléculaire – le protéome – en</i>	
<i>bio-indication.....</i>	<i>229</i>
Summary.....	231
8.1 – Introduction.....	233
8.2 – Matériel & Méthodes.....	236
8.2.1 – Principe de la méthode.....	236
8.2.2 – Espèces modèles.....	242
8.2.3 – Terrain.....	243
8.2.4 – Préparation des échantillons.....	244
8.2.5 – DIGE.....	245
8.2.6 – Analyse d'image.....	247
8.2.7 – Sélection des spots d'intérêt.....	247
8.2.8 – Diagnostic écologique.....	250
8.2.9 – Identification des protéines correspondant aux spots d'intérêt.....	251
8.3 – Résultats.....	253
8.3.1 – DIGE.....	253
8.3.2 – Sélection des spots d'intérêt.....	254
8.3.3 – Diagnostic écologique.....	258
8.3.4 – Protéines identifiées.....	261
8.4 – Discussion.....	264
8.4.1 – Réponses protéomiques au stress acide.....	264
8.4.2 – Utilisation du protéome en bio-indication.....	270
8.5 – Conclusion.....	272
<i>Chapitre IX: Synthèse et perspectives – Conclusion & perspectives.....</i>	<i>275</i>
Liste des Abréviations.....	293
Liste des Figures.....	299
Liste des Tableaux.....	313
Liste des Annexes.....	321
Références bibliographiques.....	327
Curriculum Vitae.....	365



Chapitre I: Introduction Générale



Que doit-on savoir pour prédire comment les communautés sont assemblées à partir d'un ensemble commun d'espèces ? Cette question est centrale en **écologie des communautés** (Weiher & Keddy 1995). La communauté est un concept dont la définition est assez souple. Elle est généralement définie comme un ensemble de populations appartenant à différentes espèces en interaction dans un même biotope. Toutefois, dans la pratique, le concept de communauté est très souvent limité à un groupe taxonomique donné. Par exemple on distinguera les communautés de diatomées, de macro-invertébrés ou de poissons alors que l'ensemble des espèces appartenant à ces trois groupes peuvent vivre et interagir dans le même biotope : la rivière. L'étude des facteurs contrôlant l'agrégation des populations en une communauté est donc un point primordial en écologie des communautés et est souvent abordé en utilisant la notion de **règles d'assemblage** (Keddy 1992a ; Weiher & Keddy 1995). Le principe de ces règles d'assemblages est de donner une série de critères permettant de prédire, à partir d'un ensemble régional d'espèces, la combinaison d'espèce qui formera une communauté au niveau local, dans un habitat spécifique (Keddy 1992a). Les règles d'assemblages traduiraient donc un processus similaire à celui de l'évolution : les habitats servent de filtres qui ne laisseraient passer que les génotypes (évolution) ou les espèces (écologie des communautés) les plus adaptés aux conditions environnementales rencontrées par les organismes (Keddy 1992a).

Chaque espèce ne serait alors capable d'utiliser (ou de tolérer), pour un ensemble de facteurs écologiques (e.g. le type de nourriture ou la température), qu'un sous-ensemble des conditions possibles. Il est alors possible, lorsque l'on considère n facteurs écologiques pouvant influencer la survie d'une espèce, de définir un hypervolume à n dimensions représentant les conditions dans lesquelles l'espèce est capable de survivre (Fig. 1-1 ; Hutchinson 1957). Cet hypervolume correspond à une formalisation géométrique du concept de la **niche écologique** (Grinnell 1917 ; Elton 1927). Cet hypervolume traduirait donc les exigences environnementales de chaque espèce, en d'autres mots leur **niche potentielle** (ou fondamentale). Prenons l'exemple de deux espèces A et B qui présentent des niches écologiques potentielles se recouvrant partiellement (Fig. 1-1). La théorie de la limitation de la similarité entre espèce (« *limiting similarity* ») prévoit que des espèces ayant des niches écologiques trop similaires (i.e. des espèces ayant un fort niveau de compétition) ne peuvent coexister (théorie de la différenciation de niche : Gause 1934).

La niche écologique réalisée de chacune de ces espèces correspondrait alors respectivement à un sous-ensemble de chacune de leurs niches potentielles où les espèces seraient effectivement présentes. De cette manière, les **niches réalisées** ne se superposent pas (Fig. 1-1 ; Hutchinson 1957) limitant ainsi la compétition entre les deux espèces et favorisant leur coexistence (MacArthur & Levins 1967).

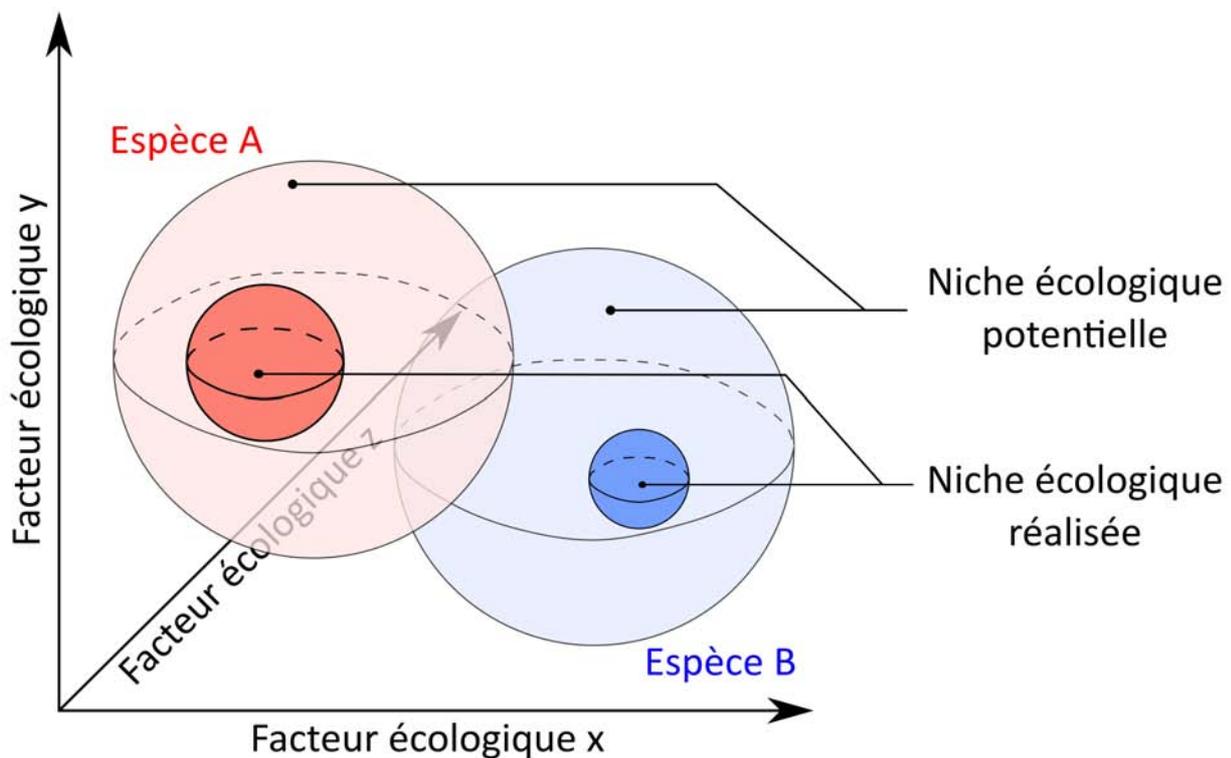


Figure 1-1. Représentation schématique des niches écologiques potentielles et réalisées (Hutchinson 1957) de deux espèces (A et B) dans un espace défini par trois facteurs écologiques (x, y et z).

La notion de niche écologique a ainsi été pendant longtemps presque exclusivement associée à la notion de compétition, ce qui a progressivement amené à la désaffection de ce concept (Chase & Leibold 2003), puis à sa complète remise en question dans les mécanismes de structuration des communautés, au moins pour les espèces partageant les mêmes caractéristiques trophiques. Cette remise en question – exprimée par la théorie unifiée neutraliste de Hubbell (2001) – aura permis, paradoxalement, de raviver l'intérêt des écologistes des communautés pour

la théorie de la niche écologique et d'inciter à la réflexion sur la (re)définition et l'utilisation de ce concept (Chase & Leibold 2003). Ainsi, McGill *et al.* (2006) rappelle que la compétition n'est pas le seul facteur structurant les communautés et que les gradients environnementaux jouent également un rôle primordial qui doit être plus souvent pris en compte dans les études portant sur la structuration des communautés.

Ces notions de règles d'assemblage des communautés et de niche écologique permettent alors de poser les bases théoriques de concepts liant la présence des espèces aux caractéristiques de leur habitat : c'est, par exemple, la théorie de l'« **Habitat Temple** » (Southwood 1977 ; Southwood 1988). D'après cette théorie, adaptée quelques années plus tard aux cours d'eau (« *River Habitat Temple* » ou RHT : Townsend & Hildrew 1994), l'habitat, et plus particulièrement sa variabilité spatio-temporelle, constitue le patron dans lequel les stratégies d'histoire de vie des organismes sont forgées. Les organismes seraient plus sélectionnés en fonction de leurs capacités de résistance et de résilience aux perturbations qu'en fonction de leurs aptitudes compétitrices. Les caractéristiques structurantes de l'habitat seraient, du point de vue des organismes, (i) la fréquence, l'intensité et la prédictibilité des perturbations (Southwood 1977 ; Townsend & Hildrew 1994) et (ii) l'hétérogénéité spatiale qui, par la mise à disposition de zones refuges, permettrait d'améliorer les chances de survie des organismes aux perturbations (Townsend 1989 ; Townsend & Hildrew 1994). Dans des habitats ayant une forte variabilité temporelle, e.g. présentant une fréquence importante et une faible prédictibilité des perturbations, des organismes possédant de fortes capacités de résilience (e.g. courte durée de vie et taux de croissance des populations rapide) sont plus particulièrement attendus. Inversement, dans des habitats plus stables, le RHT prévoit que les organismes présentent plutôt des stratégies favorisant l'acquisition des ressources et la compétitivité (e.g. durée de vie plus importante avec plusieurs épisodes de reproduction et une taille plus grande ; Townsend & Hildrew 1994).

Nous avons déjà souligné la similarité entre les processus de structuration des communautés et les processus évolutifs, les habitats jouant dans les deux cas le rôle de filtres. Dans le cas de l'évolution, ce filtre agit sur les gènes, ne sélectionnant que les génotypes associés aux adaptations les plus efficaces pour surmonter les contraintes environnementales. De manière similaire, dans le cadre de la structuration des communautés, le filtre de l'habitat agit sur les **traits d'histoire de vie**

des espèces (Keddy 1992b ; Poff 1997). Ces traits correspondent à une formalisation des informations qualitatives et/ou quantitatives disponibles sur la biologie et l'écologie des organismes. Ainsi la notion de niche écologique (*sensu* Hutchinson 1957) peut être appréhendée au travers des traits d'histoire de vie. Pour un taxon donné, chaque trait constitue alors une des dimensions de l'hypervolume correspondant à la niche « trait fonctionnel » du taxon (« **Functional Trait Niche** », FTN Poff *et al.* 2006). Cette niche peut être sub-divisée en deux niches : une **niche « eltonienne » basée sur les traits biologiques** définissant les caractéristiques adaptatives des taxons à leur habitat et une **niche « grinnellienne » basée sur les traits écologiques** définissant les préférences des taxons en termes d'habitat. Le potentiel de l'approche « traits » est d'ailleurs si important que McGill *et al.* (2006) recommande de reconsidérer toute l'écologie des communautés de ce point de vue.

Les caractéristiques de l'habitat n'agissent pas de manière isolée et indépendante sur chaque trait. Tout d'abord, l'habitat est composé d'une multitude de caractéristiques plus ou moins corrélées pouvant influencer les organismes (e.g. altitude, latitude, climat, vitesse de courant...). De plus, les traits des organismes ne sont pas indépendants les uns des autres et forment des **suites de traits** dont la mise en place (i) peut être contrainte par les aptitudes variables des espèces à acquérir une caractéristique biologique donnée compte tenu de leurs capacités adaptatives différentes suivant leur plan d'organisation (i.e. contraintes phylogénétiques ; Poff *et al.* 2006) et (ii) est le résultat de compromis entre traits (i.e. « *trade-off* »), l'acquisition d'une adaptation particulièrement efficace dans une situation donnée pouvant par exemple dispenser une espèce d'acquérir certaines adaptations complémentaires, ou de la facilitation (i.e. « *spin-off* »), c'est à dire que l'investissement réalisé par les organismes dans certains traits peut favoriser l'apparition d'autres caractéristiques (Verberk, Siepel & Esselink 2008). Plusieurs études ont toutefois montré que la contrainte de la phylogénie sur les traits (surtout écologiques) des macroinvertébrés benthiques était relativement faible (Statzner *et al.* 1997 ; Usseglio-Polatera *et al.* 2000b). Dans les études portant sur les relations habitat-traits, la prise en compte des relations entre traits nécessite le passage d'une analyse univariée (i.e. un gradient environnemental agit sur un trait) à des analyses plus globales faisant intervenir par exemple des analyses multivariées (Chevenet, Dolédec & Chessel 1994 ; Charvet *et al.* 2000 ; Archambault, Usseglio-Polatera & Vanden Bossche 2005) ou des regroupements d'espèces au sein

d'unités non taxonomiques partageant des suites de traits similaires (Usseglio-Polatera *et al.* 2000b ; Usseglio-Polatera *et al.* 2001) dont on va étudier la distribution relative, plusieurs suites de traits pouvant correspondre à une même **stratégie écologique** (Verberk *et al.* 2008).

L'utilisation des traits pour étudier les relations des organismes à leur habitat permet également, en adoptant une classification des communautés non plus basée sur l'appartenance systématique des taxons mais sur leurs caractéristiques biologiques, d'appréhender non seulement la structure mais également certains aspects du **fonctionnement** des communautés. En effet, certains traits biologiques peuvent être reliés directement (e.g. les sources de nourriture utilisées et les flux de matière organique) ou indirectement (e.g. la taille et le ratio production/biomasse) à certaines fonctions assurées par les communautés dans leurs écosystèmes (Bonada *et al.* 2006). Ainsi, de la même manière que le RHT lie les caractéristiques spatio-temporelles de l'habitat aux caractéristiques bio-écologique des organismes au sein des communautés, la fonction assurée par ces communautés peut être reliée, de manière conceptuelle, aux propriétés de leurs habitats. Une des théories « habitat-fonction » les plus connues en écologie aquatique est le **concept du continuum fluvial** (« *River Continuum Concept* » ou RCC, Vannote *et al.* 1980). D'après ces auteurs, les communautés s'adapteraient à la condition moyenne la plus probable du système physique dynamique que représente le chenal des cours d'eau. L'un des points majeurs du RCC est la prédiction que les communautés adapteraient leurs stratégies d'acquisition des ressources alimentaires en fonction de la disponibilité des différentes sources de matière organique le long du gradient longitudinal, disponibilité directement liée aux caractéristiques physiques (e.g. largeur et profondeur du chenal, turbidité de l'eau) du tronçon de cours d'eau dans lequel vivent les organismes.

La structuration des communautés serait donc le résultat de la sélection, parmi le pool régional, d'espèces dont les stratégies écologiques sont les mieux adaptées aux conditions environnementales locales (Keddy 1992a). Ce filtre environnemental peut être décomposé en plusieurs filtres s'organisant de manière hiérarchique (Poff 1997, cf. Fig. 1-2). Finalement, ce sont les interactions biotiques (e.g. compétition, prédation, parasitisme) entre les espèces ayant passé ces filtres environnementaux qui détermineraient la structure finale des communautés locales (Poff 1997).

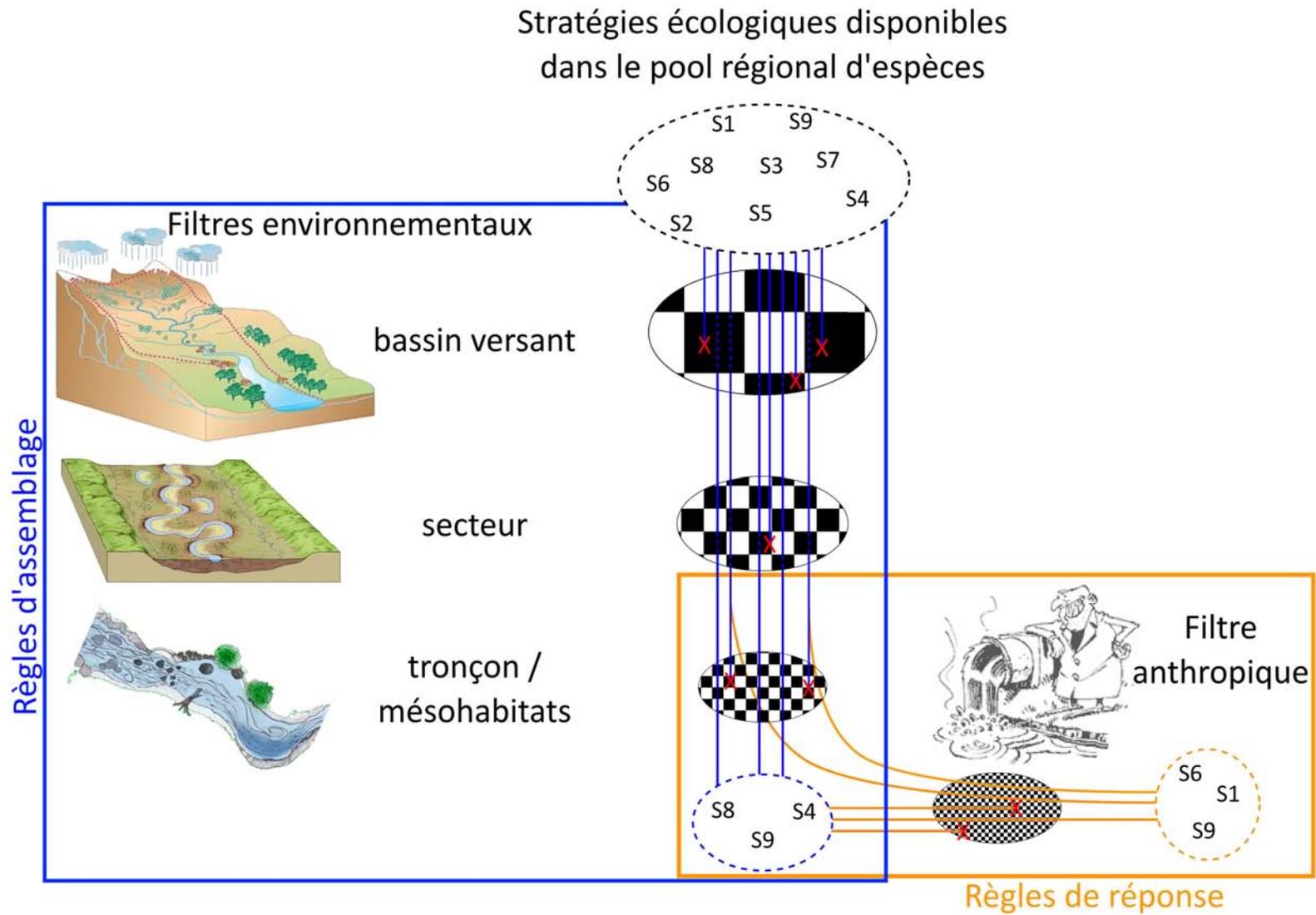


Figure 1-2. Représentation schématique de la structuration des communautés sous l'action des filtres naturels (règles d'assemblage, en bleu) et avec l'ajout d'un filtre anthropique (règles de réponse, en orange). D'après Keddy (1992a) et Poff (1997).

Dans ce travail de thèse, toutefois, nous ne nous focaliserons que sur l'action des filtres abiotiques. Une fois les communautés locales formées en suivant les règles d'assemblages, des **perturbations (= des modifications brutales et temporaires des caractéristiques de l'habitat)**, naturelles ou d'origine humaine, peuvent survenir. Les effets de ces perturbations sur les communautés peuvent être appréhendés par les **règles de réponse** (Keddy 1992a ; Fig. 1-2).

Ces règles de réponse diffèrent des règles d'assemblage sur deux points principaux : (i) le point de départ n'est pas un pool régional d'espèce mais des communautés déjà formées. Il convient donc de prédire quelles espèces vont être éliminées de la communauté (**règle de suppression**) et (ii) la perturbation va modifier le filtre environnemental « normal » et ainsi donner à certaines stratégies écologiques, présentes dans le pool régional mais qui ne satisfaisaient pas aux règles d'assemblage, une nouvelle chance de passer ce filtre environnemental et ainsi d'intégrer la nouvelle « version » de la communauté locale (**règle d'addition**, cf. Fig. 1-2). Les règles de réponse ont d'abord été définies en relation avec des perturbations naturelles (e.g. les incendies et les inondations : Keddy 1992a). Toutefois, il est rapidement apparu que ces règles d'assemblage et de réponse pouvaient également être mises à profit dans l'étude des effets de **modifications anthropiques des habitats** (Charvet, Kosmala & Statzner 1998 ; Fig. 1-2), que ces modifications soient des perturbations ou des **pressions (= des modifications durables et relativement stables des caractéristiques de l'habitat)**.

Les stratégies écologiques mises en place dans les communautés reflètent donc les caractéristiques de l'habitat telles qu'elles sont perçues par les espèces. Les organismes peuvent alors être considérés comme de véritables **témoins de leur environnement** (e.g. Usseglio-Polatera 1997). La connaissance de la composition et de la structure des communautés (i.e. les listes faunistiques ou floristiques) ainsi que des caractéristiques bio-écologiques (i.e. les traits et les stratégies écologiques) des espèces les composant devrait ainsi permettre d'obtenir des indications sur les caractéristiques mésologiques et fonctionnelles de l'écosystème étudié (Southwood 1977 ; Vannote *et al.* 1980).

Par extension, il devrait également être possible d'obtenir des informations sur la nature et l'intensité des modifications de l'habitat imputables aux pressions humaines en analysant les stratégies écologiques mises en places dans les communautés autochtones (Charvet *et al.* 1998 ; Dolédec, Stutzner & Bournaud. 1999). Les communautés ont depuis longtemps joué un rôle important en **bio-évaluation** et en **évaluation des risques**, principalement du fait de la pertinence de ce niveau d'organisation, en comparaison avec des niveaux inférieurs (e.g. espèce, population), pour estimer les impacts des activités humaines sur les écosystèmes (Attrill & Depledge 1997).

Dans les écosystèmes lotiques, quatre compartiments biologiques sont aujourd'hui réglementairement requis pour l'évaluation de la qualité écologique des cours d'eau (Annexe V dans European Council 2000) : les diatomées, les macrophytes, les **macro-invertébrés benthiques** et les poissons. Les invertébrés forment un groupe possédant des caractéristiques les rendant particulièrement intéressants en bio-évaluation :

- Les macro-invertébrés constituent un groupe taxonomique très hétérogène regroupant plusieurs phylums d'organismes. Cette grande diversité de formes confère à ce groupe une grande diversité de réponses potentielles aux perturbations, ce qui rend ce groupe particulièrement intéressant en bio-évaluation (Rosenberg & Resh 1993),
- Ces organismes ont une durée de vie relativement longue et sont, de plus, relativement sédentaires. Ces caractéristiques leur confèrent donc un bon potentiel intégrateur de la qualité de leur habitat à moyen terme (i.e. la longueur de leur cycle biologique).

Ces caractéristiques ont fait des invertébrés un groupe taxonomique utilisé très tôt en bio-évaluation (Kolkwitz & Marsson 1902 ; Kolkwitz & Marsson 1909) et qui a maintenant une longue et riche histoire dans cette discipline (Rosenberg & Resh 1993 ; Bonada *et al.* 2006), devenant le groupe d'organismes le plus utilisé pour l'évaluation des effets des pressions anthropiques sur la qualité des cours d'eau (Norris & Thorns 1999 ; Hering, Johnson & Buffagni 2006b). Dans l'histoire des macro-invertébrés en bio-évaluation, les traits ont depuis le début été pris en compte, bien que cela n'ait pas toujours été de manière explicite. Par exemple, le niveau de saprobie des espèces défini par Kolkwitz & Marsson (1902, 1909) repose sur la sensibilité de ces organismes à

une contamination organique. De même, les scores de sensibilité utilisés dans bon nombre d'indices biotiques européens (Armitage *et al.* 1983 ; de Pauw & Vanhooren 1983 ; AFNOR 2004) ne sont rien d'autres que des **traits de sensibilités des invertébrés aux perturbations anthropiques**. De plus, les invertébrés sont également le groupe d'organismes d'eau douce pour lequel l'approche traits bio-écologiques est la plus avancée. Au début des années 90, une équipe de chercheurs de l'université de Lyon a commencé à rassembler les informations auto-écologiques sur les macro-invertébrés benthiques disponibles dans la littérature et connues par les experts, afin de synthétiser cette information et la transcrire en profil d'affinité d'un taxon donné pour plusieurs modalités décrivant un trait biologique ou écologique (Bournaud, Richoux & Usseglio-Polatera 1992 ; Usseglio-Polatera 1992). Cette dynamique de recherche aboutira à la formalisation du codage flou (« fuzzy coding » : Chevenet *et al.* 1994) permettant la prise en compte de l'incertitude et du degré de variabilité associé aux données utilisées. L'application de cette démarche a ainsi permis de fournir les premiers tests des théories relatives à l'*Habitat Templet* en se basant sur des données acquises sur le haut Rhône français (Usseglio-Polatera 1994). Même si ces premiers tests du RHT portaient sur treize groupes taxonomiques différents (Resh *et al.* 1994 ; Statzner, Resh & Dolédec 1994a), c'est dans le groupe des invertébrés benthiques que les applications de la démarche « traits bio-écologiques » ont connu le plus fort développement, d'abord en France et en Europe (Usseglio-Polatera 1994 ; Statzner *et al.* 1997 ; Usseglio-Polatera *et al.* 2000b ; Usseglio-Polatera & Beisel 2002 ; Bady *et al.* 2005 ; Bonada, Rieradevall & Prat 2007) puis un peu partout dans le monde (Townsend, Dolédec & Scarsbrook 1997 ; Vieira *et al.* 2006 ; Tomanova *et al.* 2007 ; Schäfer *et al.* 2011). C'est donc naturellement que les macro-invertébrés benthiques ont fait partie des premiers organismes pour lesquels les traits bio-écologiques ont été utilisés en bio-évaluation des cours d'eau (Charvet *et al.* 1998 ; Dolédec *et al.* 1999 ; Usseglio-Polatera *et al.* 2000a).

La bio-évaluation est l'un des thèmes de recherches traditionnels en écologie appliquée (Statzner *et al.* 2001) et la définition d'un outil de bio-évaluation « idéal » suppose qu'il satisfasse à un certain nombre de critères (Dolédec *et al.* 1999). Pour les macro-invertébrés benthiques, Bonada *et al.* (2006) ont listé 12 caractéristiques majeures qu'un tel outil devrait présenter (Tableau 1-I).

Tableau 1-I. Douze critères pour définir un outil de bio-évaluation idéal utilisant les macro-invertébrés benthiques (d'après Bonada et al. 2006).

	Critère	Validation de l'approche « traits »
Méthode		
I	doit dériver de concepts théorique solides en écologie	Townsend & Hildrew 1994
II	a priori prédictif	Townsend & Hildrew 1994
III	peut estimer le fonctionnement écologique	Vannote et al. 1980
IV	peut identifier un impact anthropique global	Dolédec et al. 1999
V	peut identifier différents types d'impacts anthropiques	Statzner & Bêche 2010
Application		
VI	faibles coûts (i) d'échantillonnage et de tri (approche de terrain) ou (ii) des expériences (approche de laboratoire)	Bady et al. 2005
VII	protocole d'échantillonnage simple	Bady et al. 2005
VIII	faible coût d'identification des taxons (pas de spécialistes requis)	Gayraud et al. 2003
Performance		
IX	application à large échelle	Statzner et al. 2005 ; Pollard & Yuan 2010
X	indication fiable des changements de l'impact anthropique global	Usseglio-Polatera & Beisel 2002
XI	indication fiable des changements de différents types d'impacts anthropiques	Townsend, Uhlmann & Matthaei 2008
XII	réponse linéaire aux impacts anthropiques	

Au final, ces auteurs considèrent qu'un outil de bio-évaluation basé sur une combinaison de traits bio-écologiques peut présenter, au moins partiellement, 10 de ces 12 caractéristiques. Les points XI (i.e. une identification fiable de différents types d'impacts anthropiques) et XII (i.e. une réponse linéaire aux impacts anthropiques) ne pouvant être validés faute de données publiées suffisantes au moment de la rédaction de leur article (tableau 1-I). L'approche traits bio-écologiques, de par son aspect multi-métrique, a le potentiel de discriminer différents types d'impacts anthropiques (Statzner & Bêche 2010 ; Culp et al. 2011). Il a effectivement été démontré (i) que les réponses bio-écologiques des communautés benthiques différaient en fonction du type

d'impact anthropique subi (Archambault 2003) et (ii) que ces réponses bio-écologiques pouvaient permettre de démêler les effets individuels de combinaisons de perturbations simples (e.g. des apports en sédiment et en nutriments, Townsend *et al.* 2008 ; une contamination métallique et le trafic fluvial, Dolédec & Statzner 2008).

Toutefois, l'efficacité de l'approche multi-traits dans des situations de multi-pressions plus complexes, et souvent plus proches des situations rencontrées sur le terrain, reste encore à prouver. De même, une relation linéaire entre les gradients de pressions et les réponses des traits bio-écologiques ne semble pas être un type de réponse commun (Bonada *et al.* 2006). Toutefois, la présence d'un gradient de réponses de certains traits biologiques à un gradient de pression a été démontrée pour plusieurs types de pression (e.g. l'utilisation agricole des sols : Dolédec *et al.* 2006 ; l'acidification : Petrin 2011 ; la contamination toxique de sédiments : Archambault *et al.* 2010).

De plus, Culp *et al.* (2011) listent cinq points potentiellement profitables à la bio-évaluation du fait d'une utilisation d'approches basées sur les traits :

1. la possibilité de fournir des liens mécanistiques entre les réponses biologiques et les conditions environnementales,
2. des métriques communes et stables à large échelle spatiale,
3. une stabilité temporelle plus importante que celle des métriques taxonomiques (Bêche, McElravy & Resh 2006 ; Bêche & Resh 2007),
4. la possibilité d'intégrer facilement ces approches basées sur les traits dans les programmes et réseaux actuels de bio-évaluation,
5. la plus grande utilité des résultats des études de bio-évaluation en évaluation des risques écologiques (« **ecological risk assessment** » ou ERA) (voir aussi Beketov *et al.* 2009).

Il apparaît donc clairement que les approches de bio-évaluation classiquement utilisées, notamment celles à des fins réglementaires, pourraient grandement profiter de l'intégration des traits bio-écologiques permettant par là même de fournir des liens plus forts entre bioévaluation et fonctionnement des écosystèmes que ce qui peut être réalisé avec des méthodes basées seulement sur la taxonomie (van den Brink *et al.* 2011). Après environ 20 ans de maturation, l'approche trait semble même, d'après Statzner & Bêche (2010), sur le point d'ouvrir une nouvelle ère en bio-évaluation : l'ère des traits biologiques comme indicateurs (« *biological traits as indicators* » ou BTI).

La **directive européenne cadre sur l'eau** (DCE, European Council 2000) apporte, dans ce contexte, une opportunité unique pour tester l'intérêt de l'approche traits en bio-évaluation, non seulement du point de vue scientifique mais également du point de vue des gestionnaires et des décideurs politiques. En effet, les méthodes réglementaires d'évaluation antérieures à la directive ne permettaient de ne prendre en compte qu'un aspect restreint de la qualité des eaux car n'intégrant généralement, au niveau européen, que la qualité physico-chimique des eaux de surface, négligeant ainsi les effets des pressions sur les organismes, communautés et écosystèmes. Au contraire, la **DCE met la qualité écologique au cœur du processus d'évaluation de la qualité des masses d'eau** et demande à ce que les outils devant fournir cette évaluation écologique répondent à un certain nombre de critères. Deux critères sont particulièrement importants et applicables à l'ensemble des éléments de qualité biologiques (EQB) : (i) l'obligation de réaliser l'évaluation par rapport à une **situation de référence** (Reynoldson *et al.* 1997) et (ii) une évaluation qui doit **prendre en compte la typologie des masses d'eau** (Chandesris *et al.* 2006). Pour l'EQB « invertébrés benthiques » en cours d'eau, s'ajoutent trois critères sur les aspects de la communauté que doivent prendre en compte les métriques intégrées aux méthodes de bio-évaluation, à savoir : (iii) l'abondance, (iv) la diversité et (v) le ratio espèces sensibles sur espèces tolérantes (Annexe V dans European Council 2000). En France, la méthode actuellement normalisée pour évaluer la qualité écologique des cours d'eau à partir des macro-invertébrés benthiques, i.e. l'indice biologique global normalisé (IBGN, AFNOR 2004), ne répond pas à ces exigences. Il a donc été décidé par le ministère de l'environnement d'initier le développement d'une nouvelle méthode de bio-évaluation DCE-compatible.

Les objectifs de ce travail de thèse sont multiples et seront présentés dans ce manuscrit en deux parties de trois chapitres chacune. Dans un premier temps (Chapitre II), les sites étudiés ainsi que les traits bio-écologiques et certaines analyses statistiques utilisés tout au long de ce manuscrit seront présentés. La première partie (chapitres III à VI) s'intéressera plus particulièrement à tester l'intérêt de l'approche « traits bio-écologiques potentiels » en bio-évaluation.

Dans le **chapitre III**, la démarche et les résultats de la construction du **nouvel indice invertébré (I₂M₂) de bio-évaluation utilisable en cours d'eaux peu profonds** seront présentés. Dans ce travail, les communautés benthiques seront décrites à la fois par des métriques taxonomiques et par des métriques basées sur les traits, et la meilleure combinaison de métriques pour discriminer les stations présentant un niveau de pression significatif de celles les plus proches de conditions de référence (= « *least impaired river reaches* » ou LIRRs) sera recherchée. Ce travail permettra de tester l'intérêt de l'intégration d'une approche « traits » à l'approche fondamentalement taxonomique classiquement utilisée pour décrire le niveau d'altération de la qualité écologique des stations.

En complément de l'évaluation de la qualité écologique, une identification des différentes pressions responsables de la dégradation de l'état écologique est nécessaire (Townsend *et al.* 2008). Dans le **chapitre IV**, une approche par modélisation des risques de pressions est présentée. Cet **outil diagnostique associé à l'I₂M₂** utilisera les différences de stratégies bio-écologiques mises en places par les communautés benthiques sous l'action des pressions pour prédire la probabilité que les stations soient impactées par chacun des 16 types de pressions pris en compte.

La bio-évaluation ne se limite pas à l'évaluation réglementaire de la qualité écologique des systèmes. L'étude de **l'évolution de la biodiversité face aux perturbations anthropiques** est également un sujet d'une importance capitale (Chapin III *et al.* 2000). Dans le **chapitre V**, nous nous focaliserons sur un aspect particulier de cette bio-diversité, à savoir la diversité fonctionnelle et plus particulièrement **l'homogénéisation fonctionnelle** (Devictor *et al.* 2008) **de communautés benthiques soumises aux pressions anthropiques**.

Dans ces trois chapitres, chaque trait bio-écologique sera appréhendé au travers d'une variable (le **biotrait**) composée de plusieurs modalités décrivant les différents états possibles du trait considéré. L'affinité des taxons pour chacune de ces modalités étant codée sur la base d'études bibliographiques et d'avis d'experts (cf. §2.3.1 ; Chevenet *et al.* 1994). Ces biotraits permettront donc d'obtenir une première estimation de la niche écologique fondamentale des organismes. Comme nous l'avons vu plus haut, cette niche fondamentale, par définition, ne décrit que les potentialités de chaque taxon et non la niche écologique qu'il occupe réellement dans les systèmes naturels (i.e. la niche écologique réalisée, Hutchinson 1957). De la même manière que la niche fondamentale peut être estimée avec les valeurs de biotraits (i.e. « **traits potentiels** »), la niche réalisée peut être estimée avec les valeurs observées des traits bio-écologiques dans une situation déterminée (i.e. « **traits réalisés** »).

La prise en compte des traits réalisés et donc de la variabilité « intra-taxon » a connu un regain d'intérêt récent en écologie des communautés (Blanck & Lamouroux 2007 ; Albert *et al.* 2010b ; Berg & Ellers 2010 ; Bolnick *et al.* 2011). Il a été démontré, par exemple, dans deux études indépendantes portant sur des communautés végétales différentes que si la variabilité intra-spécifique de trois traits fonctionnels (hauteur des plantes, surface foliaire et contenu en matière sèche des feuilles) était bien inférieure à la variabilité inter-spécifique, elle représentait tout de même une part non négligeable (> 30%) de la variabilité totale observée pour ces traits entre communautés exposées à des conditions environnementales différentes (Albert *et al.* 2010a ; Jung *et al.* 2010). De même, dans une étude sur onze traits biologiques mesurés dans des populations européennes et nord-américaines appartenant à 25 espèces de poissons d'eau douce, Blanck & Lamouroux (2007) ont montré que la part de la variabilité totale expliquée par la composante intra-spécifique était importante ($46,9 \pm 27,5\%$), et même majoritaire pour six de ces traits. La plasticité (phénotypique ou génétique) des organismes pour un certain nombre de traits d'histoire de vie peut donc avoir des conséquences importantes aussi bien sur les interactions entre taxons que sur le fonctionnement des écosystèmes (Miner *et al.* 2005 ; Lecerf & Chauvet 2008 ; Bolnick *et al.* 2011).

De plus, les niveaux taxonomiques utilisés pour la détermination des invertébrés benthiques dans ce travail de thèse sont plus élevés que le niveau spécifique (cf. Tableau 2-V), les taxons étudiés peuvent donc regrouper des espèces ayant des profils de traits sensiblement différents. De ce fait, les profils réalisés de traits pour les assemblages faunistiques étudiés peuvent être significativement différents de leurs profils de trait potentiels qui ont été utilisés dans les chapitres III à V.

Il convient donc de tester si la prise en compte de ces profils de traits réalisés change significativement les conclusions effectuées sur la base des traits potentiels, quant au rôle des pressions anthropiques comme filtres environnementaux. En effet, Jung *et al.* (2010) ont démontré que la prise en compte de la variabilité intra-spécifique de trois traits mesurés sur des individus appartenant à des communautés végétales soumises à un gradient d'inondation permettait une meilleure mise en évidence des mécanismes d'assemblage des communautés (filtre environnemental et différenciation de niches) le long de ce gradient que la seule considération des traits potentiels.

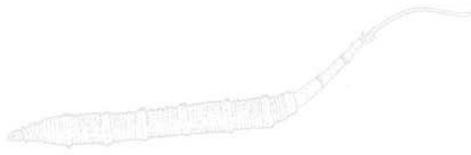
Le but de la deuxième partie de ce manuscrit (chapitres VI à VIII) n'est pas de fournir une comparaison directe entre traits potentiels et traits réalisés mais **de proposer et de tester des approches basées sur de nouveaux traits (isotopiques, stœchiométriques et protéomiques)**. Nous pensons que ces nouveaux traits ont capacité à nous fournir des informations précises sur l'aspect « réalisé » des niches écologiques des taxons.

L'approche isotopique est de plus en plus utilisée pour reconstituer les régimes alimentaires et la structure des réseaux trophiques (Füreder, Welter & Jackson 2003 ; Li & Dudgeon 2008 ; Bergfur *et al.* 2009). Dans le **chapitre VI**, nous avons donc testé si l'analyse des **régimes alimentaires estimés par une analyse en isotopie stable ($\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$)** permettait de confirmer, de nuancer ou d'infirmier les conclusions obtenues avec l'approche « trait biologique potentiel ».

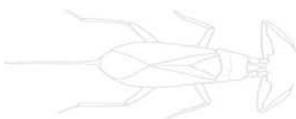
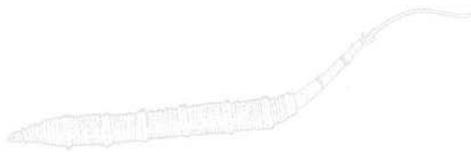
La stœchiométrie écologique est une discipline récente mais dont le potentiel est important. Une des hypothèses centrales de cette discipline propose de **relier la composition élémentaire (en carbone, azote et phosphore) des organismes à leur taux de croissance** (Elser *et al.* 1996). Dans le **chapitre VII**, nous avons donc (i) testé la validité de cette hypothèse pour les macro-invertébrés benthiques et (ii) confronté les résultats obtenus avec les traits stœchiométriques aux résultats obtenus avec l'approche « traits biologiques potentiels ».

La protéomique est un domaine de recherche au développement récent, qui permet de mesurer simultanément un grand nombre de réponses moléculaires sur un même organisme (Liebler 2001). Cette démarche est particulièrement intéressante dans la mesure où les traits phénotypiques sont des caractères des espèces qui peuvent être considérés comme le produit final de nombreux processus moléculaires et biochimiques (van den Brink *et al.* 2011), parmi lesquels l'expression des protéines joue un rôle central. Ainsi, la mesure simultanée de l'ensemble des protéines d'un organisme pourrait permettre d'estimer, en une seule et même analyse un grand nombre de traits réalisés. Dans le **chapitre VIII**, nous testerons donc les potentialités de cette nouvelle approche en bio-évaluation en **comparant les réponses protéomiques d'organismes engagés dans des cours d'eau présentant différents niveaux d'acidification**.

Pour conclure ce manuscrit, les principaux résultats obtenus seront rappelés et un certain nombre de perspectives de recherches seront données dans le chapitre IX.



Chapitre II: Matériel & méthodes



Ce chapitre décrit les sites d'étude et les traits bio-écologiques utilisés dans ce travail de thèse. Les grands principes d'une famille de méthodes d'analyse de données utilisée de manière récurrente dans les différentes parties de ce mémoire sont également donnés dans ce chapitre.

Les protocoles expérimentaux et les méthodes d'analyse de données plus spécifiques à certaines parties de ce travail de thèse seront décrits dans les chapitres correspondants.

2.1 – Base de données nationale

Cette base regroupe les données faunistiques et environnementales récoltées sur deux réseaux nationaux : le réseau de sites de référence (RSR) et le réseau de contrôle de surveillance (RCS). Cette base de données a été approvisionnée par les DREAL et les Agences de l'Eau dont les données ont été intégrées et gérées par l'IRSTEA (groupement de Lyon), qui a mis régulièrement à notre disposition des extractions de cette base sur la période 2008-2011.

2.1.1 – La typologie des cours d'eau français

Afin de répondre aux exigences de la DCE, notamment en ce qui concerne la définition des conditions de référence, la variabilité environnementale naturelle devait être prise en compte. Cette prise en compte a amené à la définition d'une typologie des cours d'eau français. Pour réaliser cette typologie, la DCE propose deux systèmes typologiques: (i) une approche régionalisée, le système A, basée sur un ensemble fini de critères simples à prendre en compte et reposant sur des classes aux limites définies a priori et (ii) une approche de classification, le système B, basé sur un ensemble de paramètres obligatoires et optionnels dont les limites sont plus souples (Tableau 2-I).

Tableau 2-1: Systèmes typologiques proposés par la DCE

Système A		Système B	
Régionalisation		Classification	
		Paramètres obligatoires	
Ecorégions	Illies (1978)	Latitude / Longitude	
Altitude	> 800 m	Altitude	
	200 – 800 m	Géologie	
	< 200 m	Dimensions du bassin versant	
Géologie	calcaire	Paramètres optionnels	
	siliceux		
	organique		
Taille du bassin versant	> 10 000 km ²	Distance à la source	Débit
	1 000 – 10 000 km ²	Largeur moyenne	Substrat
	100 – 1 000 km ²	Profondeur moyenne	Température
	10 – 100 km ²	Pente moyenne	Précipitations
		Forme du lit principal	Chlorures

2.1.1.1 – Les hydro-écorégions (HER)

Wasson *et al.* (2002) approuvaient le principe d'une démarche par régionalisation mais estimèrent toutefois que les écorégions proposées par la DCE étaient inadaptées au contexte français car établies d'après la seule distribution des invertébrés aquatiques (Illies 1978) et n'étaient donc pas représentatives du fonctionnement des cours d'eau. De plus, ils estimèrent également que les limites de classes prédéfinies (i.e. système A) n'étaient pas adaptées et amenaient à masquer certaines discontinuités naturelles.

Pour ces raisons, ils développèrent un nouveau système typologique combinant les systèmes A et B. L'approche par régionalisation est conservée, mais les écorégions proposées par la DCE sont délaissées au profit d'hydro-écorégions (HER ; Wasson *et al.* 2002) définies comme des zones homogènes au regard de déterminants primaires du fonctionnement des cours d'eau (relief, géologie, climat). En se basant sur les résultats obtenus par un système d'information géographique (SIG), l'identification des différentes HERs s'est faite sur avis d'experts pour la recherche de discontinuités naturelles dans les valeurs des trois déterminants principaux. Ce travail a permis de définir 22 HER de premier niveau (Fig. 2-1).

Un second niveau hiérarchique, les HER 2, a également été défini. Ces HER 2, de taille plus modeste et comprises dans les HER 1, ont été définies en se basant sur un découpage plus fin des trois déterminants primaires.

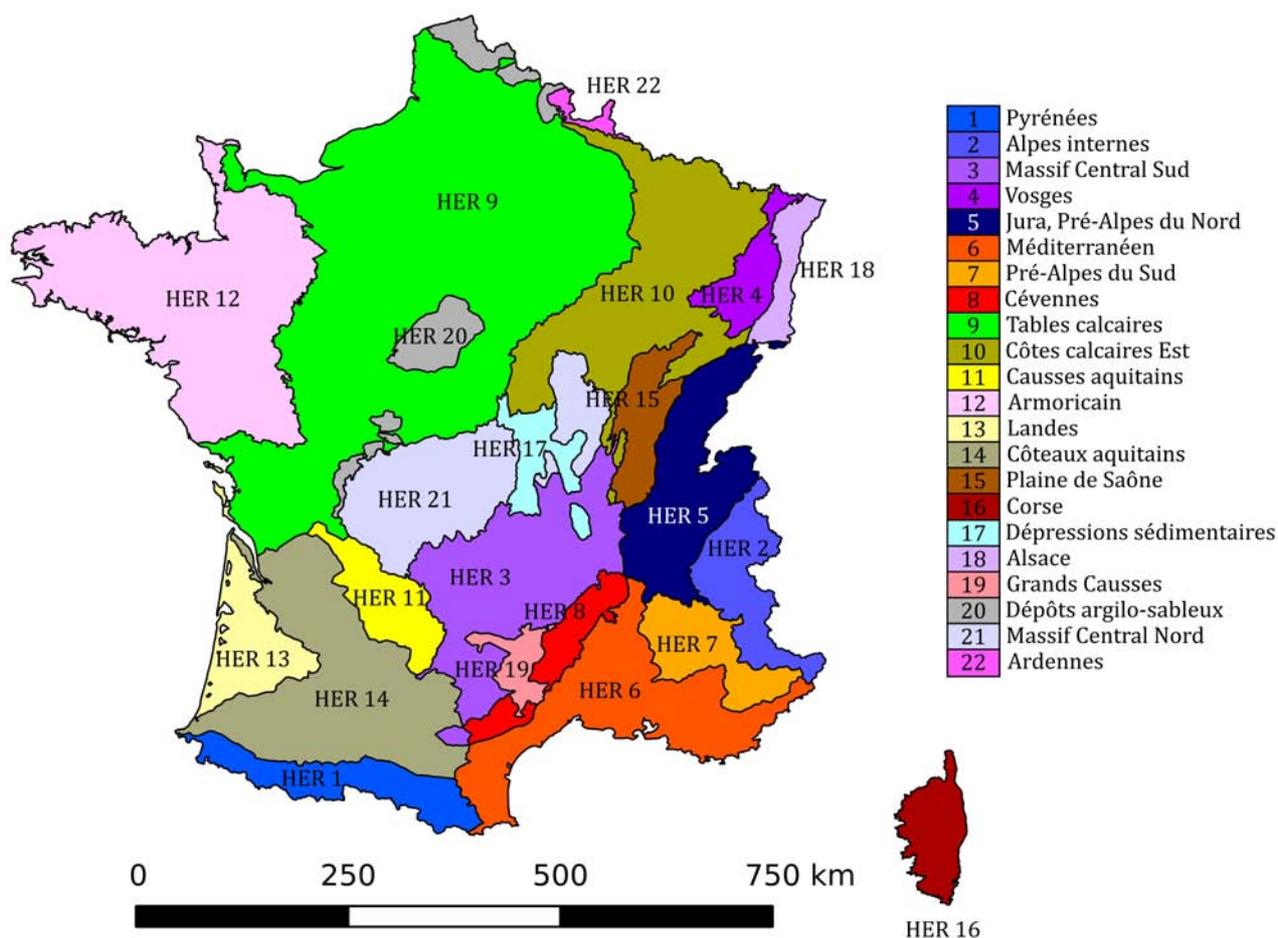


Figure 2-1. Hydroécorégions de France métropolitaine et de Corse (d'après Wasson et al. 2002)

La taille des cours d'eau, « l'héritage amont » (i.e. les caractéristiques majeures du bassin versant drainé, parfois différentes des caractéristiques propres du site inventorié) et les caractéristiques particulières de certaines HER 2 (Chandesris et al. 2006) ont également été pris en compte dans la définition de la typologie des cours d'eau français (Annexe I; MEDD 2005).

2.1.1.2 – Taille des cours d'eau

Les classes de tailles sont au nombre de cinq: « Très Petit » (TP), « Petit » (P), « Moyen » (M), « Grand » (G), « Très Grand » (TG) et sont définies en se basant sur les rangs de Strahler (Strahler 1957) comme indiqué dans le Tableau 2-II.

Tableau 2-II. Attribution des masses d'eau à une classe de taille d'après leur rang de Strahler (d'après MEDD 2005)

Classe de taille	Rang de Strahler (bassin Loire-Bretagne)	Rang de Strahler (autres bassins)
Très petit (TP)	1, 2, 3	1, 2
Petit (P)	4	3
Moyen (M)	5	4
Grand (G)	6	5
Très grand (TG)	7, 8	6, 7, 8

Le croisement des informations « HER de premier niveau » et « classe de taille » constitue la base de la typologie nationale (*Annexe I*; MEDD 2005 ; Chandesris *et al.* 2006). Dans les chapitres suivants, du fait de la quantité variable de données environnementales et surtout faunistiques disponibles au moment des analyses (spécialement de données en conditions proches des conditions naturelles) pour chacun de ces types de cours d'eau, cette typologie n'a pas été utilisée en tant que telle. Elle a cependant servi de base à la mise au point de typologie simplifiées obtenues par regroupement de types nationaux en prenant en compte la continuité longitudinale des cours d'eaux, eg. par regroupement de cours d'eaux de classes de tailles adjacentes au sein d'une même HER.

2.1.2 – Caractérisation des stations

2.1.2.1 – Caractérisation de la qualité de l'eau

La qualité chimique de l'eau des stations appartenant aux réseaux nationaux a été suivie en parallèle à la qualité biologique. La caractérisation de la qualité chimique de l'eau a été réalisée en considérant un nombre variable de paramètres parmi 173 (*Annexe II*) répartis en 10 catégories de pression chimique (Tableau 2-III) définies d'après les grilles du Seq-Eau 2^{ème} version (Oudin & Maupas 2003). Les opérations de surveillance de la qualité biologique et chimique n'ont pas été réalisées aux mêmes dates et avec la même fréquence. Pour une station donnée à une date d'échantillonnage faunistique déterminée, il a été attribué à chaque paramètre de la qualité de l'eau, la valeur moyenne obtenue par cette station sur les six mois précédant l'échantillonnage faunistique (4.16 +/- 2.17 mesures de qualité de l'eau étaient en moyenne disponibles, par site et par paramètre, sur cette période).

Pour chaque paramètre, les valeurs seuils du « Seq-Eau 2 » ont été utilisées pour attribuer à chaque opération de contrôle l'un ou l'autre des deux niveaux de pression : « faible » ou « significatif ». Le niveau de pression faible correspond à des niveaux de pression pour lesquels la qualité biologique est au moins « bonne » alors qu'un niveau significatif de pression correspond au mieux à une qualité biologique « moyenne ».

2.1.2.2 – Caractérisation de la dégradation physique de l'habitat

Les dégradations physiques de l'habitat ont également été caractérisées pour chaque station en prenant en compte dix paramètres (*Annexe III*) répartis en sept types de pression (Tableau 2-III). De manière similaire à ce qui a été fait pour la qualité de l'eau, chaque site s'est vu allouer un niveau de pression (« faible » ou « significatif ») pour chaque paramètre par comparaison des valeurs de métriques obtenues pour un point de prélèvement donné aux valeurs seuils définies, pour chaque paramètre, par l'IRSTEA (groupement de Lyon). Les paramètres ont été mesurés en utilisant le système d'information géographique ArcGis 9.2 (ESRI 2006).

Tableau 2-III. Liste des pressions relatives à la qualité de l'eau et à la qualité de l'habitat physiques prises en compte

<i>Qualité de l'eau</i>	<i>Qualité de l'habitat</i>
WQ1 – Matières Organiques et Oxydables	HD1 – Voies de communication
WQ2 – Matières azotées (hors nitrates)	HD2 – Ripisylve
WQ3 – Nitrates	HD3 – Urbanisation (100m)
WQ4 – Matières phosphorées	HD4 – Risque de colmatage
WQ5 – Matières en suspension	HD5 – Instabilité hydrologique
WQ6 – Acidification	HD6 – Taux de rectitude
WQ7 – Micro-polluants minéraux	HD7 – Anthropisation du bassin versant
WQ8 – Pesticides	
WQ9 – HAP	
WQ10 – Micro-polluants organiques	

Pour chaque type de pression (qualité de l'eau ou de l'habitat), le niveau de pression attribué à un site donné correspond au plus fort niveau de pression attribué à ce site par les paramètres élémentaires associés à ce type de pression (principe du paramètre le plus déclassant).

2.1.3 – Les réseaux nationaux

2.1.3.1 – Le Réseau de Sites de Référence (RSR)

La qualité écologique d'un tronçon de cours d'eau doit être exprimée en termes d'écart à une référence établie par type de cours d'eau. Il convient donc d'établir des conditions de référence par type de cours d'eau. Il faut donc sélectionner pour chacun de ces types de cours d'eau un certain nombre de sites de référence dont l'échantillonnage faunistique devrait permettre d'estimer l'état de référence biologique associé, pour le compartiment « macro-invertébrés benthiques ». La circulaire DCE 2004/08 (MEDD 2004) donnait ainsi dans son annexe 2 des recommandations pour la recherche de ces stations de référence en se basant sur une estimation multi-échelles (bassin versant, tronçon, station) des facteurs de pression anthropique dont les valeurs devaient être minimisées pour qu'une station soit sélectionnable dans le réseau de sites de référence. A l'issue de cet exercice, 391 stations ont été sélectionnées et échantillonnées entre fin 2004 et 2007.

En 2009, l'IRSTEA (groupement de Lyon) a réalisé une validation a posteriori des sites du réseau de référence (Mengin *et al.* 2009) en se basant d'une part sur les données physico-chimiques et d'occupation des sols acquises entre 2004 et 2007 et d'autre part sur les recommandations du groupe européen « Reference Conditions » (REFCOND : EC REFCOND Working Group 2001). Ce travail a permis de considérer, au vu des critères pris en compte, c 245 sites comme conformes à leur statut de site de référence, 56 sites comme sites à la limite de la conformité (mais secondairement « repêchés ») et 90 sites comme non conformes au statut pré-établi de site de référence (Fig. 2-2). Un ensemble de 301 (245 + 56) sites a donc été finalement validé pour établir les conditions de référence biologiques.

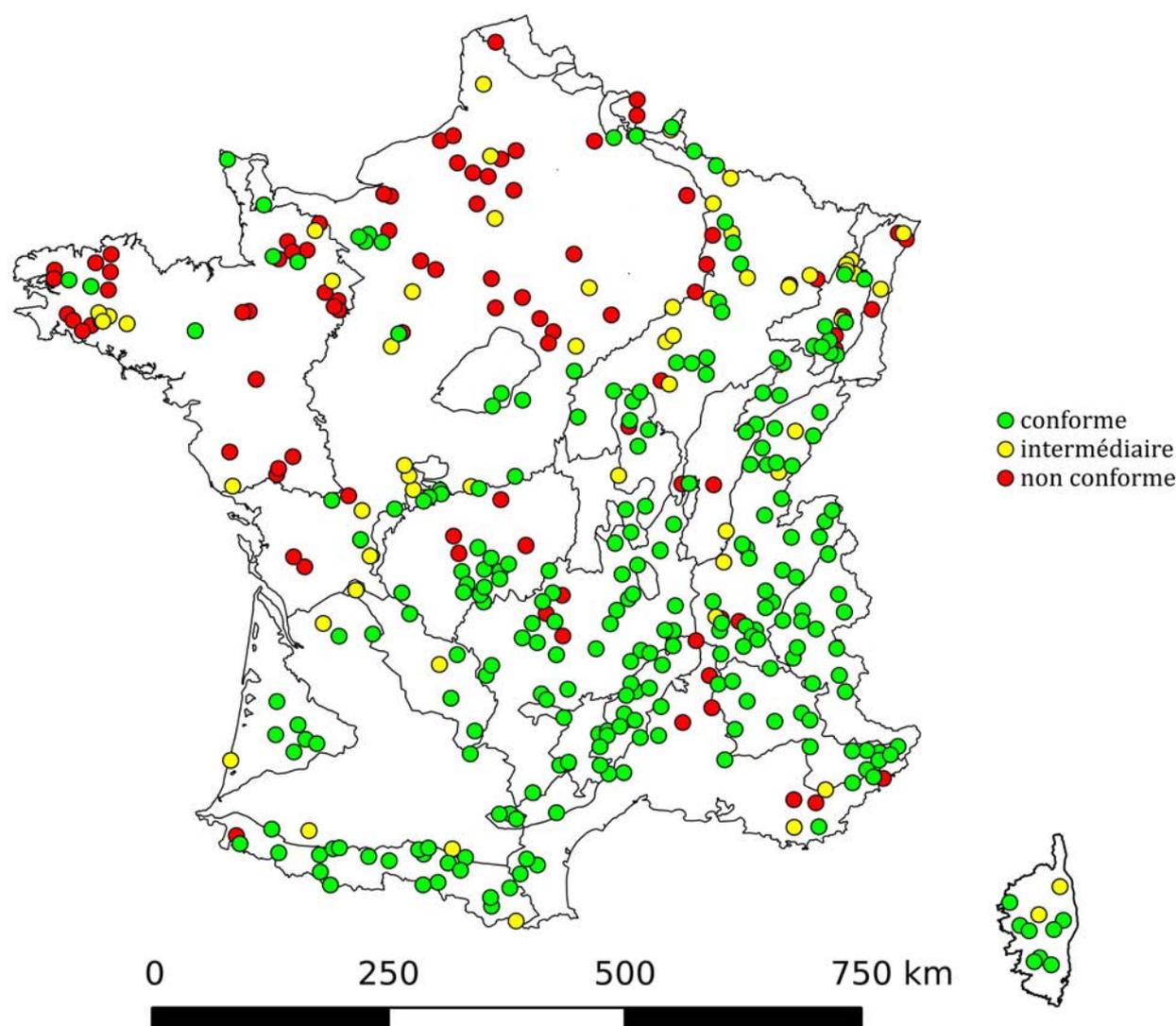


Figure 2-2. Qualification des 391 sites du réseau national de référence par HER de premier niveau (d'après Mengin *et al.* 2009)

2.1.3.2 – Le Réseau de Contrôle de Surveillance (RCS)

Mis en place en 2007, le RCS est un réseau qui diffère du précédent par les objectifs affichés. Là où le RSR avait pour but d'établir et de suivre les conditions de référence par type de cours d'eau, le RCS a pour objectif premier le suivi de la qualité générale des masses d'eau à l'échelle nationale. Pour cela, les stations ont été choisies non plus sur un critère de moindre impact anthropique, mais pour leur représentativité de la masse d'eau à laquelle elles appartiennent. Ce réseau est plus étendu que le RSR. Il comporte en effet 1503 sites (Fig. 2-3) dont 122 sont communs avec le RSR.

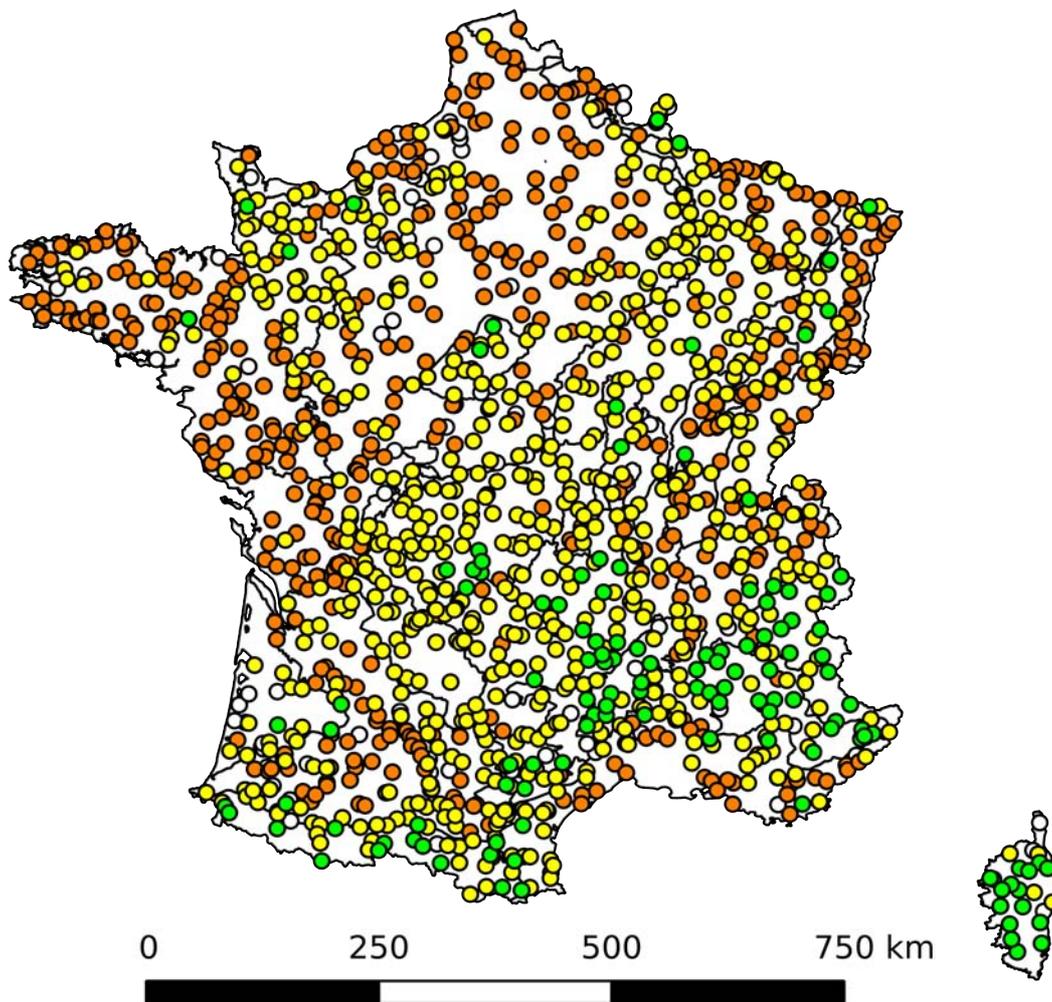


Figure 2-3. Classification des 1503 sites du réseau de contrôle et de surveillance en fonction du niveau d'anthropisation de leur bassin versant (vert : bon état ; jaune : état moyen ; orange : état médiocre ; blanc : pas de données).

2.1.4 – Techniques de prélèvement

Au niveau Européen, la plupart des méthodes de bio-indication basées sur les macro-invertébrés sont de type AQEM (Hering *et al.* 2004a) et reposent sur un échantillonnage des principaux substrats présents sur une station (i.e. au prorata de leurs surfaces de recouvrement relatives) de manière à obtenir une image moyenne du peuplement invertébré de la station. Toutefois, ce type d'échantillonnage amène à ne pas considérer des habitats peu représentés (i.e. de surface relative inférieure à 5% de la mosaïque benthique : e.g. bryophytes, litières et chevelus racinaires) mais pouvant abriter un cortège d'espèces spécifique qui peut apporter de précieuses informations écologiques, notamment sur les premiers stigmates associés à une éventuelle perturbation (Archambault 2003 ; Piscart, Moreteau & Beisel 2006a). A l'inverse, l'ancien protocole de prélèvement normalisé national (IBGN, AFNOR 2004) privilégiait l'échantillonnage de ces habitats marginaux biogènes, au risque de biaiser fortement la représentativité stationnelle du peuplement invertébré obtenu par application du protocole d'échantillonnage préconisé.

Afin de combiner les avantages respectifs de ces deux méthodes et autoriser le calcul d'une note « équivalent IBGN » autorisant encore l'utilisation des données anciennes lors de suivi de sites sur de longues chroniques de données, un nouveau protocole d'échantillonnage a donc été proposé puis utilisé sur les RSR et RCS.

Les protocoles successivement utilisés sur le réseau RSR (2005-2007) et RCS (2007-2012) diffèrent légèrement. En effet, le protocole appliqué sur le RCS (AFNOR 2009 & AFNOR 2010) est une version simplifiée (et secondairement normalisée) du protocole appliqué sur le RSR (Usseglio-Polatera & Wasson 2005), qui autorise un regroupement des 12 prélèvements unitaires en trois « bocalaux » et une utilisation plus généralisée du sous-échantillonnage au moment du tri et du dénombrement des macroinvertébrés (cf. *Annexes IV & V*).

Les 12 prélèvements unitaires sont réalisés avec un filet Surber normalisé (1/20 m², 0.5 mm de vide de maille) ou au filet troubleau en fonction de l'accessibilité des substrats. Les surfaces relatives de recouvrement des différents substrats sont d'abord estimées visuellement, puis les substrats sont classés en substrats « dominants » (i.e. avec une surface relative supérieure ou

égale à 5% de la mosaïque benthique stationnelle) et substrats « marginaux » (i.e. avec une surface relative strictement inférieure à 5%). Une fois les différents substrats repérés, le plan d'échantillonnage peut être construit (cf. AFNOR 2009) :

- dans un premier temps, les substrats marginaux sont échantillonnés en fonction de leur ordre de priorité (Tableau 2-IV) → bocal 1 « B1 »
- les substrats dominants sont ensuite échantillonnés en fonction de leur ordre de priorité → bocal 2 « B2 »
- pour finir, un échantillonnage complémentaire (i.e. prenant en compte les prélèvements déjà effectués en B1 et B2) est réalisé sur les substrats dominants au prorata de leurs surfaces de recouvrement relatives, après avoir complété l'échantillonnage des substrats dominants présents suivant l'ordre de priorité préconisé (dans les cas où plus de 4 substrats dominants seraient simultanément présents au sein de la mosaïque de substrats) → bocal 3 « B3 »

Les éléments minéraux et organiques grossiers sont soigneusement examinés et lavés avant d'être éliminés, le reliquat des prélèvements est ensuite fixé/conservé sur le terrain soit avec du formaldéhyde (concentration finale: 4%), soit avec de l'éthanol (concentration finale: 70%).

Tableau 2-IV. Substrats échantillonnés et protocole de prélèvements selon le protocole multi-habitats normalisé (d'après AFNOR 2009)

<i>Définition du substrat</i>	<i>Code sandre</i>	<i>Ordre de priorité</i>	<i>Protocole de prélèvement</i>
Bryophytes	S1	11	végétal seul (sur bloc) ou avec élément support (sur cailloux)
Spermaphytes immergés (hydrophytes)	S2	10	inclut la couche superficielle du sédiment
Débris organiques grossiers (litières)	S3	9	inclut la couche superficielle du sédiment
Chevelus racinaires, supports ligneux	S5	8	végétal seul
Sédiments minéraux de grande taille (pierres, galets) (25 à 250 mm)	S24	7	inclut les différentes classes granulométriques de sédiments
Blocs (> 250 mm) inclus dans une matrice d'éléments minéraux de grande taille (25 à 250 mm)	S14	6	inclut les sédiments et la faune associés au bloc (abris sous bloc)
Granulats grossiers (graviers) (2 à 25 mm).	S9	5	inclut les différentes classes granulométriques de sédiments
Spermaphytes émergents de strate basse (hélrophytes)	S10	4	inclut la couche superficielle du sédiment
Vases : sédiments fins (< 0,1 mm) avec débris organiques fins	S11	3	couche superficielle du sédiment (<3cm)
Sables et limons (< 2mm)	S25	2	couche superficielle du sédiment (<3cm)
Algues	S18	1	inclut les éléments minéraux du support
Surfaces uniformes dures naturelles et artificielles (roches, dalles, marnes et argiles compactes)	S15	0	raclage de surface

2.1.5 – Technique de tri et d'identification

Les prélèvements obtenus sont ensuite traités au laboratoire (cf. AFNOR 2010), les taxons déterminés au niveau taxonomique requis (Tableau 2-V) et dénombrés. L'ouvrage de base pour la détermination des macro-invertébrés est le guide « Invertébrés d'eau douce – Systématique, biologie, écologie » (Tachet *et al.* 2010).

Tableau 2-V. Niveau de détermination requis pour les différents grands groupes d'invertébrés benthiques d'après le protocole multi-habitats normalisé (d'après AFNOR 2010)

Taxons		Niveau taxonomique requis
Plecoptera		Genre
Trichoptera	sauf Limnephilidae	Genre
	Limnephilidae	Sous-Famille
Ephemeroptera		Genre
Heteroptera	sauf Corixinae, Gerridae, Hydrometridae, Mesoveliidae et Pleidae	Famille
	Corixinae	Sous-Famille
	Gerridae, Hydrometridae, Mesoveliidae et Pleidae	Genre
Coleoptera	sauf Dytiscidae, Hydrophilidae, Curculionidae	Genre
	Dytiscidae, Hydrophilidae	Sous-Famille
	Curculionidae	Famille
Diptera		Famille
Odonata	sauf Coenagrionidae	Genre
	Coenagrionidae	Famille
Megaloptera		Genre
Planipennia		Genre
Hymenoptera		Genre
Lepidoptera		Famille
Crustacea Malacostraca	sauf Asellidae	Genre
	Asellidae	Famille
Crustacea Branchiopoda		Ordre
Crustacea (autres)		Branchioura, Cladocères, Copepoda, Ostracoda
Hydracarina		Ordre
Bivalvia		Genre
Gastropoda	sauf Planorbidae	Genre
	Planorbidae	Famille
Branchiobdellida		Genre
Hirudinea		Famille
Oligochaeta		Classe
Polychaeta		Genre
Turbellaria		Famille
Nemertea		Genre
Nemathelmintha		Phylum
Hydrozoa		Classe
Porifera		Famille
Bryozoa		Phylum

2.1.6 – Conclusion

Le RSR était prévu pour fonctionner entre 2005 et 2007, chaque site devant être échantillonné deux fois par an (fin du printemps et fin de l'été). Ce plan d'échantillonnage a été en grande partie réalisé, puisque chaque site a été effectivement échantillonné en moyenne 5,21 fois (+/- 1,04) dans la base de données utilisée alors qu'il était prévu qu'il le soit 6 fois. Étaient donc disponibles, pour les 391 sites au niveau national (références validées et non-validées), 2000 opérations de contrôle faunistique au cours desquelles ont été répertoriés 298 taxons.

Au cours du suivi RCS mis en place depuis 2007, chaque site devait être échantillonné une fois par an sur une période de 6 années consécutives, en période de basses eaux. En décembre 2011, 4231 opérations de contrôle faunistiques étaient disponibles, au cours desquelles 306 taxons ont été répertoriés.

Tous réseaux confondus, nous disposons donc, à ce jour de 6231 opérations de contrôle réparties sur 6 années de suivi (Tableau 2-VI). Au cours de ces opérations de contrôle, 317 taxons ont été répertoriés.

Tableau 2-VI. Synthèse du nombre d'opérations de contrôle répertoriées dans la base de donnée nationale par réseau (RSR et RCS) et par année

	2005	2006	2007	2008	2009	2010
<i>RSR</i>	656	736	587	21		
<i>RCS</i>			787	1103	1328	1011

2.2 – Sites d'étude dans les Vosges

2.2.1 – Situation géographique

Les Vosges sont un massif montagneux de faible altitude (moyenne: 500 m, point culminant: Grand Ballon 1423 m) situé au nord-est de la France (Fig. 2-4). Les Vosges forment une entité hydro-écorégionale (HER de premier niveau n°4, cf. Fig. 2-4), qui, compte tenu du socle géologique, peut être subdivisée en deux entités homogènes plus petites: les Vosges granitiques (HER de second niveau n° 63) et les Vosges gréseuses (HER de second niveau n°74, Wasson *et al.* 2002). Les sites sélectionnés sont tous situés dans l'HER 2 « Vosges gréseuses » et appartiennent tous au même type de cours d'eau « TP4 » (MEDD 2005).

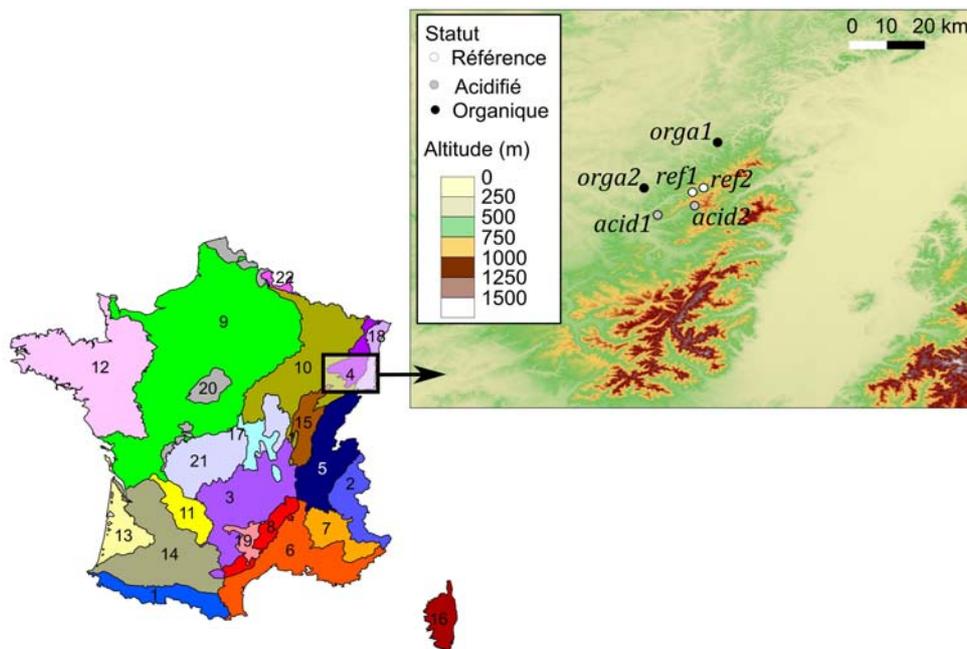


Figure 2-4. Localisation du Massif Vosgien (HER n°4) et des six sites d'études sélectionnés

2.2.2 – Caractérisation des stations

Les sites d'étude ont été sélectionnés afin de décrire au mieux un gradient de pression pour deux types de perturbation anthropique : l'acidification et la contamination organique. De plus, ces sites devaient présenter la plus grande homogénéité possible du point de vue de leurs caractéristiques environnementales.

2.2.2.1 – Description générale

Les six sites sélectionnés peuvent être regroupés en trois couples (Fig. 2-4 & 2-5) : (i) deux stations de référence situées sur les ruisseaux de la Maix (*ref1*) et de la Plaine (*ref2*), (ii) deux stations acidifiées situées sur les ruisseaux de Ravines (*acid1*) et de Gentil Sapin (*acid2*) et (iii) deux stations soumises à une contamination organique situées sur les ruisseaux de la Bièvre (*orga1*) et de la Blette (*orga2*).

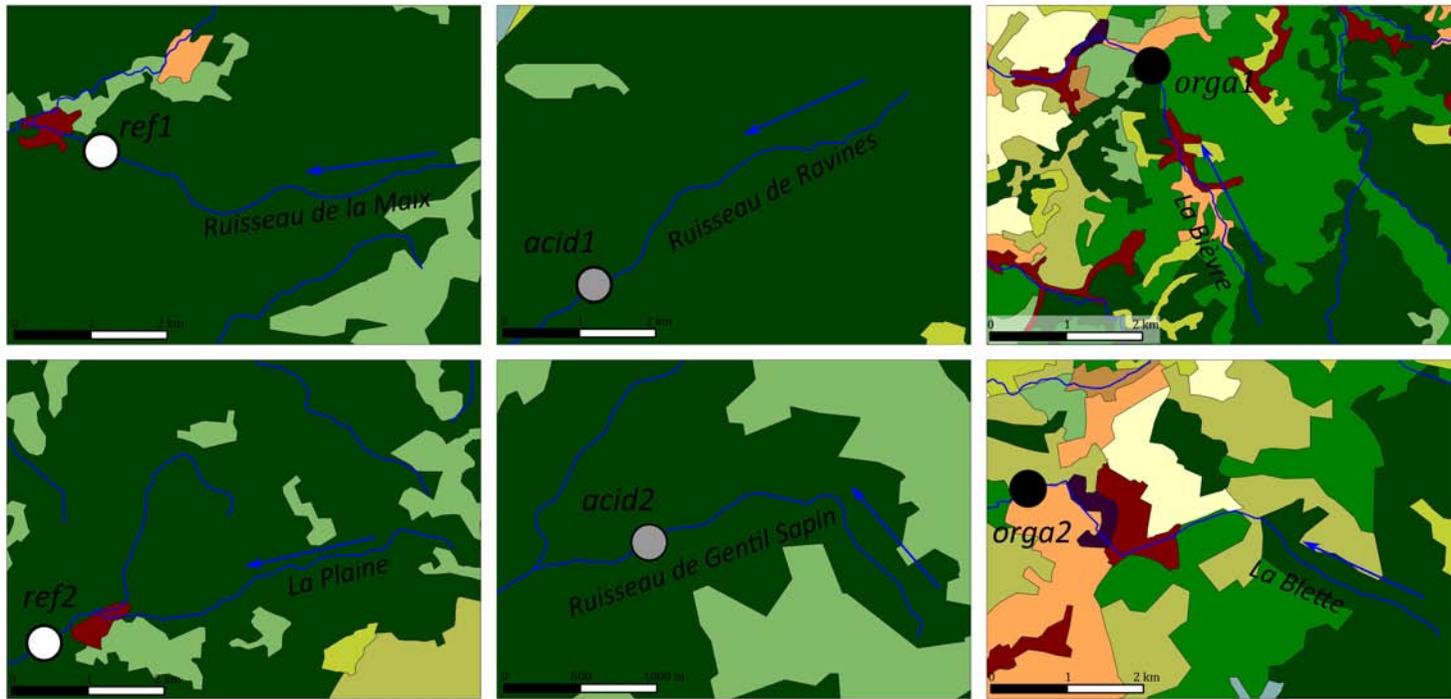
Ces six stations sont situées en tête de bassin (distance à la source inférieure à 7 km, Fig. 2-5). Les cours d'eau étudiés prennent leur source dans les forêts de conifères du massif Vosgien et (i) soit s'y écoulent presque totalement jusqu'au site d'étude (Maix, Plaine, Ravines et Gentil Sapin, Fig. 2-5), soit, au sortir de la forêt de conifères, s'écoulent dans des milieux plus anthropisés (cultures et tissu urbain discontinu) avant de parvenir au site d'étude (Blette et Bièvre, Fig. 2-5). Il convient de noter que la Plaine longe un village (Raon-sur-Plaine) avant de parvenir au site *ref2*.

Au niveau des sites d'étude, les cours d'eau étudiés sont situés à une faible altitude (entre 310 et 520 m) et leur lit est relativement peu large (entre 2,50 m et 6,60 m, Figures 2-6 à 2-11 et Tableau 2-VII).

Tableau 2-VII. Description générale des 6 stations sélectionnées. Les données de largeur correspondent aux valeurs moyennes de « largeur mouillée » mesurée sur chaque site d'étude

Site	Commune	Département	Latitude N	Longitude E
<i>ref1</i>	Vexaincourt	88	48°29'27"	7°03'13"
<i>ref2</i>	Raon-sur-Plaine	54	48°24'47"	6°55'20"
<i>acid1</i>	Saint Prayel	88	48°26'56"	7°03'33"
<i>acid2</i>	Moussesey	88	48°30'36"	7°05'13"
<i>orga1</i>	Walsheid	57	48°40'13"	7°08'34"
<i>orga2</i>	Badonviller	54	48°30'20"	6°52'50"

Site	Cours d'eau	Distance à la source (m)	Altitude (m)	Largeur (m)
<i>ref1</i>	Maix	5232	400	3,35
<i>ref2</i>	Plaine	6618	375	6,30
<i>acid1</i>	Ravines	4017	425	6,60
<i>acid2</i>	Gentil Sapin	2888	520	2,60
<i>orga1</i>	Bièvre	6150	310	2,75
<i>orga2</i>	Blette	6023	310	2,50



Légende

Occupation des sols (CLC 2006)

- | | |
|--|---|
| ■ 1.1.2 Tissu urbain discontinu | ■ 3.1.1 Forêts de feuillus |
| ■ 1.2.1 Zones industrielles et commerciales | ■ 3.1.2 Forêts de conifères |
| ■ 2.1.1 Terres arables hors périmètres d'irrigation | ■ 3.1.3 Forêts mélangées |
| ■ 2.3.1 Prairies | ■ 3.2.4 Forêt et végétation
arbustive en mutation |
| ■ 2.4.2 Systèmes cultureux et parcellaires complexes | ■ 5.1.2 Plans d'eau |
| ■ 2.4.3 Surfaces essentiellement agricoles, interrompues
par des espaces naturels importants | |

Statut des stations

- Référence
- Acidification
- Contamination organique

Figure 2-5. Occupation des sols sur les bassins versants des cours d'eau au niveau des six sites d'études (données Corine Land Cover 2006). Les flèches bleues indiquent le sens d'écoulement des eaux.



Figure 2-6. Site ref1
(Photographie P. Wagner)



Figure 2-7. Site ref2
(Photographie P. Wagner)



Figure 2-8. Site acid1
(Photographie P. Wagner)



Figure 2-9. Site acid2
(Photographie P. Wagner)



Figure 2-10. Site orga1
(Photographie P. Wagner)



Figure 2-11. Site orga2
(Photographie P. Wagner)

2.2.2.2 – Caractérisation physico-chimique

Les sites ont été échantillonnés 13 fois entre mars 2009 et avril 2010, à raison d'une fois toutes les quatre semaines, à l'exclusion de la période décembre 2009 - janvier 2010. Lors de chaque campagne (sauf en août 2009) et pour chaque site d'étude, 4L d'eau ont été prélevés : 2L destinés aux analyses chimiques sont conservés dans un flacon en polyéthylène et 2L destinés aux dosages de chlorophylle a et de phéopigments sont conservés dans un flacon opaque en nalgène. De retour au laboratoire, les échantillons d'eau ont été entreposés en chambre froide (5°C) jusqu'à réalisation des analyses les jours suivants. Le pH, la conductivité et la demande biologique en oxygène sur 5 jours (BDO₅) ont été mesurés par électrochimie; les matières en suspension (MES) et les matières volatiles en suspensions (MVS) ont été mesurées par filtration puis pesée avant et après calcination à 550°C (NF T 80-105); les anions chlorures (Cl⁻), sulfates (SO₄²⁻), nitrates (NO₃⁻) et nitrites (NO₂⁻) ont été mesurés par chromatographie ionique (NF T90-042). La spectrophotométrie en UV-visible (ou spectrophotométrie d'absorption moléculaire) a été utilisée pour doser la chlorophylle a (chlo. a ; Lorenzen 1967), les phéopigments (phéo ; Lorenzen 1967), les orthophosphates (PO₄⁻; NF T 90-023), le phosphore total (P_{tot}; NF T 90-023), l'ammonium (NH₄; NF T 90-015) et l'azote Kjeldahl (NKj; NF T 90-015). Des analyses titrimétriques ont été utilisées pour mesurer la demande chimique en oxygène (DCO ; NF T 90-101) et le titre alcalimétrique complet (TAC ; NF T 90-036). La spectrophotométrie d'absorption atomique en flamme (Perkin-Elmer Analyst 100) a été utilisée pour mesurer les cations calcium (Ca²⁺; NF T 90-005), magnésium (Mg²⁺; NF T 90-005), sodium (Na⁺; NF T 90-019) et potassium (K⁺; NF T 90-019). Les concentrations en oxygène dissous (O₂) ainsi que les niveaux de saturation en oxygène ont été mesurés sur le terrain avec un oxymètre (Multi 350i avec sonde galvanique à membrane, WTW). Les valeurs moyennes de ces paramètres mesurés sur les six sites d'étude au cours des 13 campagnes réalisées sont renseignées dans le Tableau 2-VIII.

Tableau 2-VIII. Caractérisation physico-chimique des 6 stations sélectionnées. Les valeurs correspondent aux moyennes (+/- écart-type) sur l'ensemble des campagnes d'échantillonnage

	NH₄ (mg N/L)	NO₂⁻ (mg N/L)	NO₃⁻ (mg N/L)	N Kj (mg N/L)	PO₄⁻ (mg P/L)	P_{tot} (mg P/L)
ref1	<0,01	<0,01	0,70 (+/- 0,03)	0,24 (+/- 0,14)	0,02 (+/- 0,00)	0,05 (+/- 0,01)
ref2	<0,01	0,01 (+/- 0,01)	0,81 (+/- 0,14)	0,33 (+/- 0,19)	0,02 (+/- 0,01)	0,06 (+/- 0,01)
acid1	<0,01	<0,01	0,48 (+/- 0,05)	0,51 (+/- 0,36)	0,01 (+/- 0,00)	0,05 (+/- 0,06)
acid2	0,02 (+/- 0,02)	<0,01	0,81 (+/- 0,15)	0,23 (+/- 0,22)	<0,01	0,03 (+/- 0,02)
orga1	0,35 (+/- 0,19)	0,06 (+/- 0,03)	1,61 (+/- 0,40)	0,83 (+/- 0,31)	0,13 (+/- 0,04)	0,27 (+/- 0,10)
orga2	1,02 (+/- 0,35)	0,18 (+/- 0,26)	1,21 (+/- 0,34)	1,26 (+/- 0,52)	0,19 (+/- 0,06)	0,35 (+/- 0,07)

	Chlo a (µg/L)	Phéo (µg/L)	DBO₅ (mg O/L)	DCO (mg O/L)	O₂ (mg O/L)	Saturation en O₂ %
ref1	0,52 (+/- 0,29)	0,80 (+/- 0,54)	0,70 (+/- 0,24)	9,21 (+/- 4,42)	10,63 (+/- 0,68)	99,64 (+/- 1,67)
ref2	0,74 (+/- 0,39)	0,84 (+/- 0,58)	1,20 (+/- 0,35)	10,21 (+/- 3,31)	10,46 (+/- 1,04)	99,60 (+/- 2,01)
acid1	0,87 (+/- 1,37)	1,12 (+/- 2,25)	1,00 (+/- 0,59)	12,17 (+/- 9,88)	11,19 (+/- 0,84)	100,70 (+/- 2,76)
acid2	0,33 (+/- 0,36)	0,49 (+/- 0,82)	0,80 (+/- 0,38)	8,79 (+/- 2,64)	10,77 (+/- 1,23)	98,02 (+/- 2,81)
orga1	3,75 (+/- 1,98)	3,03 (+/- 1,53)	4,50 (+/- 2,14)	18,15 (+/- 6,01)	9,21 (+/- 1,43)	88,34 (+/- 12,59)
orga2	2,73 (+/- 3,43)	2,61 (+/- 1,24)	5,41 (+/- 1,76)	19,92 (+/- 4,86)	6,99 (+/- 1,90)	64,41 (+/- 12,37)

	MES (mg/L)	MVS (%)	SO₄²⁻ (mg/L)	Cl⁻ (mg/L)	Ca²⁺ (mg/L)	Mg²⁺ (mg/L)
ref1	3,48 (+/- 1,97)	48,56 (+/- 19,07)	5,24 (+/- 0,53)	1,57 (+/- 0,09)	7,89 (+/- 0,86)	3,99 (+/- 0,45)
ref2	3,74 (+/- 2,52)	42,21 (+/- 15,78)	5,61 (+/- 0,25)	6,66 (+/- 1,16)	7,98 (+/- 1,47)	3,80 (+/- 0,70)
acid1	6,25 (+/- 16,42)	32,28 (+/- 17,2)	6,79 (+/- 0,90)	1,76 (+/- 0,09)	2,23 (+/- 0,16)	0,94 (+/- 0,08)
acid2	1,15 (+/- 2,25)	42,83 (+/- 32,04)	4,29 (+/- 0,23)	1,27 (+/- 0,12)	1,50 (+/- 0,16)	0,52 (+/- 0,06)
orga1	20,85 (+/- 45,99)	38,22 (+/- 18,01)	12,78 (+/- 1,52)	11,84 (+/- 6,94)	12,07 (+/- 2,72)	3,73 (+/- 0,82)
orga2	18,61 (+/- 24,29)	27,40 (+/- 9,47)	12,83 (+/- 2,88)	13,53 (+/- 3,21)	12,77 (+/- 1,76)	2,72 (+/- 0,29)

	Na⁺ (mg/L)	K⁺ (mg/L)	TAC (meq/L)	pH	Conductivité (µS/cm²)
ref1	1,12 (+/- 0,07)	1,52 (+/- 0,17)	0,66 (+/- 0,10)	7,53 (+/- 0,17)	88,59 (+/- 8,39)
ref2	3,89 (+/- 0,62)	1,38 (+/- 0,20)	0,57 (+/- 0,15)	7,45 (+/- 0,19)	102,13 (+/- 10,36)
acid1	1,37 (+/- 0,07)	1,46 (+/- 0,23)	0,06 (+/- 0,02)	6,13 (+/- 0,44)	36,85 (+/- 1,99)
acid2	1,00 (+/- 0,09)	0,98 (+/- 0,14)	0,01 (+/- 0,01)	4,79 (+/- 0,16)	28,92 (+/- 1,75)
orga1	7,38 (+/- 4,60)	2,89 (+/- 0,55)	0,64 (+/- 0,17)	7,30 (+/- 0,21)	152,79 (+/- 35,61)
orga2	8,42 (+/- 2,10)	3,35 (+/- 0,37)	0,68 (+/- 0,10)	7,19 (+/- 0,24)	160,71 (+/- 21,99)

Une analyse en composantes principales (ACP) réalisée sur le tableau des 23 paramètres pour les 72 échantillons d'eau (12 campagnes x 6 sites) permet de valider le choix des sites d'étude et de retrouver les deux gradients de pression : « acidification » et « contamination organique » (Fig. 2-12). 67,94% de la variabilité dans les caractéristiques physico-chimiques observées dans le tableau de données initiales est explicable par l'effet « site » (analyse inter-groupes suivie d'un test de Monte-Carlo avec 1000 permutations, $p = 0,001$). Parmi ces 67,94%, 60,91 % sont expliqués par les différences de caractéristiques physico-chimiques entre sites de « référence » vs. sites « acides » ou sites « organiques » ($p = 0,001$).

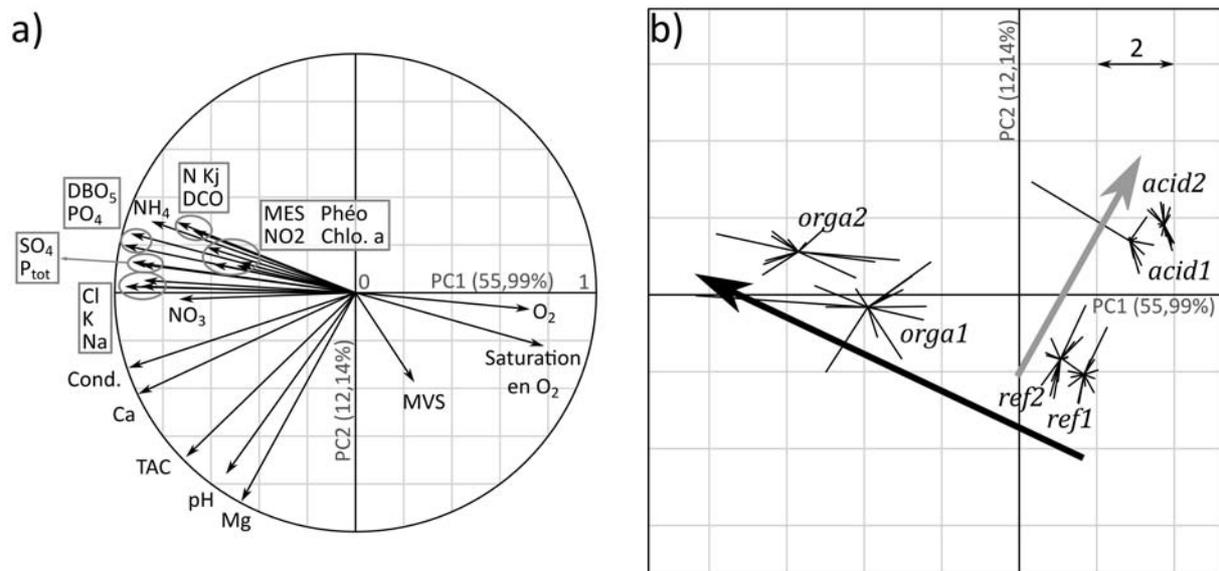


Figure 2-12. Premier plan factoriel de l'analyse en composantes principales réalisée sur la matrice physico-chimique (72 échantillons x 23 paramètres). a) Cercle des corrélations ; b) Position des échantillons et des sites d'études, la flèche grise indique le gradient d'acidification et la flèche noire indique le gradient de contamination organique. Les pourcentages de variance expliquée sont donnés sur chaque composante principale (PC1 et PC2)

Des enregistreurs de température en continu (HOBO® Pendant Temperature logger, Onset) ont été placés dans la colonne d'eau sur chacun des six sites d'études du 14 mai 2009 au 11 avril 2010, une mesure de température étant réalisée toutes les quatre heures (Fig. 2-13).

Toutefois, pour deux sites, les enregistreurs posés en mai 2009 n'ont pas été retrouvés en fin de période de mesure, de grosses crues ayant remanié profondément le lit du cours d'eau. Des données de température manquent sur les périodes du 10 juin au 28 octobre 2009 pour le site *orga1* et du 24 novembre 2009 au 26 février 2010 pour le site *ref2*.

Afin de combler les lacunes résultant de la perte des enregistreurs de température sur ces deux sites d'étude, des modèles non linéaires (Generalized Additive Models ou GAM, Wood 2011) ont été construits pour prédire la température de l'eau des sites *ref2* et *orga1* pour les dates manquantes.

Pour cela, la température de l'eau sur chacun des sites pour lequel le suivi était incomplet a été modélisée en utilisant comme variable prédictive la température de l'eau sur chacun des cinq autres sites d'étude :

$$T_{ref2} = s_0 + s(T_{ref1}) + s(T_{acid1}) + s(T_{acid2}) + s(T_{orga1}) + s(T_{orga2}) + \varepsilon$$
$$T_{orga2} = s_0 + s(T_{ref1}) + s(T_{ref2}) + s(T_{acid1}) + s(T_{acid2}) + s(T_{orga1}) + \varepsilon$$

avec T_{site} la température de l'eau dans le site correspondant, s_0 une constante, $s()$ la fonction de lissage, ici une spline de régression avec 3 degrés de liberté et ε l'erreur résiduelle.

Les modèles construits permettent d'expliquer de manière significative une part très importante de la variance initiale : 90,2% pour le modèle *ref2* et 96,3% pour le modèle *orga1*. Les prédictions des modèles pour les périodes correspondant au manque de données ont donc été considérées comme fiables et utilisées pour compléter les chroniques (Fig. 2-13).

Les six sites d'étude présentent les mêmes tendances tout au long du suivi, les mois les plus froids sont les mois de janvier et février et les mois les plus chauds sont ceux de juillet et août (Fig. 2-13). Malgré des profils similaires, les sites ne présentent pas exactement les mêmes régimes thermiques, en effet les sites *ref1* et *acid1* sont ceux qui présentent l'amplitude thermique annuelle la plus faible avec des températures relativement douce en hiver (plus de 5°C en moyenne) et fraîche en été (moins de 13°C en moyenne, cf. Tableau 2-IX). Le site *acid2* est celui dont les températures sont descendues le plus bas en hiver (0,67°C), alors que les deux sites soumis à une contamination organique sont ceux pour lesquels les températures estivales sont les plus importantes (supérieures à 16°C en moyenne avec des maxima proches des 20°C, Tableau 2-IX).

Ces fortes températures estivales, dont le faible ombrage du lit par la ripisylve peut être partiellement la cause, peuvent encore aggraver les problèmes de pénurie en oxygène sur ces sites du fait d'une plus faible solubilité de l'oxygène dans l'eau.

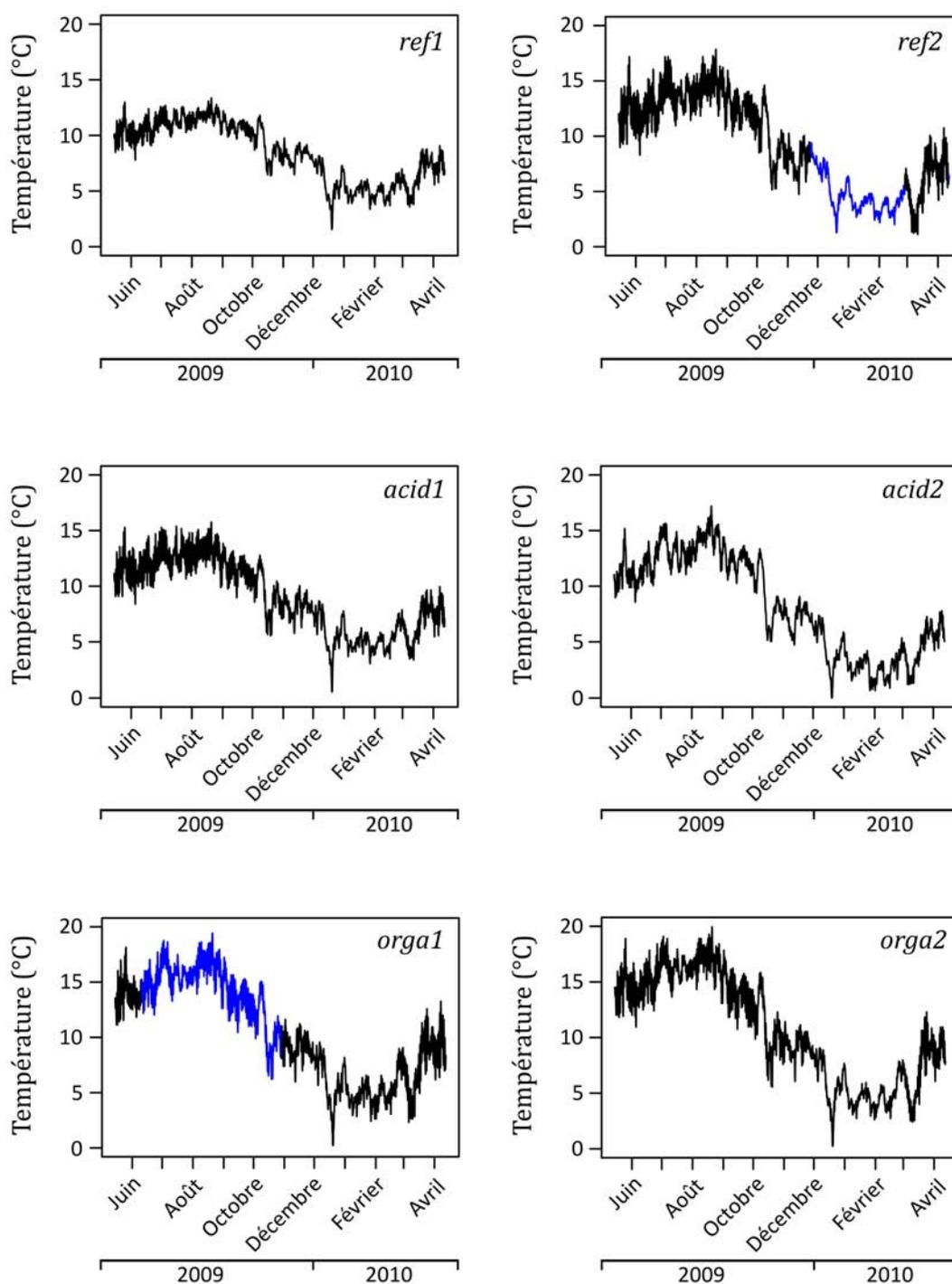


Figure 2-13. Chroniques de la température de l'eau entre mai 2009 et avril 2010 sur les six sites d'études. La température est mesurée toute les quatre heures avec une sonde autonome (HOBO® Pendant Temperature logger, Onset). Les portions bleues des courbes correspondent aux valeurs de températures modélisées par des régressions GAM (voir le texte pour plus de détails) pour les sites et les périodes où les données étaient manquantes du fait de la perte des sondes autonomes.

Tableau 2-IX. Caractérisation thermique des six sites d'études pendant (i) les deux mois les plus froids (janvier et février) et (ii) les deux mois les plus chauds (juillet et août). μ : moyenne, sd : écart-type

Site	Mois les plus froids		Mois les plus chauds	
	μ (+/- sd)	mini	μ (+/- sd)	maxi
ref1	5,03 (+/- 0,67)	3,37	11,56 (+/- 0,62)	13,37
ref2	3,89 (+/- 0,85)	2,01	14,19 (+/- 1,31)	17,86
acid1	5,10 (+/- 0,87)	3,05	12,94 (+/- 1,07)	15,76
acid2	2,71 (+/- 0,96)	0,67	13,75 (+/- 1,25)	17,19
orga1	5,02 (+/- 1,24)	2,41	16,15 (+/- 1,18)	19,42
orga2	4,71 (+/- 1,15)	2,62	16,63 (+/- 1,14)	19,95

2.2.3 – Expériences *in situ*

Quatre types d'étude ont été menées sur les six sites d'étude à des dates différentes : (i) une étude des assemblages faunistiques (échelle « communautaire ») pour laquelle des campagnes d'échantillonnage ont été réalisées toutes les quatre semaines entre mars 2009 et avril 2010 sauf en décembre 2009 et janvier 2010 (chapitre V), (ii) une étude isotopique et (iii) une étude stœchiométrique pour lesquelles un échantillonnage complémentaire spécifique s'est déroulé en mars 2011 (chapitres VI et VII), (iii) une étude « protéomique » (échelle « populationnelle ») pour laquelle des organismes appartenant à certaines espèces-cibles ont été encagés *in situ* entre janvier et février 2010 (chapitre VIII). La chronologie des études réalisées pendant les différentes campagnes de terrain est donnée dans le Tableau 2-X. Les détails méthodologiques relatifs à chaque étude seront donnés dans les chapitres correspondants.

Tableau 2-X. Chronologie des différentes études réalisées sur les six sites d'études vosgiens

<i>Campagne</i>	<i>Date</i>	<i>Échelle biologique de l'étude réalisée</i>
#1	16-18/03/2009	Communautés
#2	14-16/04/2009	Communautés
#3	12-14/05/2009	Communautés
#4	08-10/06/2006	Communautés
#5	06-08/07/2009	Communautés
#6	04-06/08/2009	Communautés
#7	31/08-02/09/2009	Communautés
#8	28-30/09/2009	Communautés
#9	26-28/10/2009	Communautés
#10	23-25/11/2009	Communautés
#11	18/01/2010	Population(s) : Protéomique
#12	15-17/02/2010	Communautés Population(s) : Protéomique
#13	15-16/03/2010	Communautés
#14	12-13/04/2010	Communautés
#16	22-24/03/2011	Population(s) : Isotopie et stœchiométrie

2.2.4 – Conclusion

Les six sites d'études présentent de fortes similarités environnementales : ils appartiennent au même type de cours d'eau, prennent leur source et ont une grande partie de leur linéaire dans les forêts de résineux du massif vosgien. Les cours d'eau Bièvre et Blette traversent tout deux des zones relativement anthropisées : cultures, pâturages, communes de plus de 1500 habitants (la Bièvre : Walsheid et la Blette : Badonviller) avant de parvenir aux sites d'études *orga1* et *orga2*, respectivement. Les sites présentent quelques légères différences d'altitude, de distance à la source, de largeur de cours d'eau et de régime thermique, mais ces différences sont toutefois minimales au regard des différences de qualité de l'eau.

En effet, comme démontré par l'ACP réalisée sur les paramètres physico-chimiques, les trois groupes de sites (i.e. *ref*, *acid* et *orga*) permettent d'expliquer significativement la majorité de la variabilité physico-chimique observée. Toujours d'après les résultats de l'ACP, la proximité des sites au sein de chaque groupe semble indiquer que si l'effet présence d'une « pression » est très

net, l'effet « gradient de pression » semble lui plus limité, bien que présent puisque les sites d'étude sont bien individualisés (principalement suivant PC1 pour les sites décrivant un gradient de contamination organique et plutôt suivant PC2 pour les sites décrivant un gradient d'acidification; Figure 2-12).

2.3 – Traits bio-écologiques

Les traits bio-écologiques sont des variables décrivant les potentialités biologiques des taxons (= traits biologiques : Resh *et al.* 1994 ; Statzner & Bêche 2010) ou les préférences des taxons pour certaines caractéristiques de leur environnement (= traits écologiques : Usseglio-Polatera *et al.* 2000a ; Vieira *et al.* 2006). Dans un premier temps, une description de la technique utilisée pour coder les traits bio-écologiques des taxons est donnée. Dans un second temps, les traits biologiques et écologiques utilisés dans ce travail de thèse sont détaillés.

2.3.1 – La technique du codage flou

Certaines bases de données se concentrent sur des traits pouvant être mesurés de manière continue (e.g. Kattge *et al.* 2011), d'autres utilisent des catégories nominales et un codage binaire, les taxons ont (1) ou n'ont pas (0) le trait considéré (e.g. Poff *et al.* 2006). Toutefois, ces méthode de codage de l'information limitent fortement le nombre et la nature des traits pouvant être incorporés dans ces bases de données (Chevenet *et al.* 1994). En effet une mesure continue ne permet pas de traduire la variabilité pouvant exister au sein d'un taxon, par exemple la taille des derniers stades larvaires des différentes cohortes ou générations d'une espèce d'insecte amphibiotique émergeant sur plusieurs périodes distinctes de l'année peut varier de manière très significative (e.g. *Hydropsyche siltalai*). De même pour certains traits décrits par des catégories nominales, comme les sources de nourriture utilisées, la description du profil de trait d'une espèce par un système disjonctif complet aboutit à la sélection d'une unique source de nourriture pour ce taxon, et conduit donc à une large imprécision quant à la description du régime alimentaire des espèces les plus omnivores (e.g. le crustacé amphipode *Gammarus sp.*, cf. Fig. 2-14).

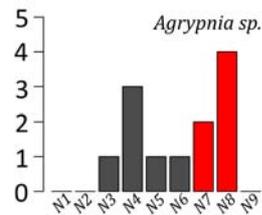
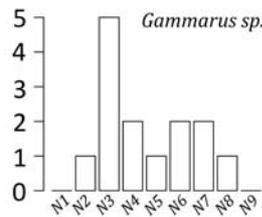
En plus de la variabilité provenant de la plasticité des taxons, une autre source de variabilité peut encore compliquer l'usage des méthodes de codage disjonctives évoquées précédemment. En effet, une particularité des connaissances écologiques vient de la très grande diversité d'origine et de format des informations à leur origine (e.g. expériences, avis d'expert, données publiées dans des revues et ouvrages scientifiques divers ; Statzner, Resh & Roux 1994b).

De plus, la définition des macro-invertébrés benthiques est relativement floue et se base non pas sur l'appartenance phylogénétique des taxons mais plus sur leur taille (au moins 3 à 5 mm au dernier stade larvaire) et l'habitat qu'ils utilisent (couche superficielle du fond des cours d'eau) (Tachet *et al.* 2010). Ainsi, se retrouvent dans les macro-invertébrés benthiques des taxons provenant de phylums aussi différents que les Porifères, les Annélides, les Mollusques ou les Arthropodes. Dans ces conditions, il devient très délicat, en se basant sur des méthodes de codage disjonctives, de définir des traits (et donc de décrire des catégories de traits) qui soient pertinents pour l'ensemble des macro-invertébrés benthiques.

L'intégration (i) de la plasticité phénotypique et environnementale des taxons, (ii) de la très grande variabilité phylogénétique et (iii) des sources d'incertitude liées à l'origine et au format des informations est donc un critère important dans la mise en place d'une base de données sur les traits bio-écologiques des macro-invertébrés benthiques.

C'est dans ce contexte que l'utilisation de la technique dite du « codage flou » ou « fuzzy coding » s'est démocratisée pour les macro-invertébrés benthiques mais aussi pour d'autres groupes taxonomiques (des micro-organismes aux oiseaux en passant par les plantes) dans le cadre d'une étude s'intéressant au test de la théorie de l'« Habitat temple » (Southwood 1977 ; Townsend & Hildrew 1994) en se basant sur des données à long terme acquises sur le Haut-Rhône français (Statzner *et al.* 1994a).

Le codage flou ayant servi à la construction de la base de traits utilisée dans ce travail de thèse est une évolution du codage binaire. Pour chaque taxon, une note d'affinité est attribuée à chacune des modalités d'un trait donné (cf. Fig. 2-14).



- N1: microorganismes
- N2: débris (< 1 mm)
- N3: débris végétaux (> 1 mm)
- N4: microphytes
- N5: macrophytes
- N6: débris animaux (> 1 mm)
- N7: microinvertébrés
- N8: macro-invertébrés
- N9: vertébrés

- premiers stades
- derniers stades

Figure 2-14. Notes d'affinité relatives à l'utilisation potentielle de différentes sources de nourriture par (i) un Crustacé au régime alimentaire généraliste (*Gammarus sp.*) et (ii) un Trichoptère faisant l'objet d'un changement ontogénique de régime alimentaire (*Agrypnia sp.*)

Cette note d'affinité peut être déclinée en quatre (0-3) ou six (0-5) niveaux et donne une estimation de la fréquence réelle d'utilisation de la modalité par le taxon. Chaque niveau d'affinité peut se voir attribuer un sens verbal, par exemple pour un codage à quatre niveaux d'affinité : 0 = « jamais », 1 = « parfois », 2 = « souvent » et 3 = « généralement ». Le choix du nombre de niveaux d'affinité utilisés pour coder un trait dépend du nombre de catégories définies au sein du trait décrit et de la complexité biologique sous-jacente. Par exemple, le trait 'Durée du cycle de vie' est décrit par trois modalités (< 1 an, 1 an, > 1 an) dont les combinaisons sont plutôt limitées. En conséquence un codage à quatre niveaux d'affinité [0-3] est suffisant pour ce trait.

Au contraire, un trait comme les sources potentielles de 'Nourriture' est décrit par neuf modalités [microorganismes, débris (< 1 mm), débris végétaux (> 1 mm), microphytes, macrophytes, débris animaux (> 1 mm), micro-invertébrés, macro-invertébrés et vertébrés] dont les combinaisons peuvent être complexes (Fig. 2-14), par exemple du fait d'un régime alimentaire très généraliste (e.g. le Crustacé amphipode *Gammarus sp.*) ou d'un changement de régime alimentaire au cours du développement (e.g. le Trichoptère *Agrypnia sp.*). Dans cette situation, un codage à 6 niveaux d'affinité est mieux adapté, dans la mesure où il permet de décrire de manière plus précise les différences d'affinité relative du taxon pour les 9 modalités complémentaires décrivant le trait.

2.3.2 – Les traits bio-écologiques

Dans ce travail de thèse, nous avons considéré une base de trait dérivée de celle présentée par Tachet *et al.* (2010) dans le livre « Invertébrés d'eau douce : Systématique, biologie, écologie ». Cette base est constituée de onze traits biologiques (Tableau 2-X) et de onze traits écologiques (Tableau 2-XI) brièvement décrits d'après Tachet *et al.* (2010).

2.3.2.1 – Traits biologiques (Tableau 2-XI)

2.3.2.1.1 – Taille maximale potentielle

La taille maximale potentielle correspond à la taille la plus grande atteinte par les organismes au cours de leurs phases aquatiques.

2.3.2.1.2 – Durée du cycle de vie

Le cycle vital des invertébrés est, du fait de l'extrême diversité de ce groupe, très variable et donc la définition de limites de classes pertinentes pour les modalités de ce trait se révèle un travail compliqué, d'autant plus que l'information disponible est souvent très vague (Tachet *et al.* 2010). Ce trait est donc décrit par deux modalités seulement, distinguant les organismes se développant au maximum en un an de ceux ayant un temps de génération plus long.

2.3.2.1.3 – Nombre de générations par an (= voltinisme)

Ce trait, complémentaire du précédent, est décrit par trois modalités qui distinguent les taxons monovoltins (une génération annuelle) des taxons plurivoltins (au moins deux générations annuelles) et semivoltins (moins d'une génération annuelle)

2.3.2.1.4 – Stades aquatiques

Ce trait permet de savoir quelles étapes de leur développement les invertébrés passent dans le milieu aquatique. Ce trait permet par exemple de discriminer les taxons holobiotiques, passant tout leur cycle vital dans l'eau (e.g. les Crustacés ou les Mollusques), des taxons amphibiotiques, passant une partie de leur cycle vital seulement dans le milieu liquide (e.g. certains Insectes).

2.3.2.1.5 – Techniques de reproduction

Les différents modes de reproduction asexuée sont regroupés en une seule modalité du fait du manque d'information pour de nombreux taxons (Tachet *et al.* 2010). Concernant la reproduction sexuée, les modalités choisies décrivent plus particulièrement les modalités de ponte décrivant un éventail de situations allant des œufs isolés libres aux pontes « protégées » endophytiques ou terrestres.

2.3.2.1.6 – Modes de dispersion

Les modalités choisies pour ce trait informent sur le milieu de dispersion (aérien ou aquatique) et sur la capacité des organismes à diriger leur dispersion (dispersion active ou passive).

2.3.2.1.7 – Formes de résistance

Certains macro-invertébrés ont développé au cours de leur évolution des stratégies de survie pour résister aux périodes défavorables (e.g. étiage estival ou prise en glace hivernale). Ces stratégies peuvent correspondre à des stades de développement particuliers (œufs, statoblastes, cocons), des structures construites (logettes) ou des « pauses » (i.e. une réduction stratégique des besoins physiologiques par l'instauration d'une phase de vie « ralentie ») dans le développement (diapause ou dormance).

2.3.2.1.8 – Techniques de respiration

Du fait de la très grande hétérogénéité phylogénétique présente au sein des macro-invertébrés, les caractéristiques physiologiques de ces organismes, en particulier les techniques de respiration utilisées, sont très variables. Les structures respiratoires trouvées chez les macro-invertébrés benthiques vont de l'absence de structures biologiques spécialisées (l'oxygène dissous dans l'eau diffuse directement à travers les téguments) à des structures biologiques spécialisées (i) dans l'absorption de l'oxygène dissous dans l'eau (branchies), (ii) dans la réalisation d'une réserve d'air avant plongée (plastron respiratoire) qui peut également avoir un rôle dans le déplacement au sein de la colonne d'eau (vésicules hydrostatiques) ou (iii) dans l'absorption d'oxygène gazeux (spiracles).

Tableau 2-XI. Traits biologiques (11) et modalités correspondantes (63). Le niveau de codage employé pour chaque trait est indiqué entre crochets.

Traits (FR)	Modalités (FR)	Traits (GB)	Categories (GB)
<i>Taille maximale (cm) [0-3]</i>	≤ 0,25 0,25-0,50 0,50-1 1-2 2-4 4-8 >8	<i>Maximal size (cm) [0-3]</i>	≤ 0,25 0,25-0,50 0,50-1 1-2 2-4 4-8 >8
<i>Durée du cycle de vie (année) [0-3]</i>	≤ 1 >1	<i>Life span (year) [0-3]</i>	≤ 1 >1
<i>Nombre de générations par an [0-3]</i>	< 1 1 > 1	<i>Number of reproductive cycles per year [0-3]</i>	< 1 1 > 1
<i>Stades aquatiques [0-3]</i>	œuf larve nymphe adulte	<i>Aquatic stages [0-3]</i>	egg larva Nymph/pupa adult
<i>Techniques de Reproduction [0-3]</i>	ovoviviparité œufs isolés, libres œufs isolés, fixés pontes, fixées pontes, libres pontes, dans la végétation pontes, terrestres reproduction asexuée	<i>Reproduction Technique [0-3]</i>	ovoviviparity isolated eggs, free isolated eggs, cemented clutches, cemented or fixed clutches, free clutches, in vegetation clutches, terrestrial asexual reproduction
<i>Dispersion [0-3]</i>	aquatique, passive aquatique, active aérienne, passive aérienne, active	<i>Dispersal [0-3]</i>	aquatic passive aquatic active aerial passive aerial active
<i>Formes de résistance [0-3]</i>	œufs, statoblastes cocons logettes contre la dessiccation diapause/dormance aucune	<i>Resistance forms [0-3]</i>	eggs, statoblasts cocoon housings against dessiccation diapause or dormancy none
<i>Respiration [0-3]</i>	tégument branchie plastron spiracle vésicule hydrostatique	<i>Respiration [0-3]</i>	tegument gill plastron spiracle hydrostatic vesicle
<i>Locomotion ou relation au substrat [0-5]</i>	vol nageur, surface nageur, pleine eau marcheur fouisseur, épibenthique interstitiel, endobenthique fixé, temporaire fixé, permanente	<i>Locomotion or substrate Relationship [0-5]</i>	flier surface swimmer full water swimmer crawler burrower interstitial temporarily attached permanently attached
<i>Nourriture [0-5]</i>	microorganismes détritiques (< 1 mm) débris végétaux (> 1 mm) microphytes macrophytes débris animaux (> 1 mm) micro-invertébrés macro-invertébrés vertébrés	<i>Food [0-5]</i>	microorganisms detritus (< 1mm) dead plant living microphytes living macrophytes dead animal living microinvertebrates living macroinvertebrates vertebrates
<i>Mode d'alimentation [0-3]</i>	absorbeur mangeur de sédiments fins broyeur racleur filtreur perceur prédateur parasite	<i>Feeding habits [0-3]</i>	absorber deposit feeder shredder scraper filter feeder piercer predator parasite

2.3.2.1.9 – Relation au substrat

Les macro-invertébrés benthiques présentent une très grande diversité de modes de locomotion. Ces modes de locomotion sont utilisés par les invertébrés soit sur la majorité de leur cycle vital soit au cours de phases spécifiques de leur développement. Ces modes de locomotion couvrent un large panel de stratégies allant de la fixation au substrat (temporaire ou permanente) au vol (pour les adultes de certains insectes amphibiotiques) en passant par l'enfouissement, la marche et la nage.

2.3.2.1.10 – Sources de nourriture

Les sources de nourriture disponibles pour les macro-invertébrés en milieu lotique peuvent être regroupées en plusieurs grandes catégories : les particules organiques de faible taille (microorganismes et fins débris organiques), les végétaux (morts ou vivants), les invertébrés (morts ou vivants) et les vertébrés (principalement du fait du parasitisme mais certains gros prédateurs, comme les larves d'Odonates, peuvent aussi se nourrir des œufs ou des larves de poissons et d'amphibiens).

2.3.2.1.11 – Mode d'alimentation

Le mode d'alimentation correspond à la manière dont les organismes se procurent et ingèrent leurs sources de nourriture. Cette ingestion peut se faire à l'aide de structures biologiques non spécifiques (absorbants), primitives (mangeurs de sédiments fins et broyeurs) ou spécialisées (racleurs, filtreurs, perceurs).

2.3.2.2 – Traits écologiques (Tableau 2-XII)

2.3.2.2.1 – Distribution transversale

Ce trait traduit la distribution des invertébrés non seulement en fonction d'une structuration transversale des cours d'eau (rives/chenal) mais également en fonction de la présence d'annexes plus ou moins étroitement connectées au chenal principal (e.g. bras secondaires, étangs, lacs, eaux temporaires ou souterraines).

2.3.2.2.2 – Distribution longitudinale

La distribution longitudinale des invertébrés est bien connue (voir par exemple Illies 1978). Ce trait décrit en sept modalités (Illies & Botosaneanu 1963) la distribution potentielle des taxons de la source à l'estuaire et ajoute une modalité décrivant les milieux non directement connectés au réseau hydrographique, i.e. certains plans d'eau.

2.3.2.2.3 – Altitude

La distribution altitudinale des taxons a été décrite par trois modalités correspondant aux étages de plaine/collinéen, montagnard et alpin.

2.3.2.2.4 – Zones biogéographiques

La distribution des invertébrés a large échelle spatiale a été décrite en considérant les régions biogéographiques définies dans la *Limnofauna Europaea* (Illies 1978). Cinq écorégions ont été retenues par subdivision de la zone biogéographique 13 en une zone « Océanique » (13a) et « Méditerranéenne » (13b).

2.3.2.2.5 – Substrats

Neuf types de substrats sur lesquels les invertébrés peuvent vivre ont été définis en fonction de leur caractère organique ou minéral et de leur granulométrie (pour les minéraux).

2.3.2.2.6 – Vitesse du courant

Quatre modalités de vitesse de courant ont été définies (nulle, lente, moyenne et rapide).

2.3.2.2.7 – Statut trophique

L'eutrophisation des cours d'eau est un processus pouvant provenir d'un apport excessif en nutriments azotés et/ou phosphorés (par exemple à partir des nitrates et des orthophosphates). Cet apport excessif peut, par exemple, se traduire par des proliférations algales limitant la pénétration de la lumière dans la colonne d'eau. De plus la décomposition de ces grandes quantités d'algues par des bactéries hétérotrophes peut rapidement provoquer une diminution de la quantité d'oxygène dissous disponible dans le milieu aquatique. Ce trait traduit donc le niveau de tolérance des organismes à un gradient d'eutrophisation, des milieux les plus pauvres en nutriments (oligotrophes) aux milieux les plus riches (eutrophes).

Tableau 2-XII. Traits écologiques (11) et modalités correspondantes (55). Le niveau de codage employé pour chaque trait est indiqué entre crochets.

Traits (FR)	Modalités (FR)	Traits (GB)	Categories (GB)
<i>Distribution Transversale [0-5]</i>	chenal rives, bras connectés étangs, bras déconnectés marais, tourbières eaux temporaires lacs eaux souterraines	<i>Transversal Distribution [0-5]</i>	river channel banks, connected side-arms ponds, pools, disconnected side-arms, marshes, peat-bog temporary waters lakes groundwaters
<i>Distribution Longitudinale [0-5]</i>	crénon épirithron métarithron hyporithron épipotamon métapotamon estuaire hors système fluvial	<i>Longitudinal Distribution [0-5]</i>	crenon epirithron metarithron hyporithron epipotamon metapotamon estuary outside river system
<i>Altitude [0-3]</i>	plaine + collinéen (< 1000 m) montagnard (1000 – 2000 m) alpin (> 2000 m)	<i>Altitude [0-3]</i>	lowlands piedmont level alpine level
<i>Zones Biogéographiques [0-3]</i>	2 : Pyrénées 4 : Alpes, Jura 8 : Massif Central, Vosges 13a : basses terres, océaniques 13b : basses terres, méditerranéennes	<i>Biogeographic Regions [0-3]</i>	2 : Pyrenees 4 : Alpes, Jura 8 : Massif Central, Vosges 13a : lowlands (oceanic) 13b : lowlands (mediterranean)
<i>Substrat [0-5]</i>	blocs, pierres, cailloux, galets gravier sable limon marcrophytes microphytes branches, racines débris organiques, litière vase	<i>Substrate [0-5]</i>	flags, boulders, cobbles, pebbles gravel sand silt macrophytes microphytes twigs, roots organic detritus, litter mud
<i>Vitesse du Courant [0-3]</i>	nulle (< 5 cm/s) lente (≤ 25 cm/s) moyenne (25-50 cm/s) rapide (> 50 cm/s)	<i>Current velocity [0-3]</i>	null (< 5 cm/s) slow (≤ 25 cm/s) medium (25-50 cm/s) fast (> 50 cm/s)
<i>Statut trophique [0-3]</i>	oligotrophe mésotrophe eutrophe	<i>Trophic status [0-3]</i>	oligotrophic mesotrophic eutrophic
<i>Salinité [0-3]</i>	eau douce eau saumâtre	<i>Salinity [0-3]</i>	freshwater brackish water
<i>Température [0-3]</i>	psychrophile (< 15°C) thermophile (> 15°C) eurytherme	<i>Temperature [0-3]</i>	psychrophilic (< 15°C) thermophilic (> 15°C) eurythermic
<i>Valeur saprobiale [0-3]</i>	xénosaprobe oligosaprobe β-mésosaprobe α-mésosaprobe polysaprobe	<i>Saprobity [0-3]</i>	xenosaprobic oligosaprobic β-mesosaprobic α-mesosaprobic polysaprobic
<i>Tolérance aux faibles pH [0-3]</i>	≤ 4 4-4.5 4.5-5 5-5.5 5.5-6 > 6	<i>Low pH Tolerance [0-3]</i>	≤ 4 4-4.5 4.5-5 5-5.5 5.5-6 > 6

2.3.2.2.8 – Salinité

Même si les milieux étudiés dans le cadre de ce travail de thèse sont des milieux d'eau douce, une certaine salinisation des cours d'eau peut advenir, qu'elle soit d'origine naturelle (pour des cours d'eaux s'écoulant sur des substrats géologiques riches en sels; e.g. la rivière Seille, affluent de la Moselle) ou anthropique. Ce trait permet donc de quantifier la tolérance des taxons au gradient de salinité à l'aide de deux modalités (eaux douces vs. eaux saumâtres).

2.3.2.2.9 – Température

Les organismes peuvent être capables soit de supporter de larges gammes de température (eurythermie), soit de ne supporter que des variations thermiques de faible amplitude (sténothermie). Les organismes de ce dernier groupe peuvent par ailleurs être adaptés aux eaux froides (psychrophilie), ou au contraire aux eaux plutôt chaudes (thermophilie). Les trois modalités de ce trait traduisent donc la tolérance des organismes aux niveaux et variations de température.

2.3.2.2.10 – Valeur saprobiale

La présence préférentielle des macro-invertébrés dans des milieux plus ou moins riches en matière organique, traduite par la valeur saprobiale, est depuis longtemps utilisée à des fins de bioindication (Kolkwitz & Marsson 1909). Ce trait est composé de cinq modalités correspondant à un gradient croissant de tolérance aux contaminations organiques (xénosaprobe < oligosaprobe < β -mésosaprobe < α -mésosaprobe < polysaprobe).

2.3.2.2.11 – Tolérance aux faibles valeurs de pH

Les cours d'eau ont généralement un pH autour de la neutralité, mais comme pour la salinité, le pH des cours d'eau, peut atteindre de très faibles valeurs : soit naturellement (roches mères cristallines à faible pouvoir tampon); soit sous l'action de l'homme (e.g. phénomène des pluies acides). Ce trait, au travers de ces six modalités, traduit donc la tolérance des macro-invertébrés à une gamme croissante de pH (de pH inférieur à 4 à pH supérieur à 6).

2.3.3 – Conclusion

Dans le livre « Invertébrés d'eau douce : Systématique, biologie, écologie » (Tachet *et al.* 2010), les profils d'affinité de 472 genres (ou familles) étaient fournis (472 taxons x 118 modalités).

Puisque les notes d'affinités sont une estimation de la fréquence d'utilisation par chaque taxon des modalités de chaque trait, ces profils de scores peuvent être transformés en distribution de fréquences relatives d'utilisation des différentes modalités de ce trait (Chevenet *et al.* 1994). Cette transformation correspond à une standardisation des scores par taxon et par trait (Bady *et al.* 2005) :

$$q_k = \frac{a_k}{\sum_{k=1}^h a_{jc}} \quad \text{avec} \quad q_k \geq 0 \quad \text{et} \quad \sum_{k=1}^h q_k = 1$$

où q_k est la fréquence d'utilisation de la modalité k ($1 \leq k \leq h$) et a_k la note d'affinité correspondante.

Le tableau fourni par Tachet *et al.* (2010) a servi de support à l'établissement de la base de traits utilisée dans ce travail de thèse (= base « RCS »). Cette dernière est composée par les fréquences d'utilisation des 118 modalités de 22 traits pour 325 taxons (correspondant aux niveaux taxonomiques présentés dans le Tableau 2-V et dans AFNOR 2010). Cette base de traits est fournie en *Annexe VI*.

Une fois les profils d'affinité transformés en fréquences relatives d'utilisation, le passage de la version « Tachet et al. (2010) » à une version « RCS » de la base de traits a été réalisé :

(i) pour les taxons présents dans les deux bases avec le même niveau de détermination taxonomique (82,15 % des taxons de la base « RCS », par exemple *Hydropsyche sp.*) : en reprenant directement les fréquences d'utilisation consignées dans l'ouvrage Tachet et al. (2010),

(ii) pour les taxons dont le niveau de détermination utilisé dans la base « RCS » est moins précis que celui utilisé dans la base « Tachet *et al.* (2010) », (11,69 % des taxons, par exemple les *Oligochaeta* et les *Dytiscinae*), par la transformation :

$$q_k^T = \frac{\sum_{t=1}^n q_k^t}{n}$$

avec q_k^T la fréquence d'utilisation de la modalité k par le taxon T (base « RCS ») et q_k^t la fréquence d'utilisation de la modalité k pour chacun des n taxons « t », de profils connus, ayant un niveau de détermination taxonomique plus précis dans la base « Tachet *et al.* (2010)» et appartenant au taxon T ($1 \leq t \leq n$),

(iii) pour les taxons absents de la base « Tachet *et al.* (2010) » : le codage des profils a du être réalisé *de novo* par P. Usseglio-Polatera (6,15 % des taxons, par exemple *Dikerogammarus sp.* ou *Hemimysis sp.*).

2.4 – Analyse des données : les arbres et forêts d'arbres de classification

2.4.1 – Principe

La modélisation de données acquises en conditions naturelles pose souvent le problème de l'adéquation de la distribution des données avec des distributions théoriques (e.g. loi normale, binomiale, de Poisson) permettant l'utilisation de modèles paramétriques (e.g. régression linéaire ou ANOVA). Au contraire, les modèles dits non-paramétriques ne nécessitent pas que les données appartiennent à un type de distribution particulier et peuvent donc être utilisés sur une plus large gamme de données.

Dans ce travail de thèse, les études réalisées ont amené à modéliser soit (i) l'appartenance d'« objets » à une catégorie particulière (modèle de classification) soit (ii) la valeur prise par une variable (modèle de régression). Une famille de méthodes statistiques, les arbres de décision,

permet de gérer ces deux types d'approches dans un même cadre conceptuel, en prédisant la valeur d'une variable dépendante Y (continue ou catégorielle) à partir d'une ou plusieurs variables prédictives X_i (elles mêmes continues ou catégorielles). Le principe de ces méthodes est commun pour la classification et la régression et est plutôt simple. Il est illustré par la Figure 2-15. Cette figure représente l'arbre de décision construit pour modéliser l'appartenance d'échantillons d'eau (cf. §2.2.2.2) à un site d'étude (Y) sur la base de ses caractéristiques physico-chimiques (X_i). Dans un premier temps, l'algorithme teste, pour chaque variable X_i , si la création d'une division en deux groupes plus petits (= groupes fils) à partir du groupe d'individus initial (= groupe père) sur la base de leurs valeurs de X_i permet d'augmenter l'homogénéité de répartition des individus, compte tenu de leur codage pour la variable Y , au sein de chaque groupe fils par rapport à cette même répartition au sein du groupe père. Parmi les différentes variables prédictives X_i , celle assurant la création de groupes fils ayant les valeurs de Y les plus homogènes est alors sélectionnée et une règle de décision (= nœud) est créée.

Cette procédure est répétée sur chacun des groupes fils jusqu'à ce que l'algorithme ne puisse plus créer de groupes fils plus homogènes que le groupe père formé au pas précédent. Dans notre exemple de la figure 2-15, le groupe père constitué des 75 échantillons d'eau est d'abord divisé en deux groupes sur la base de leur valeur de pH (inférieur ou supérieur à 5). Ce premier nœud permet d'isoler l'ensemble des échantillons provenant du site *acid2*, augmentant ainsi considérablement l'homogénéité de composition de ce groupe fils (vis à vis de la variable Y « appartenance à un site d'étude ») par rapport à la composition du groupe père (ensemble des échantillons des 6 sites confondus). Dans un deuxième temps, le reste des échantillons est séparé sur la base de leurs concentrations en phosphore total (inférieur ou supérieur à 0.28 mg/L) ce qui a permis d'isoler une majorité des prélèvements d'eau réalisés dans le site *orga2*. Une fois l'arbre terminé, on remarque que les différents sites d'études sont très bien discriminés par un petit nombre de paramètres physico-chimiques (pH, P_{tot} , PO_4 et DBO_5) et que les rares échantillons mal classés le sont dans un site appartenant au même statut initial que leur site d'origine (i.e. « référence », « acidification » ou « contamination organique »).

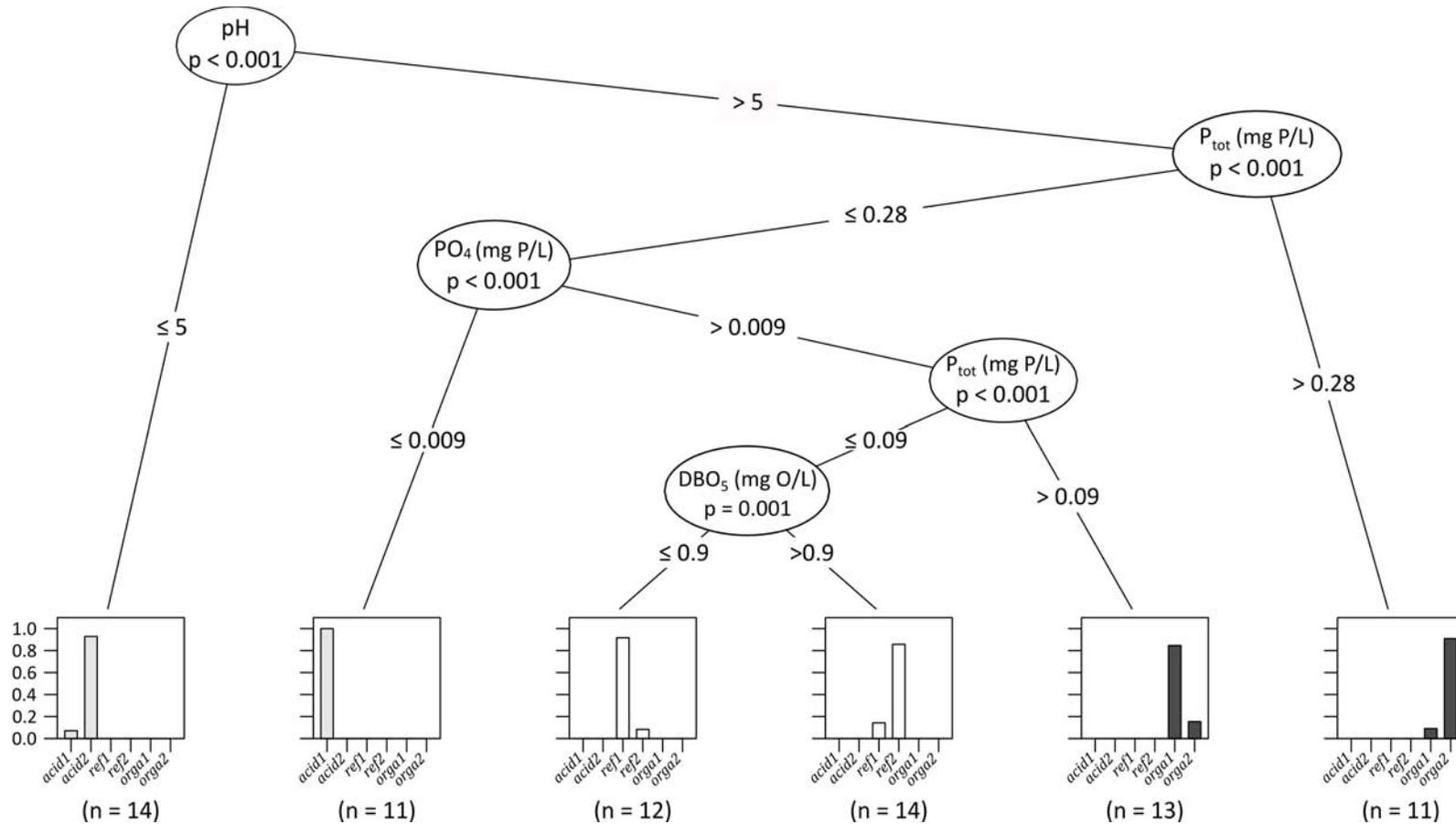


Figure 2-15. Modélisation de l'appartenance d'échantillons d'eau aux six sites d'étude (variable Y) à partir de leurs caractéristiques physico-chimiques (variables Xi) à l'aide d'un arbre d'inférence conditionnelle. Chaque nœud représente un critère de décision (une variable Xi) permettant de diviser un groupe « père » en deux groupes « fils ». La pertinence statistique (p-value) de ce critère de décision est indiquée dans le nœud et les valeurs de Xi permettant de classer les échantillons dans un groupe fils sont indiquées sur les branches. Les « nœuds » terminaux représentent la distribution des valeurs de la variable Y (sites de référence en blanc, sites acidifiés en gris clair et sites avec une contamination organique en gris foncé) dans les plus petits groupes fils qu'il a été possible de définir.

Ces méthodes d'arbre de décision permettent donc de modéliser la réponse d'une variable dépendante Y à partir d'une ou plusieurs variables explicatives X_i mais également de classer ces variables X_i en fonction de l'amplitude de leur effet sur la variable Y , il s'agit donc de méthodes hiérarchiques.

2.4.2 – Les arbres de classification et de régression (CART)

Les premiers arbres de décision largement utilisés ont été proposés par Breiman *et al.* (1984). Le critère utilisé pour mesurer « l'impureté » (i.e. l'homogénéité des groupes fils créés) est le coefficient de Gini :

$$i(t) = \sum_{i \neq j} p(i|t) \times p(j|t)$$

avec $i(t)$ le coefficient de Gini pour le nœud t , $p(i|t)$ et $p(j|t)$ la proportion d'individus appartenant à la classe i ou j , respectivement, sachant que l'on se trouve dans le nœud t .

L'algorithme cherche alors à maximiser cette mesure d'impureté afin de définir la meilleure valeur de décision dans chaque nœud de l'arbre (i.e. la valeur de l'une des variables X_i qui permet d'augmenter le plus l'homogénéité des groupes d'après leurs valeurs pour la variable Y).

Les arbres de décision de type CART sont des arbres dont la croissance est maximum, c'est à dire que l'arbre continue de grandir (i.e. de nouveaux nœuds sont ajoutés) jusqu'à ce que les nœuds terminaux soient « purs », c'est à dire que les valeurs de la variable Y au sein de chacun de ces nœuds terminaux soient complètement homogènes (i.e. dans le cas d'une variable Y catégorielle, chaque nœud terminal devra ne contenir des individus qui ne proviennent que d'une seule classe).

2.4.3 – Les arbres d'inférence conditionnelle

L'arbre de décision représenté dans la figure 2-15 est appelé arbre d'inférence conditionnelle (*conditional inference tree*, CIT Hothorn *et al.* 2006). Par rapport à d'autres méthodes d'arbres de décision (comme les CART), la méthode CIT propose un test statistique (sur le principe des tests de permutations) permettant (i) de sélectionner la variable X_i la plus pertinente à chaque nœud et (ii) de définir un critère d'arrêt de la croissance de l'arbre. Cette méthode peut être décomposée en trois étapes :

(1) l'hypothèse nulle d'indépendance entre la variable explicative et la variable dépendante est testée par un test de permutation,

(2) si l'hypothèse nulle d'indépendance est rejetée, le groupe d'échantillons est divisé en deux sous-groupes définis par leurs valeurs pour la variable explicative sélectionnée en (1),

(3) le processus est réitéré sur chacun des sous-groupes formés jusqu'à ce que l'hypothèse nulle d'indépendance ne puisse être rejetée.

L'utilisation des arbres conditionnels peut donc être assimilée à un test non paramétrique de comparaisons multiples permettant de définir quels groupes d'échantillons, décrits par une ou plusieurs variables explicatives, présentent des valeurs de variable dépendante significativement différentes.

2.4.4 – Les forêts d'arbres de classification

Les forêts d'arbres de classification et de régression (*random forest*, RF) sont constituées d'un grand nombre d'arbres (de type CART, Breiman 2001 ou de type CIT, Strobl *et al.* 2007). Chacun des arbres est alors construit sur un sous-ensemble aléatoire des données initiales (e.g. $n = 2/3 \times N^1$) et pour chaque nœud de chaque arbre seul un sous-ensemble aléatoire des variables explicatives est testé. Au niveau du modèle RF dans son ensemble, chaque arbre « individuel »

¹ N : effectif de l'ensemble initial de données ; n : effectif du sous-ensemble de données formé pour chacun des arbres constituant la forêt.

pour lequel un individu donné était « *out of the bag* » (OOB ; i.e. en dehors de la sélection d'individus ayant permis la construction de l'arbre), dispose donc d'un vote sur l'attribution d'une valeur de Y pour cet individu.

Pour chaque individu, la prédiction finale (i.e. au niveau de l'ensemble des arbres « individuels » du modèle RF complet) est réalisée à la majorité relative des votes (pour les modèles de classification) ou en faisant la moyenne des votes (pour les modèles de régression) des arbres individuels.

Le fait de construire chacun des arbres sur un sous-ensemble du jeu de données initial permet d'avoir, pour chaque arbre, un certain nombre d'individus « *out of the bag* » qui peuvent donc servir d'individus « tests » afin de mesurer la qualité des prédictions de chacun des arbres individuels en comparant les valeurs observées et prédites de Y pour cet ensemble d'individus. La qualité globale du modèle RF est estimée en faisant la moyenne des mesures de qualité des arbres individuels.

Dans un arbre de décision isolé (CIT ou CART), l'importance des variables explicatives est facile à estimer en fonction de leur position dans l'arbre, plus les variables interviennent tôt et fréquemment dans l'arbre, plus elles sont importantes. Dans l'exemple donné plus haut (Fig. 2-15), le pH et la concentration en phosphore total sont les deux paramètres physico-chimiques ayant la plus forte importance dans la caractérisation des six sites d'étude. Dans un modèle RF, l'évaluation de l'importance des variables explicatives n'est pas aussi simple. En effet l'utilisation d'un grand nombre d'arbres (plusieurs centaines ou milliers) rend extrêmement compliqué l'utilisation des critères précédents. On utilise alors l'augmentation du taux d'erreurs de prédiction (*increase in error rate*, IncErr) pour mesurer cette importance au niveau de chacun des arbres. Pour une variable explicative donnée, cette valeur d'IncErr correspond à l'augmentation du taux d'erreur de prédiction qui survient si on permute aléatoirement les valeurs de cette variable au sein de l'ensemble des individus tout en laissant inchangées les valeurs des autres variables explicatives. Plus la valeur d'IncErr est importante pour une variable explicative, plus cette dernière est importante dans le modèle RF, puisqu'à l'origine d'un fort taux d'erreurs de classification lorsqu'elle est redistribuée de manière aléatoire au sein des individus.

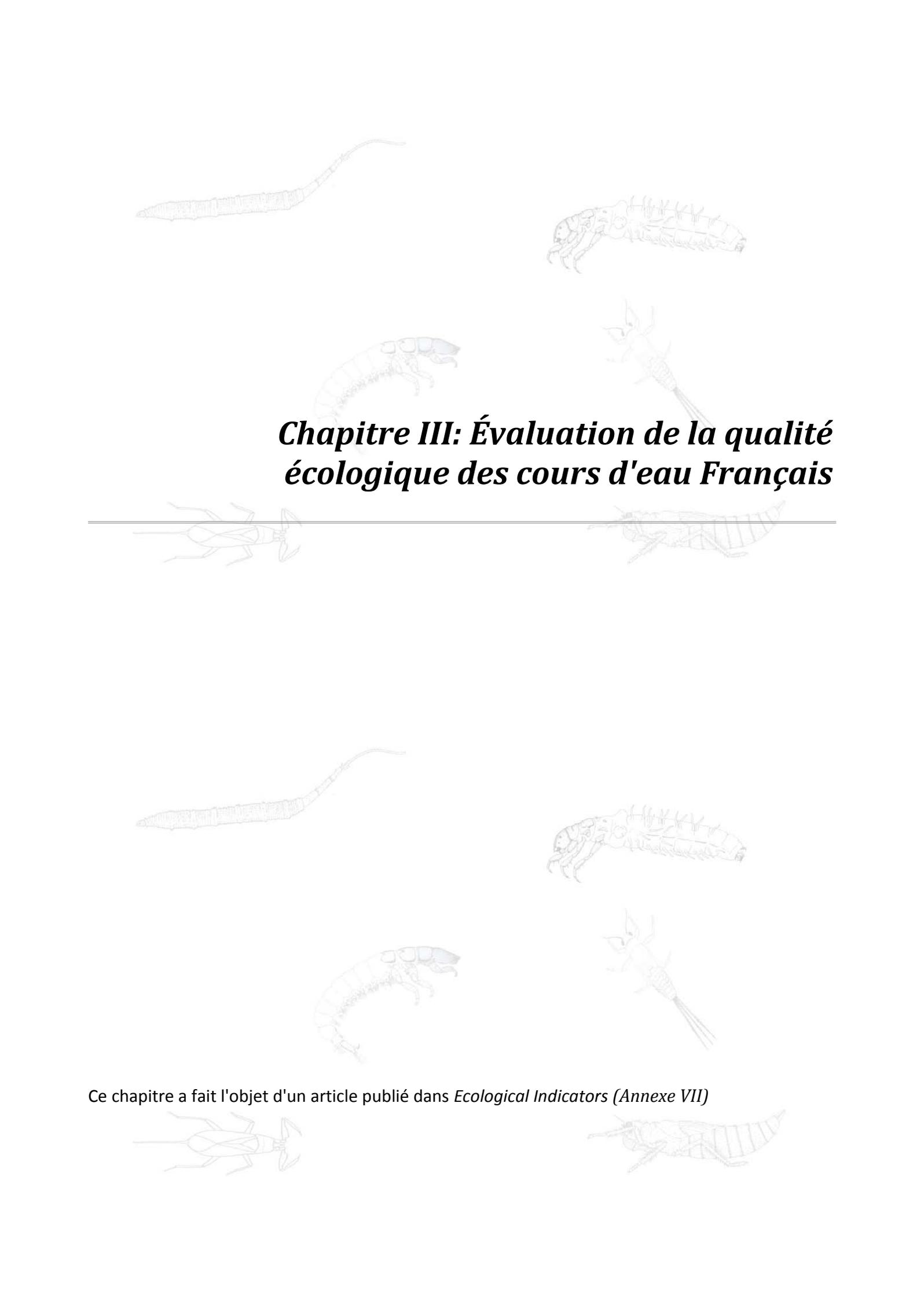
2.5 – Analyse des données : Logiciels utilisés

L'intégralité des analyses de données et des tests statistiques utilisés au cours de cette thèse ont été réalisés en utilisant le logiciel R (R Development Core Team 2009). Les différents types d'analyses de données ont été réalisés en utilisant les librairies ('*packages*') indiquées dans le tableau 2-XIII.

Tableau 2-XIII. Librairies du logiciel R utilisées pour réaliser les différents types d'analyse de données utilisés dans ce travail de thèse.

	Librairie
Tests de comparaisons multiples après tests non paramétriques (Kruskal-Wallis, Friedman)	<i>pgirmess</i>
Analyses multivariées	<i>ade4</i>
Modèles additifs généralisés (GAM)	<i>mgcv</i>
Forêt d'arbres de décision de type CART	<i>randomForest</i>
(Forêts d') Arbres d'inférence conditionnelle	<i>party</i>
Courbes ROC et calcul de l'AUC	<i>pROC</i>

Partie I : Les traits bio- écologiques potentiels



**Chapitre III: Évaluation de la qualité
écologique des cours d'eau Français**

Ce chapitre a fait l'objet d'un article publié dans *Ecological Indicators* (Annexe VII)

Résumé

Pour répondre aux exigences de la Directive Européenne Cadre sur l'Eau (DCE), nous avons développé un nouvel indice multimétrique (I_2M_2) pour l'évaluation écologique des cours d'eau français, en utilisant les assemblages de macroinvertébrés benthiques. Cet indice permet d'identifier les stations soumises à au moins un type de pression parmi les 17 relatifs à la qualité de l'eau ou la qualité physique de l'habitat que nous avons étudiés. En utilisant une base de données nationale, nous avons défini une procédure itérative pour sélectionner, parmi un grand nombre de métriques taxonomiques ou basées sur les traits bio-écologiques, la combinaison de métriques qui présente le meilleurs compromis entre : (i) la plus forte capacité de discrimination possible, (ii) une faible spécificité et (iii) une grande stabilité dans les conditions de moindre impact anthropique (LIRR). L' I_2M_2 ainsi formé est une combinaison de cinq métriques : (i) l'indice de diversité de Shannon, (ii) l'indice biotique britannique ASPT (Average Score per Taxon), l'utilisation relative, au sein des communautés benthiques (iii) du polyvoltinisme et (iv) de l'ovoviviparité et enfin (v) la richesse taxonomique. L' I_2M_2 a été testé avec un jeu de données indépendant du jeu de données d'apprentissage. Il a présenté de bonnes et robustes relations « pressions-impacts » pour l'ensemble des types de pression étudiés, identifiant correctement en moyenne 82 % des stations subissant des altérations significatives (i.e. au mieux « état moyen ») de la qualité de l'eau ou de l'intégrité physique de l'habitat. L' I_2M_2 améliore de manière significative la détection des situations perturbées par rapport à la méthode de bioévaluation normalisée française actuelle, l'IBGN. Cette amélioration est d'au moins 17 % pour la pression « Composés azotés » et va jusqu'à 35 % pour les « micropolluants organiques » et le « risque de colmatage ». L' I_2M_2 a été proposé pour une future utilisation dans la bio-évaluation des sites des réseaux nationaux dans un contexte de mise en place de la DCE.

3.1 – Introduction

The European Water Framework Directive (WFD; European Council 2000) put for the first time the ecological quality in the very heart of the environmental policies of European member states. It requires that countries evaluate the quality of their water bodies using Biological Quality Elements (BQE): i.e. fish, invertebrates, diatoms, plants and phytoplankton. Among BQEs, invertebrates have a long history as part of biomonitoring tools (Hellawell 1986; Rosenberg & Resh 1993; Bonada *et al.* 2006), being the most widely used biological group in freshwater bioassessment of human impact (Norris & Thorns 1999; Hering *et al.* 2006b).

The WFD requires that bioassessment methods implicitly evaluate the ecological status of water bodies, by comparing BQEs between an observed versus a reference situation. The reference situation should be representative of near natural conditions. Moreover, this comparison has to take into account the typology of water bodies and the metrics selected to evaluate the ecological status of water bodies, and has to regard abundance, diversity and pollution sensitivity of taxa (See annex 5 in European Council 2000).

In France, the IBGN method (Indice Biologique Global Normalisé) has been used at the national scale and normalized since 1992 (revised in 2004, norm NF T 90-350 in AFNOR 2004) but is no longer satisfying due to severe inconsistencies with WFD, e.g. the IBGN index is not type specific: the same scoring system and quality class boundaries are used for all types of rivers without considering “reference conditions”. Moreover the IBGN sub-metrics [i.e. the faunal indicator group (FIG) and taxonomic richness] did not take into account taxon abundances.

To overcome the technical shortcomings of the French biotic index in the WFD implementation framework, the development of a new biotic index, i.e. the MultiMetric Invertebrate Index (I_2M_2), was decided by the French Ministry of Environment (MEDDLT).

Multimetric indices were first included in biomonitoring approaches with fish communities (Karr & Dudley 1981). They have been increasingly used (e.g. Kerans & Karr 1994; Thorne & Williams 1997; Buffagni *et al.* 2004; Böhmer, Rawer-Jost & Zenker 2004a; Ofenböck *et al.* 2004;

Gabriels *et al.* 2010) and have become major tools in macroinvertebrate-based biomonitoring within the European WFD framework (e.g. Hering *et al.* 2004b; Lücke & Johnson 2009). Indeed a multimetric index has the potential to simultaneously and efficiently evaluate the responses of benthic communities to different categories of pressure because its individual metrics could consider different attributes of communities that specifically respond to different categories of pressure (Karr & Chu 1997). Several authors have searched for individual metrics that significantly respond to toxic contamination (Archambault *et al.* 2010) or hydromorphological alteration (Lorenz *et al.* 2004) and have included such metrics in biomonitoring tools. Nevertheless, few works have been done to combine in a single index, metrics able to detect a wide range of anthropogenic pressures at large spatial scale [but see, for example, Ofenböck *et al.* 2004; Buffagni *et al.* 2004 (organic contamination + hydromorphological alteration) or Böhmer *et al.* (2004a) (organic contamination + acidification + hydromorphological alteration)].

In this work, we aimed at identifying biological metrics (based on taxonomy or life history traits) that significantly respond to 17 pressure categories potentially leading to water quality or habitat degradation. We selected metrics exhibiting the best trade-off between (i) high mean discrimination efficiency, (ii) low specificity and (iii) high stability in reference conditions. We searched for combinations of those metrics that could be relevant for pressure-impact identification in French wadeable stream-types and selected the best metric combination to build the new multimetric index (I_2M_2). We tested the discrimination efficiency, stability and robustness of this new index on a test data set. In the future intercalibration exercises the new French multimetric index will be compared and intercalibrated to European standards, e.g. with the commonly used European intercalibration multimetric index ICM_{Star} (Buffagni *et al.* 2006). We already tested the correlation of the I_2M_2 with the ICM_{Star} . and compared its discrimination efficiency with those of the ICM_{Star} and the former French biotic index (IBGN).

3.2 – Data

3.2.1 - Data collection

Fieldwork was performed between 2004 and 2009 by 22 regional environmental agencies on a national network (cf. §2.1.3). Selected reaches were representative of 57 stream types of the French hydroecoregion-based typology (Wasson *et al.* 2002; MEDD 2005; Chandesris *et al.* 2006) gathering most of the French wadeable rivers (1305 streams, 1725 reaches and 4132 sampling events; cf. *Annex VIII*).

A 'development' data set was formed by randomly selecting 75% of the reaches (1293 reaches, 3112 samples) from the whole data set, while the remainder (i.e. 432 reaches; 1020 samples) was used as a 'test' data set.

Macroinvertebrate communities were sampled in all reaches with a common normalized protocol (cf. §2.1.4). Samples were processed following a standardized procedure (cf. §2.1.5).

3.2.2 - Reach characterization

Water quality, land use and hydromorphological characterization of reaches was performed following procedure described in §2.1.2.

To define the new WFD-compliant French biomonitoring tool we followed the recommendations of Barbour *et al.* (1999) for the development of multimetric assessment methods. Barbour decomposed this process in four main steps: 1) stream classification (cf. Wasson *et al.* 2002), 2) metric identification (cf. §3.3.1), 3) metric normalization (cf. §3.3.1) and 4) index development (cf. §3.3.2). In Figure 3-1, the main steps of the applied design were summarized from data collection to the final index and ecological class boundary definition.

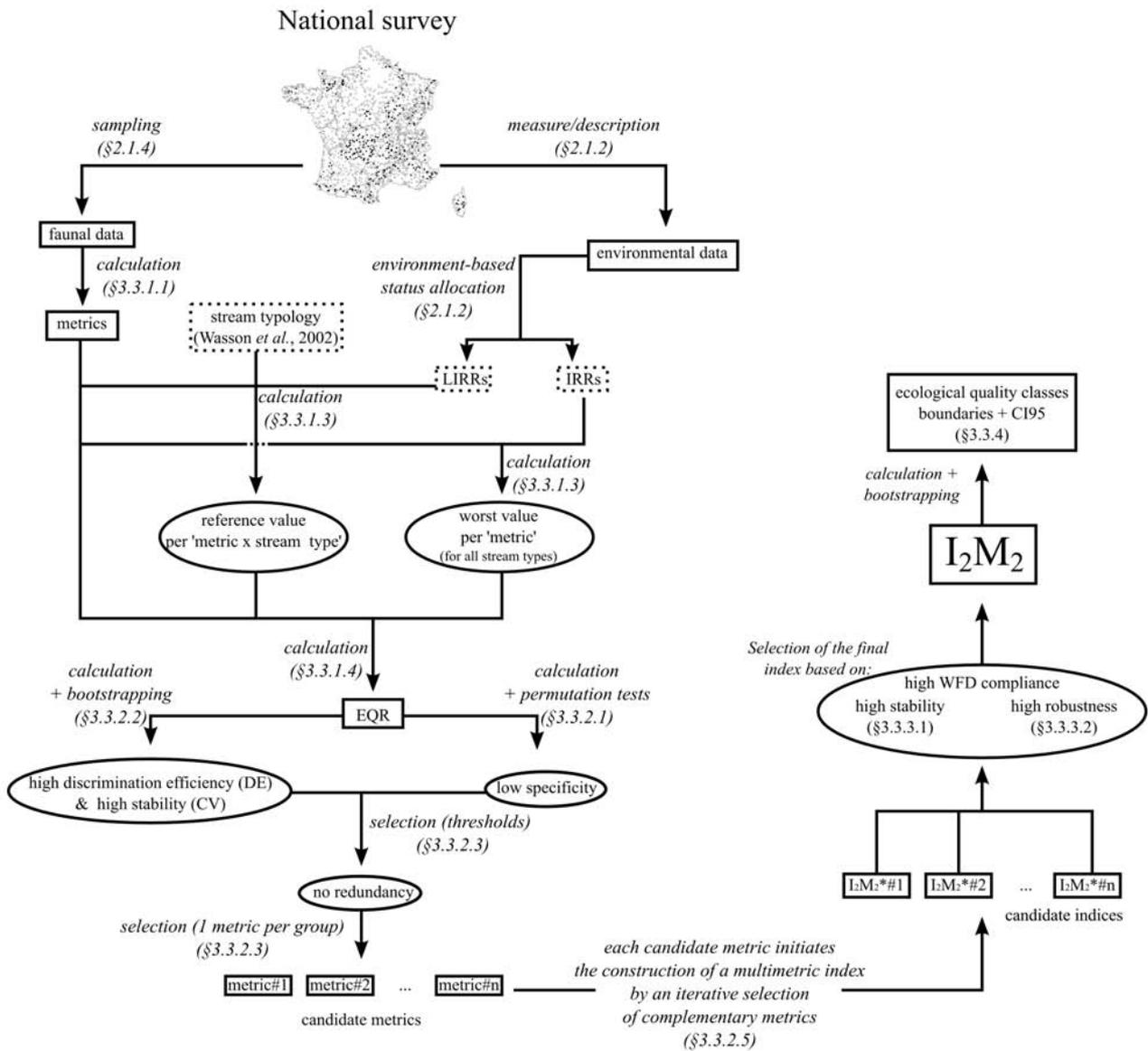


Figure 3-1. Flow diagram giving the main steps of the I_2M_2 development strategy. Literature references and sections from this manuscript precisely describing each step of the index development design were given into brackets.

3.3 – Data analysis

3.3.1 - Metric identification and normalization

3.3.1.1 – Metric set

418 biological metrics (see *Annex IX* for a detailed list) were calculated considering sample units from (i) all habitats (i.e. 'reach'), (ii) only 'marginal habitats' (i.e. 'B1'), (iii) only major habitats sampled according to hosting capacity (i.e. 'B2') or relative coverage (i.e. 'B3'), (iv) all major habitats (i.e. 'B2+B3') and (v) all habitats sampled according to hosting capacity (i.e. 'B1+B2'). Three supplementary metrics corresponding to the French biotic index (IBGN) and its two sub-indices were only calculated at the 'B1+B2' level (because best corresponding to the combination of habitats sampled when applying the IBGN sampling protocol). Fourteen metrics were also specifically calculated at the 'reach' level including the Flemish MMIF and its six sub-indices, three metrics measuring the taxonomic specificity of 'B1', 'B2' or 'B3' within the reach, one between-group (i.e. B1, B2, B3) beta diversity measure and three alien species-related metrics. Then, the 2525 'metric x calculation level' (= metrics hereafter) were allocated to 199 groups (cf. *Annex IX*), each group being composed of metrics bringing the same [but calculated at different levels, i.e. (i), (ii), (iii), (iv) or (v)] or very similar biological or ecological informations.

In contrast with Barbour *et al.* (1999), we normalized metrics before selecting the more convenient ones. Indeed, following the WFD requirements, new biomonitoring tools have to be expressed in Ecological Quality Ratio (EQR). This ratio is a number between zero and one, with values from 'reference' reaches close to one and values from reaches with 'bad' ecological status close to zero.

3.3.1.2 – 'Least impaired' and 'impaired' river reaches

To define 'reference' conditions, we selected least impaired river reaches (LIRRs, e.g. Statzner *et al.* 2005; Dolédec & Statzner 2008) using first, available data on water quality and habitat degradation, then validating reach status evaluation with a reduced set of biological

metrics (including IBGN, ASPT, Shannon diversity, relative richness in Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera taxa, relative utilization frequency of 'oligotrophic' and 'oligosaprobic' trait categories in reach communities). If not matching the criteria for integrating the LIRRs, river reaches were considered as impaired (IRRs).

3.3.1.3 – Reference and worst metric values

Depending on pressure category, a given metric could exhibit three major response patterns: (i) not simply and/or significantly responding to the pressure (type I), (ii) significantly decreasing in impaired conditions (i.e. pressure level being at least 'moderate'; type II) or (iii) significantly increasing in impaired conditions (type III).

We identified the response pattern of metrics (i.e. the sense of the deviation from values in LIRRs) by transforming metric values into normalized deviations (SES; cf. [1] and Gotelli & McCabe 2002). SES normalization allowed us to directly compare metric values obtained from different stream types, at large spatial scale.

$$SES = (Obs_{type} - M_{type}) / sd_{type} [1]$$

with: Obs_{type} the observed value of the metric in a given reach, M_{type} and sd_{type} being respectively the mean and the standard deviation of the metric value distribution in LIRRs from the same stream type.

Then, the discrimination efficiencies (DE; e.g. Ofenböck *et al.* 2004) of metrics were calculated. For a given metric and a given pressure category, DE_{SES} corresponds to the proportion of samples pre-assigned to IRRs with (i) smaller values than the first quartile of the LIRRs value distribution ($DE_{SES(25)}$, type II) or (ii) higher values than the third quartile of the LIRRs value distribution ($DE_{SES(75)}$, type III) (Fig. 3-2). Metrics for which neither $DE_{SES(25)}$ nor $DE_{SES(75)}$ were higher than 0.25 (i.e. the distribution of values from IRRs assemblages was not different from the distribution of values from LIRRs assemblages) corresponded to type I. Metrics for which $DE_{SES(25)}$ was higher than both 0.25 and $DE_{SES(75)}$ or for which $DE_{SES(75)}$ was higher than both 0.25 and $DE_{SES(25)}$ corresponded to type II and III, respectively.

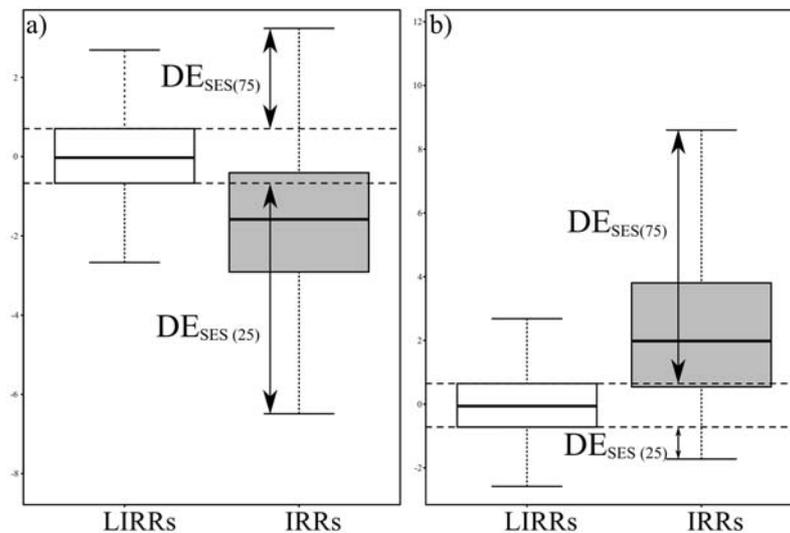


Figure 3-2. Discrimination efficiency of normalized metric (DE_{SES}) decreasing (a) or increasing (b) with increasing anthropogenic pressure. Boxplots represent SES value distribution of metrics in least impaired river reaches (LIRRs, white box) and impaired river reaches (IRRs, grey box). The boxes range from the 25th percentile to the 75th percentile. The thick line represents the median and the whiskers extend to extremes values. Black dashed lines represent the 25th and 75th percentiles of SES distributions in LIRRs

Last, we identified the 'best' and 'worst' values of each metric. The 'best' value corresponded to the highest (type I or II) or the lowest (type III) value this metric could take in the LIRRs from a given stream type. The 'worst' metric value corresponded to the lowest (type I or II) or the highest (type III) value a metric could take in the IRRs from the whole data set. The 5th and 95th percentile of the distribution of values for a given metric, were used as 'reference' or 'true worst' (= 'worst' hereafter) values instead of the highest/lowest values to discard metric values of outliers (Ofenböck *et al.* 2004).

3.3.1.4 – Metric normalization

Following Hering *et al.* (2006a), EQR were calculated using equation [2] for metrics of types I and II and equation [3] for metrics of type III.

$$\text{EQR} = (\text{Obs} - \text{Lower}) / (\text{Upper} - \text{Lower}) \quad [2]$$

$$\text{EQR} = 1 - (\text{Obs} - \text{Lower}) / (\text{Upper} - \text{Lower}) \quad [3]$$

with: 'Obs' the metric value for a given sample. In equation [2], 'Upper' and 'Lower' correspond to the 'reference' and 'worst' metric values, respectively; whereas in equation [3], 'Upper' and 'Lower' correspond to the 'worst' and 'reference' metric values, respectively.

As stipulated in the WFD, EQR values should be bounded between 0 and 1. If observed reaches exhibited metrics values out of the 'reference' - 'worst' interval for the same stream type, the EQR values were arbitrarily fixed as 1 (if higher quality than the reference value) and 0 (if lower quality than the worst value), respectively. This EQR normalization allowed interpreting metric values from a given reach, regarding their deviation from reference conditions associated to the corresponding stream type.

3.3.2 - Index development

Candidate metrics were selected taking into account four criteria: (i) low specificity, (ii) high discrimination efficiency (DE), (iii) high stability in LIRRs, and (iv) no redundancy. As the estimation of the three first criteria could depend on the development data set composition, we limited this bias using i) permutation tests for specificity and ii) bootstrap sub-sampling for robust estimation of DE and stability.

3.3.2.1 - Specificity

A metric was considered as 'specific' if it significantly responded to a low number of pressure categories. We searched for metrics with low specificity, i.e. metrics exhibiting significant difference in the distribution of values in LIRRs vs. IRRs for a high number of pressure categories. These differences were tested for each pressure category and each metric, with a conditional tree approach (cf. §2.4.2, Hothorn *et al.* 2006), i.e. a dichotomic classification method using Monte Carlo permutation tests ($\alpha=0.01$, 9999 permutations).

3.3.2.2 - Discrimination efficiency and stability in LIRRs

The DE of a metric for a given pressure category was calculated as the proportion of IRR assemblages with lower EQR values than the first quartile of the LIRR value distribution. The stability of a metric in LIRRs was evaluated using the coefficient of variation (CV) of its EQR value distribution from LIRR assemblages. The calculations of DE and CV were repeated 100 times based on randomly selected sub-samples of 60% of the reach data included in the development data set. A robust estimation of DE and CV for each metric was obtained by averaging the 100 estimations from corresponding sub-sampled data sets.

3.3.2.3 – Selection of candidate metrics

Selected metrics simultaneously exhibited (i) low specificity (significant responses for at least seven from ten 'water quality' and five from seven 'habitat degradation' pressure categories), (ii) high DE (mean robust DE ≥ 0.6) and (iii) high stability in LIRRs (mean robust CV $\leq 1/3$).

To avoid redundancy, for each of the groups of metrics giving the same biological or ecological information (cf. §3.3.1.1) only the metric with the highest DE was kept for potential inclusion in the multimetric index.

3.3.2.4 - I_2M_2 calculation rationale

For each pressure category, a sub-index was calculated by averaging the EQR of the selected metrics, each EQR being weighted by its DE for this pressure category, as illustrated in equation [4] for PAH contamination.

$$i_2m_2^{PAH} = \sum(DE_m^{PAH} \times EQR_m^{PAH}) / \sum DE_m^{PAH} \quad [4]$$

with: $i_2m_2^{PAH}$: the sub-index for PAH contamination, EQR_m^{PAH} : the EQR value of the metric 'm' for PAH contamination and DE_m^{PAH} : the robust discrimination efficiency of the metric 'm' for PAH contamination.

The final I_2M_2 score was obtained by averaging the seventeen sub-indices ($i_2m_2^{pressure}$).

3.3.2.5 - Construction of potential index metric combinations

Each of the 'n' candidate metrics (cf. §3.3.2.3) initiates the construction of a 'potential' multimetric index ($I_2M_2^*$) by an iterative selection of complementary metrics performed on the development data set. To reduce the potential bias of the development data set composition in metric selection, the iterative process includes bootstrap sub-sampling of the development data set.

1. One of the candidate metric was selected as the first metric,
2. a smaller data set was obtained by sub-sampling 60% of the reaches from the development data set,
3. in this sub-set, the $I_2M_2^*_{(i)}$ and $DE_{(i)}$ values for each pressure category were calculated with the pre-selected metric(s) at step i (i = 1, for the first iterative process of metric selection),
4. the $I_2M_2^*_{(i+1)}$ and $DE_{(i+1)}$ values were calculated (corresponding to each potential metric combination obtained by adding one of the (n-i) candidate metrics to the metric(s) pre-

selected at the beginning of the i^{th} iterative step),

5. the relative increase in DE (Δ) for each pressure category (p) when including an additional metric to the $I_2M_2^*$ was calculated (equation [5]).

$$\Delta = \Sigma[(DE^p_{(i+1)} - DE^p_{(i)})/DE^p_{(i)}] \quad [5]$$

with: $DE^p_{(i+1)}$ and $DE^p_{(i)}$ the discrimination efficiency of the $I_2M_2^*$ related to pressure category p calculated with the selected metrics after (i) and ($i-1$) iterative metric selections

6. the significance of the increase in DE (considering both water quality and habitat degradation) was statistically tested with unilateral paired Wilcoxon rank sum tests for each additional metric included in the index calculation.
7. the following procedure was applied to select a metric from the set of candidate metrics:
 - a) if only one candidate metric gave a significant increase in DE, this metric was selected,
 - b) if more than one candidate metric gave a significant increase in DE, the metric with the highest Δ [5] was selected,
8. steps 2 to 7 were repeated one hundred times on randomly selected sub-sets of the development data set and the candidate metric which was the more often selected was included in the $I_2M_2^*$ index,
9. additional metrics were successively included in the $I_2M_2^*$, following steps 2) to 8) as long as the increase in DE, calculated on the development data set, was statistically significant ($\alpha < 0.05$).
10. steps 1 to 9 were repeated using as first metric, each metric from the candidate metric pool.

3.3.3 – Final selection of the I_2M_2 metric composition

The n $I_2M_2^*$ metric combinations were compared considering their (i) mean DE (the highest is the best), (ii) stability (i.e. no significant differences of index scores in LIRRs between the development and the test data sets), (iii) robustness (i.e. no significant differences in DE between the development and the test data sets) and (iv) compliance with WFD requirements.

3.3.3.1 – Stability of $I_2M_2^$ values in least impaired conditions*

The Kolmogorov-Smirnov test was used to search for significant difference in the distributions of $I_2M_2^*$ values from LIRRs between the test and the development data sets.

3.3.3.2 – Robustness of $I_2M_2^$ discrimination efficiency*

The DEs respectively obtained with the development and the test data sets were compared with a bilateral paired Wilcoxon rank sum test.

3.3.4 - Ecological quality class boundaries

As recommended by the WFD, we defined ecological quality classes boundaries (i.e. delimiting 'high', 'good', 'moderate', 'poor' and 'bad' classes). Class boundary identification was based on the distribution of the I_2M_2 scores from the LIRRs of the development data set. To limit the influence of the development data set composition on the distribution of I_2M_2 values, a bootstrap sub-sampling approach was used. For each of the one hundred sub-sets (corresponding to 60% of the reaches from the development data set), the 75th and 25th percentiles of the I_2M_2 distribution in LIRRs were calculated. These values were considered as the 'high-good' and the 'good-moderate' boundaries, respectively. For defining the 'moderate-poor' and the 'poor-bad' boundaries, we divided the I_2M_2 scoring range between the minimal value (0) and the 'good-moderate' boundary in three equal classes. The robust estimate of each class boundary was calculated as the median of the one hundred estimates, and the corresponding 95% confidence interval was calculated (Fig. 3-3).

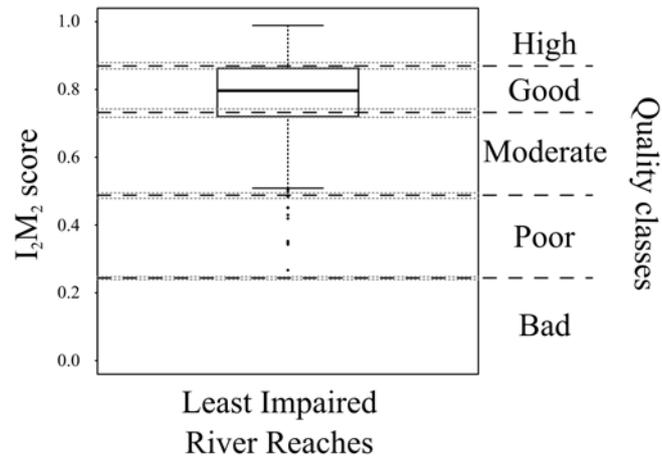


Figure 3-3. Ecological quality class boundaries (black dashed lines) and their respective 95% confidence interval (grey dotted lines). The boxplot represents the I_2M_2 score distribution in least impaired river reaches, ranging from the 25th to the 75th percentile of the distribution. The thick line represents the median. The whiskers extend to the extreme data points but no more than 1.5 times the interquartile range from this box. Black dots represent outliers.

3.3.5 - Comparison of the I_2M_2 with other indices

3.3.5.1 – Correlation with ICM_{Star}

The ICM_{Star} was calculated following equation [6]:

$$ICM_{Star} = 0.167 \times S_{fam} + 0.083 \times EPT_{fam} + 0.083 \times H'_{fam} + 0.334 \times ASPT + 0.067 \times (1-GOLD) + 0.266 \times \log_{10}(sel_EPTD+1) \quad [6]$$

with S_{fam} and EPT_{fam} being respectively the total number of families and the number of families within the EPT orders, H'_{fam} : the Shannon diversity index calculated at the family level, GOLD: the relative abundance of Gastropoda, Oligochaeta and Diptera and $\log_{10}(sel_EPTD+1)$: the log-transformed sum of Heptageniidae, Ephemeridae, Leptophlebiidae, Brachycentridae, Goeridae, Polycentropodidae, Limnephilidae, Odontoceridae, Dolichopodidae, Stratiomyidae,

Dixidae, Empididae, Athericidae and Nemouridae abundances. All these metrics were expressed in EQR (cf. §2.3.4) before their aggregation.

We tested if the I_2M_2 was correlated with the ICM_{Star} with a Pearson correlation test.

3.3.5.2 – Comparison of the I_2M_2 , ICM_{Star} and IBGN discrimination efficiency

Similarly to I_2M_2 , ICM_{Star} and IBGN DEs were calculated for each of the 17 investigated pressure categories as the proportion of IRRs providing scores lower than the first quartile of the score distribution in LIRRs. We tested the null hypothesis asserting there was no differences in DE between methods (i.e I_2M_2 , ICM_{Star} and IBGN) with a Friedman rank sum test for unreplicated blocked data. This test was followed by a multiple comparison test (Siegel & Castellan 1988) to localize the potential significant differences between the three methods.

3.4 – Results

3.4.1 - Index development

3.4.1.1 - Specificity of metrics

Among 2525 tested metrics, 475 metrics significantly responded at least to 7 of the 10 water quality pressure types and 5 of the 7 habitat degradation pressure types.

3.4.1.2 - Discrimination efficiency of metrics

The mean discrimination efficiency of individual metrics ranged from 0.0000 for the relative abundance/richness of several rare groups (taxa, trait categories or bio-ecological groups) to 0.7603 for the richness of the reach EPT taxa identified following the recommendations of Gabriels *et al.* (2010). Three hundred and ninety three metrics exhibited mean DE greater than 0.6.

3.4.1.3 - Stability of metrics in LIRRs

In LIRRs, the mean CV ranged from 0.099 (“Belgium Biotic Index” calculated from reach faunal assemblages) to 3.132 (relative abundance of Planipennia in marginal habitat assemblages). Eight hundred and seventy two metrics exhibited rather low variability (CV < 1/3).

3.4.1.4 - Candidate metrics

One hundred and eighty-six metrics fulfilled all the selection criteria. These metrics belonged to thirty groups gathering metrics giving similar bio-ecological information. As a result, the final set of candidate metrics (Table 3-I) was composed of thirty metrics, each selected metric exhibiting the highest mean DE of its group.

3.4.1.5 - Final selection of I_2M_2 metrics

The iterative metric selection process provided thirty indices composed of two to eight metrics. Their mean DE on the whole data set ranged between 0.8107 and 0.8442 (cf. Table 3-II). The stability of indices in LIRRs was estimated with the Kolmogorov-Smirnov p-value and ranged from 0.0006 to 0.2479. Robustness was evaluated with the Wilcoxon p-value, and ranged from 0.0348 to 1.000.

Five of the 30 metric combinations (i.e. combinations #1, #2, #9, #25 and #30 in Table 3-III) displayed no significant ($\alpha > 0.10$) stability or robustness differences between the development and the test data sets. Among these five metric combinations, only combination #2 fulfilled all the WFD requirements. As a result, the new multimetric index (I_2M_2) was finally composed of five metrics (Table 3-III): (i) Shannon diversity index, (ii) original ASPT score and (iii) the relative abundance of polyvoltine species in the assemblage, all of them calculated at the major habitat scale (i.e. B2+B3), (iv) the relative abundance of ovoviviparous species calculated at the B3 level and (v) a measure of taxonomic richness ('TAX') calculated at the reach level following taxonomic identification levels recommended by Gabriels *et al.* (2010).

Table 3-1. Metrics candidate to inclusion in the I₂M₂. The (i) full label, (ii) code, (iii & iv) numbers of pressure categories (water quality and habitat degradation) with significant response, (v) mean discrimination efficiency (DE) and (vi) mean coefficient of variation in least impaired river reaches (LIRRs) are given. S = taxonomic richness

Candidate metrics [calculation level]	Code	Nb of pressure categories with significant responses		Mean DE	Mean CV
		Water quality	Habitat degradation		
TAX (number of taxa*) [B1+B2+B3]	C1	8	7	0.6560	0.2861
Shannon Diversity index [B2+B3]	C2	9	7	0.6395	0.2741
Crustacea (%S) [B2+B3]	C3	7	6	0.6379	0.2335
EPT (number of taxa*) [B1+B2+B3]	C4	8	6	0.7603	0.2353
log10(sel_EPTD+1) [B1+B2+B3]	C5	8	6	0.6830	0.1992
revised BMWP [B1+B2]	C6	8	7	0.7303	0.2582
original ASPT [B2+B3]	C7	9	6	0.7479	0.1641
BBI [B1+B2+B3]	C8	7	6	0.6173	0.0995
IBGN [B1+B2]	C9	8	6	0.6440	0.1777
adult, aquatic stage (%) [B1+B2+B3]	C10	7	5	0.6458	0.2457
aerial, active dispersion (%) [B2]	C11	8	6	0.6882	0.1912
Crawler (%) [B1+B2+B3]	C12	8	6	0.6108	0.2495
microphytes as 'substrate' (%) [B1]	C13	7	6	0.6260	0.2528
ovoviviparity – trait 'reproduction technique' (%) [B3]	C14	7	5	0.6749	0.2160
polyvoltinism – trait 'number of cycles per year' (%) [B2+B3]	C15	7	6	0.7300	0.2261
oligotrophic – trait 'trophic status' (%) [B1+B2+B3]	C16	7	6	0.6368	0.2476
a-mesosaprobic – trait 'saprobity' (%) [B2]	C17	7	6	0.6742	0.2244
brackish water preferendum (%) [B1+B2]	C18	7	6	0.7018	0.2139
temporary water preferendum (%) [B2+B3]	C19	8	7	0.6326	0.2469
biological group b (%S) [B3]	C20	7	5	0.6557	0.2152
biological group f (%S) [B1+B2]	C21	7	6	0.6517	0.2619
ecological group B (%S) [B1]	C22	8	6	0.6204	0.2886
bio-ecological group γ2 (%S) [B1+B2+B3]	C23	7	6	0.6292	0.2008
SPEARmetallic [B1+B2+B3]	C24	7	7	0.6336	0.1324
SPEARpesticide I (number of taxa) [B1+B2]	C25	8	6	0.6967	0.2996
redundancy (dispersal) [B1+B2]	C26	7	7	0.6723	0.2420
specialization (maximal potential size) [B3]	C27	8	7	0.6273	0.2208
specialization (salinity preferendum) [B1+B2+B3]	C28	7	6	0.6917	0.1833
specialization (transversal distribution) [B1+B2]	C29	7	6	0.6779	0.2870
specialization (trophic status preferendum) [B1+B2]	C30	9	6	0.6345	0.3106

* metrics integrated in the Flemish MMIF (Gabriels *et al.* 2010)

%S : relative richness

Table 3-II. Metric composition, discrimination efficiency (DE), stability and robustness of the 30 tested metric combinations. See Table 3-I for full labels of metrics

Combination	Metric								mean DE	Stability	Robustness
	1	2	3	4	5	6	7	8			
#1	C1	C17	C8						0.8201	0.2057	0.7467
#2	C2	C7	C15	C14	C1				0.8243	0.1617	0.4874
#3	C3	C6	C18						0.8319	0.0855	0.4586
#4	C4	C15	C14	C8					0.8317	0.0246	0.9265
#5	C5	C15	C4						0.8191	0.0542	0.8536
#6	C6	C18							0.8212	0.0846	0.5477
#7	C7	C6	C20	C17					0.8442	0.0213	0.2842
#8	C8	C6	C17	C15					0.8373	0.0069	0.8536
#9	C9	C18	C7						0.8231	0.1145	0.2842
#10	C10	C6	C15	C18	C8				0.8232	0.0300	1.0000
#11	C11	C6	C20	C8	C15				0.8274	0.0374	0.2435
#12	C12	C6	C14	C15	C7	C27	C8		0.8398	0.0179	0.5477
#13	C13	C6	C15						0.8190	0.0359	0.7819
#14	C14	C6	C28						0.8247	0.0120	0.2842
#15	C15	C6	C4	C17	C14	C19	C3	C8	0.8427	0.0176	0.7467
#16	C16	C6	C20						0.8309	0.0478	1.0000
#17	C17	C6	C15	C8					0.8385	0.0069	0.7119
#18	C18	C6							0.8195	0.0846	0.6112
#19	C19	C4	C15	C7	C14				0.8247	0.0259	0.5477
#20	C20	C6	C4	C11	C23				0.8337	0.0189	0.7467
#21	C21	C6	C15						0.8111	0.0362	0.2435
#22	C22	C6	C20	C7	C15				0.8435	0.0006	0.0448
#23	C23	C6	C15	C11	C8				0.8237	0.0304	0.4038
#24	C24	C4	C15	C27	C8	C14	C6		0.8344	0.0190	0.8900
#25	C25	C18	C20						0.8107	0.2051	0.4586
#26	C26	C9	C8	C15					0.8156	0.0073	0.0348
#27	C27	C15	C4						0.8196	0.0388	0.5791
#28	C28	C6	C14	C8					0.8273	0.0095	0.5477
#29	C29	C6	C20	C8					0.8283	0.0509	0.4307
#30	C30	C6	C20	C8					0.8202	0.2479	0.4038

Table 3-III. Response patterns and discrimination efficiency of the I_2M_2 individual metrics, I_2M_2 , ICM_{Star} and IBGN. See § 3.4.1.5 for a full description of I_2M_2 metrics

	Shannon (B2+B3)	Original ASPT (B2+B3)	Polyvoltinism (B2+B3)	Ovoviviparity (B3)	TAX (B1+B2+B3)	I_2M_2	ICM_{Star}	IBGN
Response pattern	-	-	+	+	-	-	-	-
Organic matter	0.6743	0.7736	0.7658	0.7580	0.6718	0.8345	0.7931	0.6690
Nitrogen compounds (except Nitrates)	0.7493	0.8542	0.7983	0.7246	0.7512	0.8641	0.8252	0.7379
Nitrates	0.5994	0.7829	0.7430	0.7562	0.6218	0.8276	0.7658	0.6087
Phosphorous compounds	0.6952	0.8557	0.8261	0.7886	0.7061	0.8900	0.8272	0.7225
Suspended matter	0.6691	0.7432	0.8106	0.6806	0.7681	0.8864	0.8011	0.6989
Acidification	0.5229	0.5372	0.6191	0.4924	0.5645	0.7018	0.5965	0.5789
Mineral micropollutants	0.6105	0.7027	0.6494	0.5928	0.6108	0.7577	0.7357	0.5977
Pesticides	0.6911	0.8838	0.8120	0.7309	0.6903	0.9155	0.8592	0.7711
PAH	0.6757	0.7922	0.7869	0.7020	0.7014	0.8864	0.8288	0.7024
Other organic micropollutants	0.5592	0.7608	0.6918	0.6733	0.5844	0.7867	0.7243	0.5826
Transportation facilities	0.6288	0.6513	0.6910	0.5722	0.6718	0.7853	0.7435	0.6675
Riverine vegetation	0.6004	0.6972	0.6600	0.6233	0.6006	0.7547	0.7120	0.5829
Urbanization	0.7109	0.8047	0.7709	0.7094	0.7065	0.8703	0.8388	0.7015
Clogging risk	0.6380	0.8080	0.7747	0.7662	0.6345	0.8618	0.7985	0.6363
Hydrological instability	0.6233	0.6510	0.6579	0.6230	0.6384	0.7609	0.7040	0.6025
Catchment anthropization	0.6257	0.7644	0.7289	0.6897	0.6288	0.8186	0.7748	0.6277
Straightening	0.5984	0.6515	0.6230	0.5901	0.6006	0.7321	0.6917	0.5736

These five metrics had homogeneous response patterns for all the pressure categories, three were decreasing [i.e. (i), (ii) and (v); type II] and two were increasing [i.e. (iii) and (iv); type III] with increasing pressure gradient. Reference values for each combination of 'metric x stream type' were given in *Annex X*.

3.4.2 - Ecological quality class boundaries

The calculated values of the 'high-good', 'good-moderate', 'moderate-poor' and 'poor-bad' boundaries were: 0.8696 ($CI_{95} = [0.8603; 0.8796]$), 0.7327 ($CI_{95} = [0.7195; 0.7411]$), 0.4885 ($CI_{95} = [0.4797; 0.4941]$) and 0.2442 ($CI_{95} = [0.2398; 0.2470]$), respectively.

3.4.3 - Test of the I_2M_2

3.4.3.1 - I_2M_2 values in least impaired conditions

The distribution of I_2M_2 scores from LIRR assemblages in the development and the test data sets exhibited no significant difference (Kolmogorov-Smirnov test: $D = 0.0805$, $p = 0.1617$; Fig. 3-4).

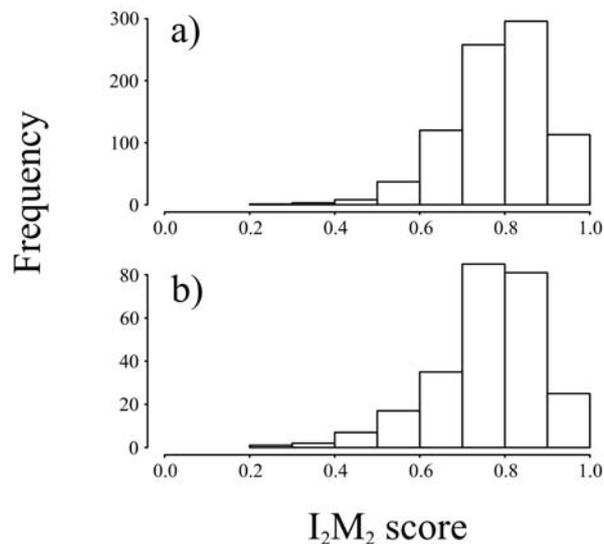


Figure 3-4. Histograms of I_2M_2 score frequency distribution in the development (a) and in the test (b) data sets.

3.4.3.2 - Discrimination efficiency

The difference in I_2M_2 discrimination efficiency between the development and the test data sets was not significant (bilateral paired Wilcoxon signed rank test: $W = 61$, $p = 0.4874$; Figs 3-5 & 3-6).

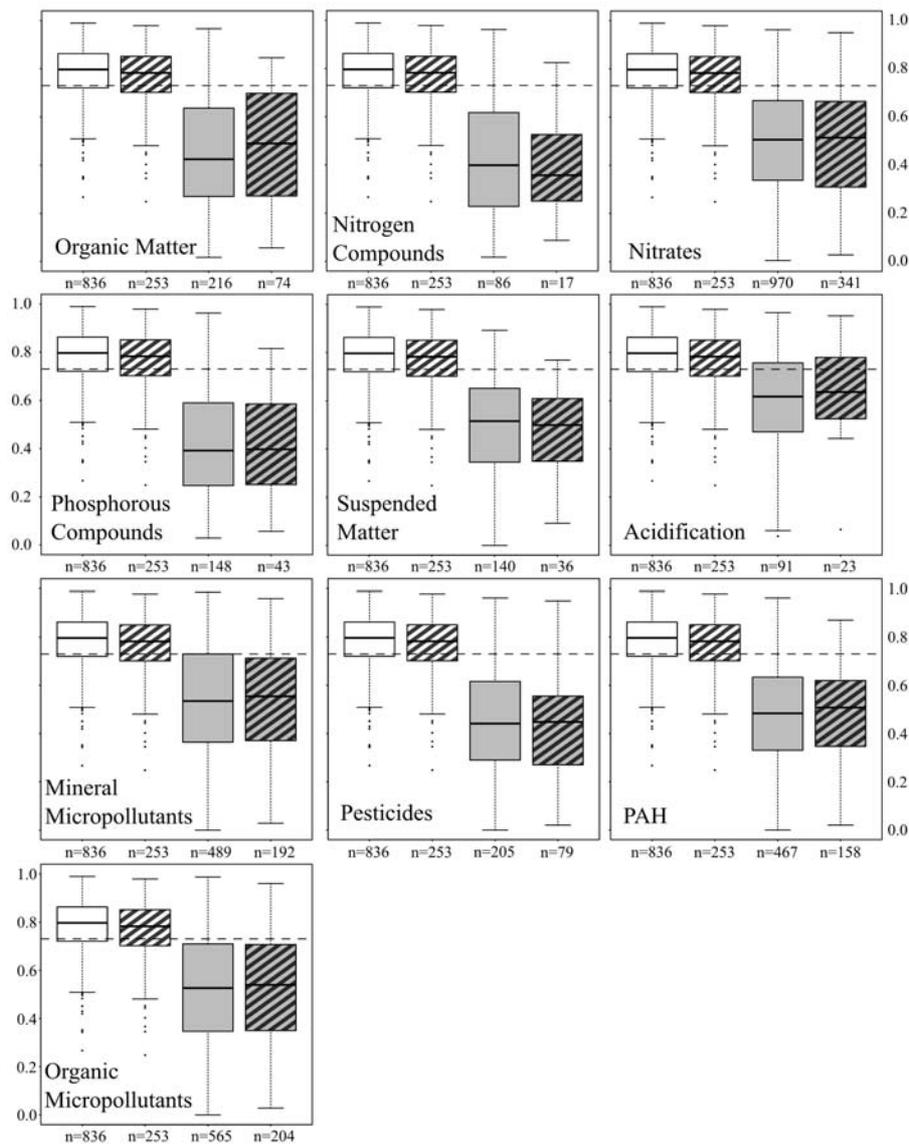


Figure 3-5. I_2M_2 score distributions in least impaired river reaches (white boxes) and impaired river reaches (grey boxes) for 10 different water quality pressure categories. Solid boxes represent the I_2M_2 score distribution in the development data set whereas stripped boxes represent the I_2M_2 score distribution in the test data set. Black dashed lines represent the 'low-moderate' pressure level boundary. 'n' represents the number of faunal samples considered in each group. For further details, see Fig. 3-3 legend.

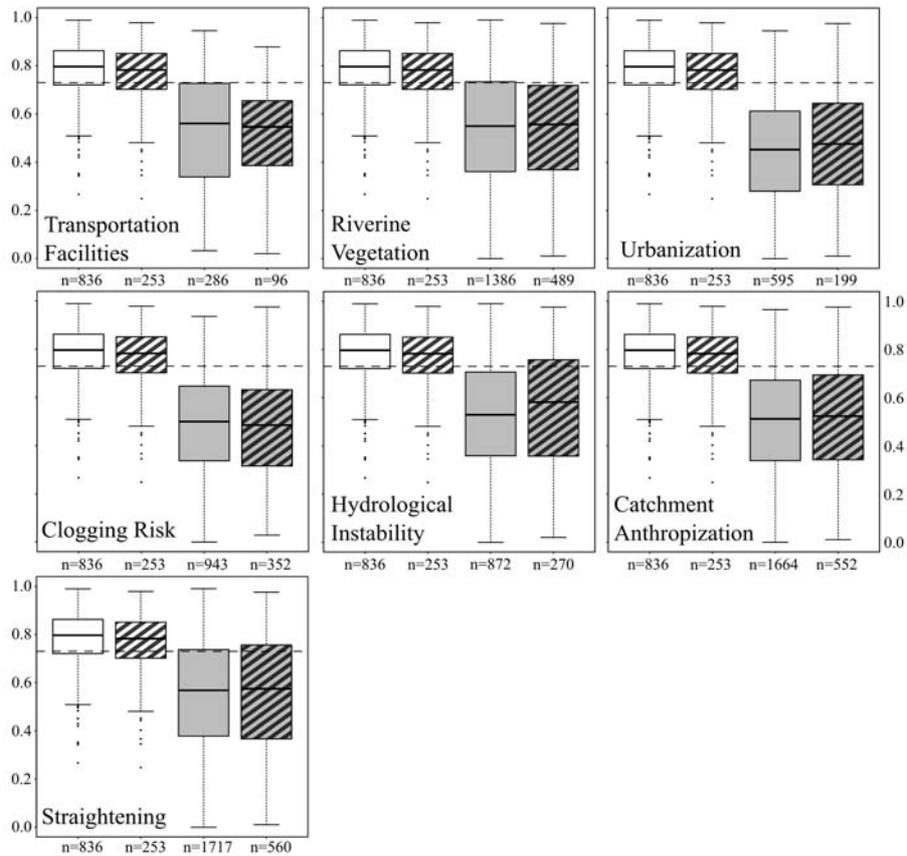


Figure 3-6. I_2M_2 score distributions in least impaired river reaches (white boxes) and impaired river reaches (grey boxes) for 7 different habitat degradation pressure categories. For further details, see Fig. 3-3 & 3-5 legends.

3.4.4 – Correlation of the I_2M_2 with the European intercalibration ICM_{Star} index

The I_2M_2 was strongly and significantly correlated with the ICM_{Star} (Pearson's product moment correlation = 0.9095, p-value < $2.2 \cdot 10^{-16}$).

3.4.5 - Comparison of the I_2M_2 , ICM_{Star} and IBGN discrimination efficiency

The three indices exhibited significant differences in discrimination efficiency (Friedman rank sum test: $\chi^2 = 34$, d.f. = 2, p-value = $4.14 \cdot 10^{-8}$; Table 3-III); the I_2M_2 (mean DE = 0.820 ± 0.064) better performing than the ICM_{Star} (mean DE = 0.766 ± 0.067) and the IBGN (mean DE = 0.651 ± 0.063) (cf. Fig. 3-7; multiple comparison test after Friedman test, $\alpha = 0.05$).

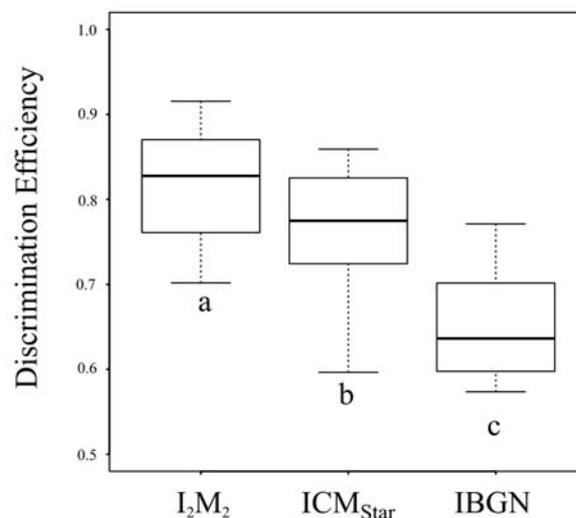


Figure 3-7. Distribution of the 17 DEs of I_2M_2 , ICM_{Star} and IBGN. The boxes range from the 25th to the 75th percentile. The median is represented by the black thick line. The whiskers extend to the extreme data points. Different letters indicate significant differences in DE (multiple comparison test after Friedman test, Siegel & Castellan 1988)

3.5 – Discussion

3.5.1 - Typology specificity

The Water Framework Directive has focused on the need to take into account the specific characteristics of streams from different regions and natural contexts. Many countries using the AQEM approach have defined stream type-specific multimetric indices considering only a low number of stream types: e.g. four in Austria (Ofenböck *et al.* 2004), three in Portugal (Pinto *et al.* 2004) and Greece (Skoulikidis *et al.* 2004) or two in Netherlands (Vlek, Verdonschot & Nijboer 2004). Even if 24 stream types have been defined in Germany, type-specific indices have been developed only for five of them (Lorenz *et al.* 2004).

This strategy seemed quite unsuitable for French streams because of their high environmental diversity (125 stream types have been defined by Chandesris *et al.* 2006). A not type-specific approach was necessary, as already developed in Germany (Böhmer *et al.* 2004a; Hering *et al.* 2004c) or Flemish Belgium (Gabriels *et al.* 2010). Even after stream typology simplification (57 stream types), defining one specific index per stream type would be highly difficult due to the low number of available data on reference or least impaired river reaches for several stream types (cf. *Annex VIII*). Moreover, large scale (i.e. between-stream types) comparisons of index values would be difficult due to the potential differences in metric composition of stream type-specific indices.

As a result, we preferred to evaluate the ecological status of rivers using a single common set of metrics for all the stream types, taking into account stream type characteristics when normalizing metrics into Ecological Quality Ratios (EQRs).

3.5.2 - Pressure specificity

In their cook book, Hering *et al.* (2006a) suggested to develop either generalist or pressure-specific multimetric indices. In contrast with several European countries (Böhmer *et al.* 2004b; Ofenböck *et al.* 2004; Sandin, Dahl & Johnson 2004), we aimed at building a generalist index,

usable for a wide spectrum of environmental conditions (not only for a unique combination of 'bioregion x stressor type'; e.g. Ofenböck *et al.* 2004), by selecting metrics which discriminate anthropogenic pressure from natural variability for a large number of stream types and pressure categories. This choice resulted from several considerations:

1. Pressure-specific index development needs the selection of sampling sites to ensure that: *"environmental stressor gradient[s] is [are] ideally represented by a set of sites of one freshwater ecosystem type covering the whole range [...] of the environmental stressor that is to be targeted by the Multimetric System"* (Hering *et al.* 2006a). The French survey network was not designed to fulfil this requirement. Indeed, in the two main French National survey networks, reaches were selected to be either least impaired (i.e. Reference Reach National survey) or simply representative of the mean quality of the water body they belonged to (i.e. RCS National survey).
3. The search for pressure category specific metrics, would require that reaches included in the development data set be individually impaired by one or a low number of pressure categories. As a result, complex pressure combinations, which often impair river reaches, would not – or not optimally - be taken into account in the development of pressure-specific indices. As an illustration, the 1725 river reaches included in our data base were significantly impaired, in average, by 4.23 (\pm 2.29) of the 17 pre-defined pressure categories (see also Comte *et al.* 2010). A generalist index seemed to be much more suitable for identifying multiple pressure scenarii.
4. The concentration of many toxicants still remains very difficult (at low level) and expensive to quantify in water and/or sediment, making them scarcely included in routine survey networks (Kolpin *et al.* 2002). As an example, mineral micropollutants and PAH were respectively measured for only 39.23% and 35.70% of the samples in the used data base. We hypothesized that, if selected biological metrics significantly respond to a high number of different pressure categories, the multimetric index would have higher chance to identify not targeted (or unexpected) pressure categories.

5. Metrics and indices considered as pressure-specific were, in fact, not so specific. For example, Lorenz *et al.* (2004) demonstrated that the German Fauna Index, based on taxonomic metrics, designed to specifically identify hydromorphological alterations, significantly responded also to organic contamination. SPEAR indices were developed to identify the biological impact of some specific categories of toxic pollutants: e.g. pesticides (Liess & von der Ohe 2005); metals (von der Ohe & Liess 2004), organic micro-pollutants (Beketov & Liess 2008). Even if they were designed to respond to specific toxic pressure, these indices significantly responded to a more diverse combination of pressure categories, i.e. in average 6.6 ± 1.4 of the 10 predefined water quality pressure categories and 5.3 ± 0.8 of the 7 pre-defined habitat degradation risks, based on our whole data base.
6. Last, we found that metric DE for the different pressure categories were strongly correlated (Pearson's coefficient $r = 0.92 \pm 0.04$). In other words, metrics tended to have similar DE for the different pressure categories. As a consequence, it seemed extremely difficult to identify 'truly specific' metrics able to efficiently discriminate only one or a small group of pressure categories.

3.5.3 – Selected metrics

The final I₂M₂ was composed of only five metrics. Three of them are taxonomic metrics that have been widely used in biotic indices: (i) the Shannon's diversity index (Shannon 1948) included in several European multimetric indices, e.g. in Germany (Böhmer *et al.* 2004b) or in Belgium (Gabriels *et al.* 2010); (ii) the "Average Score Per Taxon" (ASPT, Armitage *et al.* 1983) already involved - sometimes with regional adaptations - in several European multimetric indices developed in the AQEM context, e.g. in Italy (Buffagni *et al.* 2004), Czech Republic (Brabec *et al.* 2004), southern Sweden (Dahl & Johnson 2004) or Portugal (Pinto *et al.* 2004); and (iii) taxonomic richness, considered as the simplest measure of diversity (Stirling & Wilsey 2001; Mendes *et al.* 2008). This metric has been already taken into account in several biotic indices, e.g. the IBGN (France, AFNOR 2004) and the BBI (Belgium, de Pauw & Vanhooren 1983) and has been included in several multimetric indices (e.g. Royer, Robinson & Minshall 2001; Ofenböck *et al.* 2004; Vlek *et al.* 2004; Gabriels *et al.* 2010).

The two last metrics were biological traits, i.e. fuzzy-coded variables (Chevenet *et al.* 1994) describing various biological attributes of species (Resh *et al.* 1994; Usseglio-Polatera *et al.* 2000a; Statzner & Bêche 2010). During the twenty last years, these traits have been increasingly used, first to elucidate the filtering role of habitat on species attributes at various spatial scales (e.g. Townsend & Hildrew 1994; Townsend *et al.* 1997; Poff 1997), then to study the additional filtering role of human activities on biological traits of stream assemblages in a biomonitoring perspective (e.g. Dolédec *et al.* 1999; Charvet *et al.* 2000; Usseglio-Polatera & Beisel 2002; Gayraud *et al.* 2003; Liess & von der Ohe 2005; Dolédec & Statzner 2008; Townsend *et al.* 2008; Archaimbault *et al.* 2010; Statzner & Bêche 2010), but were still rarely included in the composition of multimetric indices. Two trait categories regarding reproduction have been included in the I₂M₂: (iv) 'polyvoltinism' and (v) 'ovoviviparity'. Polyvoltinism - supposed to ensure a higher resilience capacity - is a reproductive strategy expected to occur with higher frequency in unstable conditions compared to a 'reference' situation (Townsend & Hildrew 1994), whereas 'ovoviviparity' as parental care strategy, would prevent high mortality at egg stage in harsh environmental conditions. An increase in polyvoltine and/or ovoviviparous species frequency in benthic assemblages has been already observed with different pressure categories (e.g. Usseglio-Polatera & Beisel 2002; Archaimbault 2003; Piscart *et al.* 2006b; Dolédec & Statzner 2008).

3.5.4 – Ecological quality class boundaries

Because using LIRRs instead of 'true references', we have not divided the 0-1 range of EQR values in five classes of equal range (e.g. Böhmer *et al.* 2004b; Gabriels *et al.* 2010) or used the 25th percentile of the reference value distribution as the 'high-good' boundary before defining the other class boundaries with equal bands (e.g. Munné & Prat 2009; Poquet *et al.* 2009). We assigned the 75th and the 25th percentiles of the I₂M₂ scores in LIRRs to the 'high-good' and 'good-moderate' boundaries respectively; equal bands only defining the three other quality classes. Moreover, in the establishment of between-class boundary, we used a bootstrap sub-sampling method that provided (i) a robust estimate of boundary and (ii) the 95% confidence interval associated with each class boundary (Fig. 3-3), in agreement with the uncertainty measure around class boundaries required by the WFD (European Commission 2003).

3.5.5 - I_2M_2 efficiency

Testing the I_2M_2 with an independent data set has demonstrated its stability in LIRRs and its robustness regarding discrimination efficiency. The I_2M_2 could also be considered as a highly sensitive index, since there is nearly no overlap between LIRRs and IRRs inter-quartiles of index score distribution (Royer *et al.* 2001). In average more than 81% of the reaches pre-classified as 'impaired' on environmental criteria were also considered as 'impaired' by the I_2M_2 . This high efficiency of detecting a large panel of pressures (even at moderate level) allows considering the I_2M_2 as a robust and efficient biomonitoring tool (Sandin & Johnson 2000). Compared to the IBGN, the I_2M_2 significantly improved the detection of impaired reaches by at least 17% for nitrogen compounds and up to 35% for organic micropollutants and clogging risk.

A reasonable proxy for global anthropogenic pressure on reaches could be the anthropization level of their catchment, evaluated with the addition of the relative surfaces respectively used by urbanization, agriculture and industry. The distribution of I_2M_2 reach scores among the different quality classes, closely matches the distribution of corresponding pressure levels of catchment anthropization (Fig. 3-8), then validating the procedure establishing ecological boundaries.

3.6 - Conclusion

The proposed multimetric index (I_2M_2) (i) completely fulfils the WFD requirements, (ii) significantly improves the detection of impaired reaches when compared to the former French IBGN, (iii) is one of the very first biomonitoring tool designed - from a large national data base - to take into account pressure-impact relationships for a high number of pressure categories (including both water quality and habitat degradation of reaches) and considering both taxonomic characteristics and biological traits of benthic macroinvertebrate assemblages.

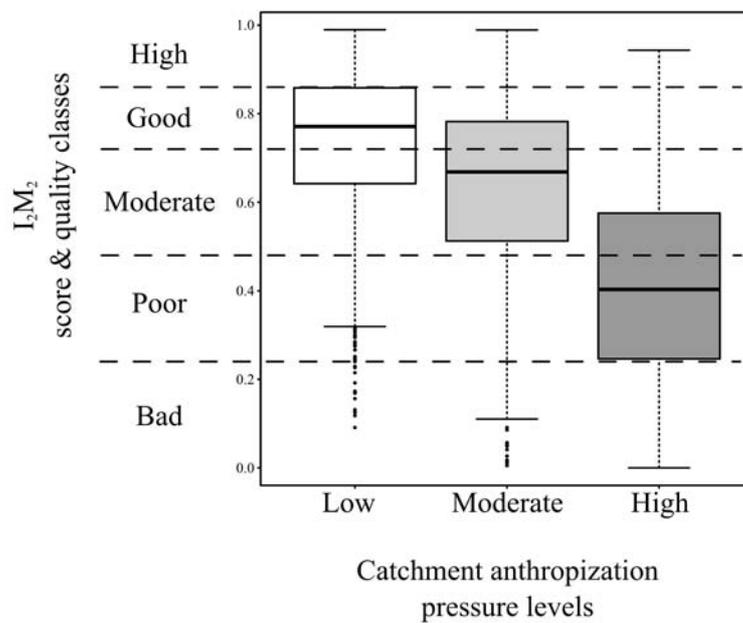
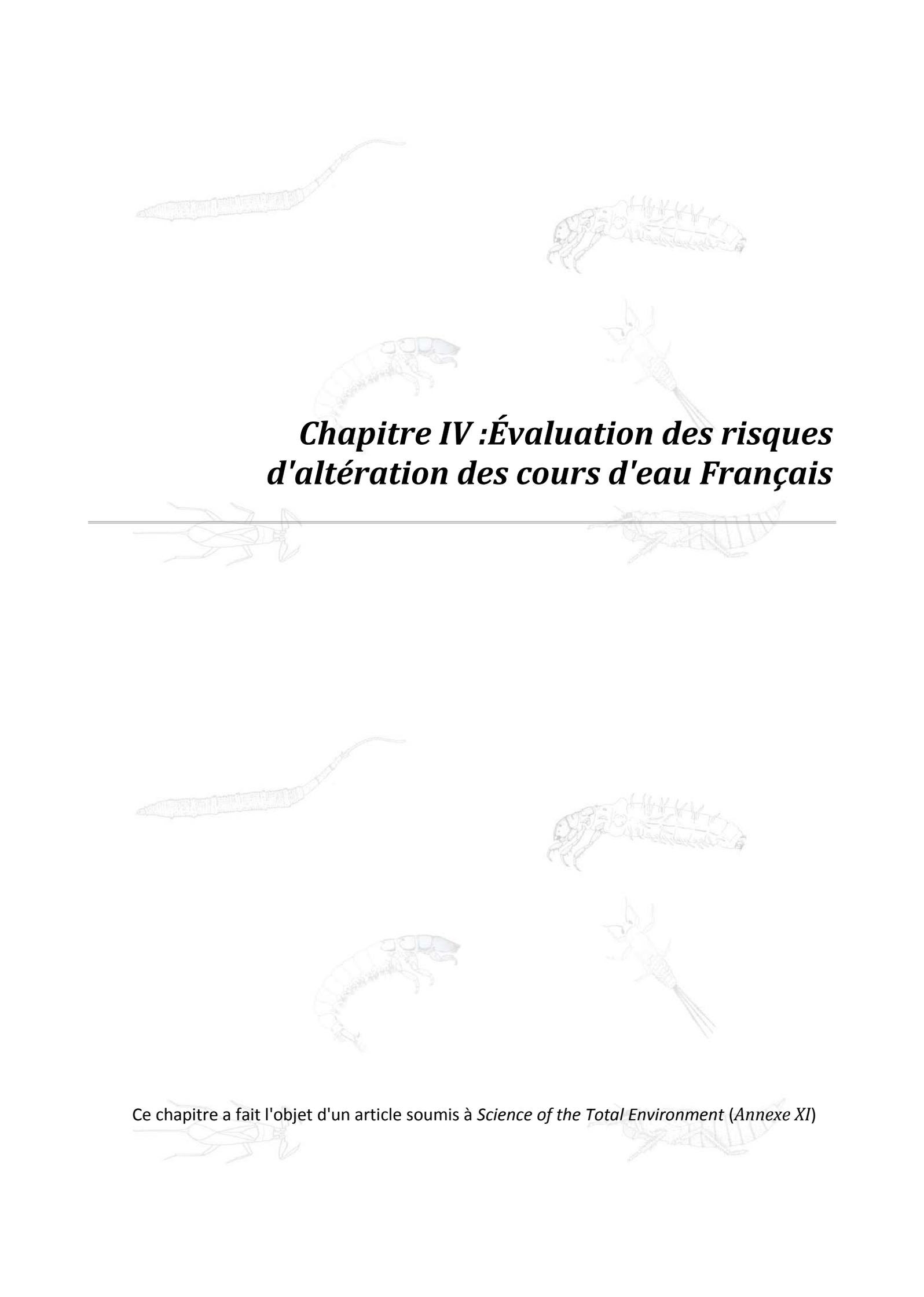


Figure 3-8. Boxplot of I_2M_2 scores in relation to the pre-defined reach pressure levels concerning catchment anthropization. Black dashed lines represent ecological quality class boundaries. For further details, see Fig. 3-5 legend.

The I_2M_2 has been proposed for future use in the national biomonitoring of wadeable reaches in the WFD implementation framework and for integration in the future French online system 'SEEE' (Système d'Evaluation de l'Etat des Eaux = Water Status Evaluation System) that will provide to managers a simple way to calculate this index (among other metrics describing BQE assemblages) after uploading reach invertebrate assemblage abundance distribution. Moreover, the I_2M_2 is (better performing than and) highly correlated to the European intercalibration multimetric index (ICM_{star}), which is very promising regarding the future integration of the I_2M_2 in the European pool of WFD-compliant biotic indices.



***Chapitre IV :Évaluation des risques
d'altération des cours d'eau Français***

Ce chapitre a fait l'objet d'un article soumis à *Science of the Total Environment (Annexe XI)*

Résumé

Le plein accomplissement des objectifs de la Directive Cadre sur l'Eau requiert des pays membres de l'Union Européenne la réalisation de trois étapes successives : (i) l'évaluation de l'état écologique des masses d'eau, (ii) l'évaluation spécifique des risques d'altération par les différents types de pressions anthropiques et (iii) la mise en place des mesures appropriées de gestion et de restauration.

Dans ce chapitre, nous avons cherché à mettre au point un nouvel outil d'évaluation des risques écologiques (« ecological risk assesement » = ERA) applicable dans un contexte de pressions multiples pour la plupart des petits et moyens cours d'eau Français (étape ii). Cet outil modélise, à l'aide de forêts d'arbres conditionnels (« conditional tree forest = CTF), la probabilité pour un site donné, que sa communauté benthique soit perturbée par chacun des 16 types de pressions étudiés à partir de métriques basées sur les traits bio-écologiques des invertébrés.

Pour douze des types de pression étudiés, les modèles CTF correspondant ont montré une bonne efficacité dans l'évaluation des risques (i.e. des valeurs d'AUC $\geq 0,7$), et ceci même pour des niveaux modérés de pression et dans un contexte de pressions multiples. Les modèles correspondant aux quatre derniers types de pression ont montré une efficacité moindre mais prometteuse (AUC = 0,66 +/- 0,01), qui devrait pouvoir être améliorée par la prise en compte de métriques supplémentaires (e.g. taxonomiques).

En conditions de pressions multiples, l'identification du rôle de chacun des types de pression dans l'altération des communautés benthiques est une étape cruciale pour que les gestionnaires puissent mettre en place des actions de restauration appropriées. La prise en compte simultanée de l'ensemble de la complexité des adaptations bio-écologiques au sein des assemblages macrobenthiques soumis aux pressions humaines a permis de fournir un outil de diagnostic fonctionnel à la fois (i) pertinent d'un point de vue écologique et (ii) efficace en termes d'évaluation des risques.

4.1 - Introduction

Despite all their previous efforts to provide useful biomonitoring tools, ecologists are currently facing new challenges linked to (i) new environmental risks and (ii) new societal demands for integrated ecological assessment methods arising from recent trends in environmental policies. First, stream pollution patterns have gradually changed since the early 20th century from local to global scale (e.g. Verdonshot 2000) and from dominant organic contamination to more diverse and complex combinations of degradation sources; including (i) toxic compounds (e.g. Fleeger, Carman & Nisbet 2003; Archambault *et al.* 2010) and (ii) habitat degradation (Ofenböck *et al.* 2004). Second, in the European context, the Water Framework Directive (WFD: European Council 2000) has required that member states (i) revise their biomonitoring tools evaluating the ecological quality of water bodies and (ii) achieved at least 'good' ecological status for all ground and surface waters by 2027 with two milestones in 2015 and 2021.

The full accomplishment of the WFD objectives has required from EU members three successive steps: (i) the evaluation of the actual ecological status of their water bodies, (ii) the assessment of water body impairment risk, individually considering different anthropogenic pressure categories and (iii) the implementation of appropriate management and restoration programmes.

For most of the EU Member States, step (i) is about to be fulfilled, mostly with the recent development of numerous multimetric indices (e.g. Böhmer *et al.* 2004a; Mondy *et al.* 2012), these indices being now (or will be rapidly) part of the European inter-calibration exercise (Bennett *et al.* 2011).

Distinguishing the effects of multiple potential stressors – step (ii) – represents a serious practical need as it could serve as a basis for prioritizing management options to efficiently enhance river reach ecological quality [i.e. step (iii), Townsend *et al.* 2008]. However, most of the new European indices based on benthic invertebrates aim at measuring the magnitude of

community impairment (e.g. Chapter III), but rarely give specific information on the nature of such impairment (see Böhmer *et al.* 2004a; Ofenböck *et al.* 2004). Several authors have developed (i) pressure-specific indices (e.g. regarding organic contamination: Brabec *et al.* 2004; hydromorphological alterations: Lorenz *et al.* 2004; pesticides Liess & von der Ohe 2005 or organic micro-pollutant contamination: Beketov & Liess 2008) or (ii) diagnostic systems (e.g. Clews & Ormerod 2009; Archaimbault *et al.* 2010), but these approaches remain quite uncommon for multiple stressor scenarii, especially at large spatial scale.

Based on the notion that habitats act as a templet on which evolution forges characteristic combinations of species attributes (Southwood 1977; Townsend & Hildrew 1994), traits can fundamentally improve the diagnosis of anthropogenic pressures in rivers by mechanistically understanding and inferring cause-effect relationships between stressors and community impairment (e.g. Statzner *et al.* 2005; Dolédec & Statzner 2008). Because of their clear potential in environmental diagnoses and prognoses, traits have already rebuilt bioassessment (Bonada *et al.* 2006; Menezes, Baird & Soares 2010; Mondy *et al.* 2012), and are also taken into account in the ecological risk assessment (ERA) of toxicants at community level (e.g. Liess & Beketov 2011) as well as for the prediction of species sensitivity to contaminants (Baird & van den Brink 2007). As such, trait-based approaches (TBA's) have the potential to serve as a bridge to link risk assessment and biomonitoring (Beketov *et al.* 2009).

Considering the stability of community trait profiles at large spatial (Charvet *et al.* 2000; Statzner *et al.* 2001; Archaimbault *et al.* 2005) and temporal (Bêche *et al.* 2006; Bêche & Resh 2007) scales and their capacity to resolve effects of multiple stressors (Statzner & Bêche 2010; Schäfer *et al.* 2011), TBAs have the potential to build up a generic tool that can predict the impact of specific anthropogenic pressure categories on biotic assemblages (Menezes *et al.* 2010; Culp *et al.* 2011), ameliorate the understanding of functional impairments in ecosystems, and then facilitate efficiency and realism of the outcomes in research and practical areas.

Random forests (RFs; e.g. Breiman 2001) have already demonstrated their usefulness in studies of complex predictor-response patterns (e.g. Bureau *et al.* 2005; Chen & Liu 2005), but they have been rarely applied in ecological sciences and risk assessment (see Keller, Kocev &

Džeroski 2011; Philibert *et al.* 2011) although their ability to handle non-linear and complex interactions among variables (e.g. Prasad, Iverson & Liaw 2006; Cutler *et al.* 2007). Using conditional tree forests (CTFs, Strobl *et al.* 2007), a particular type of RFs, we aimed at investigating the efficiency of an innovative trait-based ERA tool working at large spatial scale (i.e. for most of the French wadeable rivers), to assess the risk for benthic macroinvertebrate communities to be impaired by each of ten 'water quality alteration' and six 'habitat degradation' categories, in a context of multiple anthropogenic pressures.

4.2 - Material & Methods

4.2.1 - Data collection

Fieldwork was performed between 2004 and 2009 by 22 regional environmental agencies on a national network (cf. §2.1.3). Selected reaches gathered most of the French wadeable rivers (including 1218 reaches from 907 rivers, cf. Fig. 2-3). A 'learning' data set was formed by randomly selecting 75% of the reaches, while the remainder (i.e. 25% of the reaches) formed the test data set.

Macroinvertebrate communities were sampled in all reaches with a common normalized protocol (cf. §2.1.4). Samples were processed following a standardized procedure (cf. §2.1.5). The data base was composed of 3904 faunal sampling events, each reach being sampled in average 3.21 +/- 1.86 times over the 2004-2009 period.

Water quality, land use and hydromorphological characterization of reaches was performed following procedure described in §2.1.2 for 16 pressure categories (Table 4-I). Based on the two-class system ('low' vs. 'significant' risk level) described in §3.3.1.2, reaches with minimal impairment levels were considered as 'Least Impaired River Reaches' (LIRRs), following Statzner *et al.* (2005). Further details on faunal sampling and WQ, HD and LIRR characterization of reaches have been given in Chapter III.

Table 4-I. Codes and full labels of water quality (10) and habitat degradation (6) pressure categories examined in this study

<i>Water Quality pressures</i>	<i>Habitat Degradation pressures</i>
WQ1 – Organic matter	HD1 – Transportation facilities
WQ2 – Nitrogen compounds	HD2 – Riverine vegetation
WQ3 – Nitrates	HD3 – Urbanization
WQ4 – Phosphorous compounds	HD4 – Clogging risk
WQ5 - Suspended matter	HD5 – Hydrological instability
WQ6 – Acidification	HD6 – Straightening
WQ7 – Mineral micro-pollutants	
WQ8 – Pesticides	
WQ9 – PAH	
WQ10 – Organic micro-pollutants	

4.2.2 – Biotraits and trait-based metrics

Basically, biotraits are variables describing biological attributes of species (Statzner & Bêche 2010) or reflecting species-habitat relationships (Usseglio-Polatera *et al.* 2000b). Traits were categorized in discrete trait categories or trait states. A fuzzy coding approach (Chevenet *et al.* 1994) was applied to allow within species variation to be included (e.g. variation in maximal body size, voltinism or feeding habits) and to deal with differences in detail and availability of trait information across different taxa. Two hundred and sixteen trait-based metrics, detailed in *Annex XII*, were calculated.

4.2.3 – Statistical procedure

4.2.3.1 – Impairment risk and impairment probability

For each pressure category, conditional tree forest (CTF, e.g. Strobl *et al.* 2007), a particular type of random forest (RF, Breiman 2001), was built using the risk level ('low' vs. 'significant') as the response variable and the trait-based metrics as the predictive variables. We parametrized each CTF using the strategy suggested by Strobl *et al.* (2007) to obtain an unbiased variable selection, i.e. (i) 500 conditional inference trees (CITs, Hothorn *et al.* 2006) grown to their maximum (i.e. grown until the final sample groups were homogeneous regarding their risk level), (ii) each CIT was fitted to a sub-sample data set (here 63.2% of the data = 'in bag' data) randomly

selected without replacement from the learning data set, (iii) for each node in the individual CITs, the best splitting variable was selected, from a small sub-sample (here $n= 5$) of predictive variables, by (iv) maximizing the $(1-p)$ criterion with p being the univariate p -value related to the tested effect of a given predictive variable on the response variable (Strobl *et al.* 2007).

For each pressure category, the prediction of the corresponding CTF model (i.e. 'impairment risk' = IR hereafter) was comprised between 0 and 1 for a given reach. IR corresponds to the mean impairment risk calculated over all the 500 simulated CITs. The receiver operating characteristic (ROC) curve (Fawcett 2006) of each CTF was established using the risk level (i.e. 'low' vs. 'significant') as the response variable and the IR as the predictive variable. On a two dimensional graph [the ROC space: Fawcett 2006; Robin *et al.* 2011], the ROC curve illustrates the trade-off between the proportion of reaches with 'significant' alteration risk level correctly assigned (TPR) and the proportion of reaches with 'low' alteration risk level correctly assigned (TNR) by a CTF over the whole range of predicted IR. After establishing ROC curves, we searched, for each CTF, the minimum (*min*) IR value in reaches with *a priori* low risk (i.e. using abiotic data corresponding to the investigated pressure category), the maximum (*max*) IR value in reaches with *a priori* significant risk and the best cut-off value (*cut-off*), i.e. the IR value that maximized both TPR and TNR. To allow between-CTFs comparisons, IR values were transformed in impairment probabilities (= IP hereafter; equations [1] and [2]), with a 0.5 threshold delineating 'low' and 'significant' predicted risk levels. Equation [1] was used for IR values lower than the cut-off value (i.e. $IP \leq 0.5$) and equation [2] was used for IR values strictly higher than the cut-off value (i.e. $IP > 0.5$) of the corresponding pressure category.

$$IP = 0.5 \times (IR - \text{min}) / (\text{cut-off} - \text{min}) \quad [1]$$

$$IP = 0.5 + 0.5 \times (IR - \text{cut-off}) / (\text{max} - \text{cut-off}) \quad [2]$$

4.2.3.2 – Model evaluation

Two data sets were used to test the model performances: the 'out of bag' data (OOB) set and the test data sets. The construction process of each CTF used data from only 63.2% of the sampling events included in the learning data set (= the 'in bag' data) to fit each CIT. Data not used (= OOB) corresponded to sampling events from the same reaches (but performed at other sampling dates), in contrast with the 'test' data set which consisted of reaches totally different from those included in the learning data set (cf. §4.2.1).

Using IP values, reach samples of the OOB and the test data sets were *a posteriori* (i.e. using biotic data) classified at 'low' (i.e. $IP < 0.5$) or 'significant' (i.e. $IP \geq 0.5$) risk level. The quality of each CTF was estimated with the area under the ROC curve (AUC, Fawcett 2006), the TPR and the TNR (cf. §4.2.3.1). The AUC of each model was calculated from both the OOB and the test data sets. Both AUC from OOB and test data sets were statistically compared using 2000 bootstraps (Robin *et al.* 2011). The TPR and TNR were also calculated in the OOB and the test data sets by comparing *a priori* and *a posteriori* classification of reaches.

4.2.3.3 – Explicative variables importance

In the CTFs, the importance of each trait-based metric as predictive variable was estimated by averaging the increase in prediction error (IncErr) over the 500 CITs, before and after randomly permuting this metric only (Strobl *et al.* 2007). The higher the IncErr is, the greater the importance of the trait-based metric is for the model.

All calculations and statistical procedures were performed with the R software (R Development Core Team 2009) using packages 'party' for CTF models (Strobl *et al.* 2007) and 'pROC' for the calculation and comparison of CTFs AUC (Robin *et al.* 2011).

4.3 - Results

Trait-based metrics were rather stable in LIRRs with trait categories being more stable (CV = 0.20 +/- 0.12) than the other trait-based metrics (CV = 0.55 +/- 0.83); see *Annex XII* for detailed information on metric CV.

4.3.1 – Pressures co-occurrence

Using the Cohen's Kappa coefficient (equation [3]; Cohen 1960), we measured the proportion of co-occurrence between pressure categories after co-occurrence by chance had been removed from consideration.

$$K = (p_o - p_e) / (1 - p_e) \quad [3]$$

with p_o the observed proportion of co-occurrence and p_e the proportion of co-occurrence expected by chance.

We found that the non random co-occurrence of pairs of pressure categories was very low (0.03 +/- 0.08; Table 4-II). Only three pairs of pressures exhibited more than 25% of co-occurrence: WQ2 / WQ4 (K = 0.42), WQ3 / HD4 (K = 0.45) and HD1 / HD3 (K = 0.28).

Table 4-II. Kappa coefficient of pressure category co-occurrence (white cells) and Pearson's correlation coefficient describing trait-based metric importance relationship when comparing couples of conditional tree forest model (grey cells). Null and negative Cohen's Kappa values indicate that the co-occurrence of the couple of pressures was equal or lower than random expectation. The higher the Kappa coefficient value is, the more significant is the co-occurrence of pressure. Pressure categories and related models were identified by codes given in Table 4-I.

	WQ1	WQ2	WQ3	WQ4	WQ5	WQ6	WQ7	WQ8	WQ9	WQ10	HD1	HD2	HD3	HD4	HD5	HD6
WQ1		-0.04	0.153	0.000	0.113	0.081	-0.057	0.145	-0.002	0.047	0.244	0.214	0.036	0.195	0.084	0.075
WQ2	0.177		0.049	0.049	-0.014	-0.016	0.019	0.124	-0.008	-0.017	0.091	-0.008	0.218	0.026	-0.039	0.106
WQ3	0.027	0.026		0.009	0.121	0.076	0.361	0.023	0.097	0.070	0.156	0.318	0.164	0.717	-0.004	0.146
WQ4	0.188	0.421	0.033		-0.049	0.079	0.028	0.072	0.096	0.173	-0.035	0.019	0.178	0.123	-0.003	0.059
WQ5	0.148	0.078	0.013	0.239		0.045	-0.042	-0.038	0.116	-0.042	0.336	0.140	-0.042	0.234	0.025	0.174
WQ6	0.001	0.005	-0.020	0.066	0.050		0.039	0.158	0.027	-0.058	0.018	0.121	-0.055	0.109	0.019	0.206
WQ7	0.042	0.018	-0.158	0.009	0.032	-0.046		-0.078	0.173	0.030	0.034	0.038	0.230	0.203	-0.039	0.056
WQ8	0.061	0.064	0.044	0.104	0.055	0.017	0.015		-0.022	0.039	0.052	0.155	0.074	0.104	0.132	0.092
WQ9	-0.028	0.020	0.025	0.018	0.068	-0.005	0.140	0.050		0.193	0.097	0.079	0.297	0.150	-0.024	-0.034
WQ10	-0.029	0.015	0.139	0.012	-0.001	0.058	-0.018	0.055	0.235		0.022	0.138	0.164	0.081	-0.069	-0.082
HD1	-0.049	0.002	-0.063	-0.029	0.025	-0.011	0.016	0.040	-0.015	-0.041		0.182	0.200	0.131	0.091	0.141
HD2	0.044	0.018	0.173	0.034	0.016	-0.003	-0.050	0.029	0.069	0.060	-0.006		0.015	0.321	0.074	0.065
HD3	-0.052	0.031	0.017	0.034	0.008	0.027	-0.043	0.032	0.085	-0.007	0.277	0.050		0.238	0.043	-0.004
HD4	0.044	0.020	0.451	0.030	0.020	-0.015	-0.038	0.057	0.055	0.069	-0.060	0.091	0.051		0.051	0.107
HD5	0.009	0.029	0.020	0.028	0.016	-0.003	0.026	0.010	0.010	-0.087	0.051	-0.032	0.021	0.089		0.092
HD6	-0.016	-0.002	-0.046	0.000	-0.005	-0.009	0.005	0.014	0.004	-0.013	0.005	0.012	0.061	-0.016	0.050	

4.3.2 – Conditional Tree Forests

4.3.2.1 – Model performances

In average, the 16 trait-based CTF models exhibited similar good performances (Wilcoxon matched-pairs signed rank test, all p-values > 0.07) when tested on the OOB and the test data sets (AUC = 0.73 +/- 0.06; TPR = 0.67 +/- 0.06; TNR = 0.66 +/- 0.05). The performance of the WQ and the HD models were not statistically different (Wilcoxon test, all p-values > 0.07). We used as robustness index the p-values obtained when testing the differences in AUC values between the OOB and the test data sets. When comparing these p-values with a Wilcoxon test, the HD models may be considered as significantly less robust (i.e. associated to lower p-values) than the WQ models (Wilcoxon test p-value = $2.5 \cdot 10^{-4}$; cf. Table 4-III).

4.3.2.2 – Metric importance

84.17% (+/- 16.95 according to the pressure category) of the tested trait-based metrics contributed to enhance CTFs (i.e. improved the CTF predictions, IncErr > 0) (Table 4-II). The importances of the 216 trait-based metrics in each of the CTF models were not strongly correlated (Pearson correlation: mean $|r|$ = 0.10 +/- 0.10, Table 4-II), 'nitrates' (WQ3) and 'clogging risk' (HD4) excepted (r = 0.72). Detailed information on the importance of each trait-based metric in the CTF models is given in *Annex XII*

Table 4-III. Characteristics and performances of the 16 models in the OOB (i.e. learning) and the test data sets. AUC: area under the receiver operating characteristic curve, *p*: *p*-value of the permutation test comparing the AUCs calculated for each model on the OOB and the test data sets. TPR: true positive rate, TNR: true negative rate. Each model is identified by the code of the investigated pressure category (see Table 4-I for full labels of pressure categories and text for more details)

	AUC			TPR		TNR	
	OOB	test	<i>p</i> -value	OOB	test	OOB	test
WQ1	0.739	0.733	0.870	0.668	0.693	0.667	0.645
WQ2	0.755	0.671	0.248	0.662	0.667	0.674	0.687
WQ3	0.846	0.856	0.524	0.768	0.82	0.764	0.742
WQ4	0.745	0.799	0.265	0.698	0.759	0.680	0.678
WQ5	0.646	0.655	0.848	0.607	0.614	0.610	0.637
WQ6	0.711	0.716	0.943	0.696	0.714	0.652	0.666
WQ7	0.713	0.692	0.449	0.659	0.669	0.654	0.627
WQ8	0.701	0.704	0.942	0.649	0.683	0.644	0.603
WQ9	0.691	0.649	0.164	0.647	0.663	0.650	0.571
WQ10	0.683	0.650	0.213	0.639	0.630	0.642	0.626
HD1	0.795	0.753	0.150	0.711	0.552	0.718	0.765
HD2	0.738	0.685	0.010	0.675	0.641	0.677	0.661
HD3	0.751	0.790	0.068	0.670	0.686	0.671	0.727
HD4	0.835	0.783	0.002	0.742	0.733	0.740	0.691
HD5	0.759	0.666	2.6×10^{-5}	0.694	0.601	0.691	0.623
HD6	0.719	0.582	2.6×10^{-9}	0.642	0.569	0.646	0.546

4.4 – Discussion

Retrospective ecological risk assessment (ERA) aims at identifying the causes of adverse effects that have already occurred (van den Brink *et al.* 2011). However, ERA is a challenging issue in aquatic ecology because multiple sources of pressure are often acting simultaneously (Preston & Shackelford 2002). Studied reaches were - at least moderately - impaired in average by 3.5 (+/- 2.1) of the 16 defined pressure categories. The utilization of conditional tree forests (CTFs) built on benthic macroinvertebrate trait-based metrics is a promising future direction for detecting the individual effects of certain human-induced pressure categories, even in multi-pressure scenarii.

4.4.1 – The CTF approach: a promising tool for ecological risk assessment

CTFs, and more generally RFs, are statistical methods increasingly used in biological sciences (e.g. Bureau *et al.* 2005; Chen & Liu 2005) even if they remain rarely applied in ecology (e.g. Prasad *et al.* 2006). However, CTFs are a potentially promising approach due to (i) their high efficiency, (ii) their ability to handle complex and non linear interactions among predictive variables, (iii) their capacity to match several types of analysis (e.g. classification and regression) and (iv) their ability to measure the relative importance of predictive variables (Cutler *et al.* 2007). This study is one of the very first 'large scale' analysis using trait-based RFs in ERA, even if several recent studies have already tested trait-based RF models in pest risk assessment (PRA) (Cutler *et al.* 2007; Keller *et al.* 2011; Philibert *et al.* 2011), which aims at identifying the most probable future invasive species for a given area to prevent their importation (Keller *et al.* 2011). In this context, RFs have allowed an efficient identification of species exhibiting a high risk of invasiveness from a wide range of potential invaders: plants (Cutler *et al.* 2007; Keller *et al.* 2011), fungi (Philibert *et al.* 2011) or various faunal groups including molluscs, fish and birds (Keller *et al.* 2011).

Pearce & Ferrier (2000) have considered an AUC value between 0.50 and 0.70 as indicating rather 'poor' model efficiency, whereas AUC values between 0.70 and 0.90 or higher than 0.90 are characteristic of models with respectively 'good' and 'very good' efficiency. In comparison with previous PRA studies (Cutler *et al.* 2007; Keller *et al.* 2011), for which all the RF models exhibited at least good efficiency ($0.70 < \text{AUC} < 1.00$), the application of CTF in ERA provided more contrasted results. Twelve of the 16 investigated pressure categories provided CTFs with an AUC higher than 0.70 when averaging results from the learning (i.e. OOB) and the test data sets; i.e. 0.70 for 'pesticides' and 'mineral micro-pollutants'; 0.71 for 'nitrogen compounds', 'acidification', 'riparian vegetation' and 'hydrological instability'; 0.74 for 'organic matter'; 0.77 for 'phosphorous compounds', 'transportation facilities' and 'urbanization'; 0.81 for 'clogging risk' and 0.85 for 'nitrates'.

The CTF models related to the four other studied pressure categories exhibited rather poor discrimination efficiency, but corresponding AUCs (i.e. 0.66 +/- 0.01) still indicated substantial benefit provided by the simultaneous consideration of several trait-based metrics in risk assessment (Philibert *et al.* 2011), despite the necessity of further work to enhance the efficiency of corresponding pressure category detection.

The robustness of CTF models was better (i.e. higher p-values obtained when comparing AUCs from OOB and test data sets) for WQ than HD pressures. However, HD parameters were evaluated only one time during the study period for each reach, in contrast to WQ parameters measured for each sampling date. As a result, a stable HD status and a temporally variable WQ status were assigned to each river reach, potentially leading to an over-fitting of CTF models to the HD data.

4.4.2 – Multi-traits for investigating multi-pressure scenarii

The utilization of trait categories in benthic communities exhibited a mean coefficient of variation (CV) of only 0.20 (+/- 0.12) in the LIRRs, whereas the other trait-based metrics exhibited a slightly higher variability (CV = 0.55 +/- 0.83). This relative stability of bio-ecological trait profiles of benthic communities at large scale in least impacted river reaches is consistent with previous observations (Charvet *et al.* 2000; Statzner *et al.* 2001; Archaimbault *et al.* 2005; Statzner & Bêche 2010), then supporting their utilization in ERA at such large spatial scale.

Some individual adaptations (described by different bio-ecological trait categories) in benthic communities might ensure the success of an organism in the face of different pressure categories (Schäfer *et al.* 2011); e.g. many trait categories (including ovoviviparity, polyvoltinism and several trait categories related to trophic status, saprobity, temperature preferences or salinity tolerance) significantly respond to a high number of anthropogenic pressures (Mondy *et al.* 2012). The simultaneous consideration of a large number of bio-ecological adaptations (i.e. reflecting the natural complexity of biological adaptations) have been anticipated to be an ecologically sound and efficient approach to disentangle multi-pressures in aquatic systems (e.g. Archaimbault *et al.* 2010; Statzner & Bêche 2010). Results obtained in this large scale study

confirmed that, with adapted statistical procedures (e.g. CTFs), macroinvertebrate trait-based metrics are able to efficiently identify specific pressure categories related to water quality or habitat degradation (Table 4.III), even in a multi-pressure context.

One of the advantages of the RF and CTF approaches, is their ability to quantify the importance of each predictive variable (here trait-based metrics) included in the model (Strobl *et al.* 2007). Based on such measure, the quantification of ecological strategies selected by assemblages in response to each pressure should be possible. Benthic communities displayed suites of traits that were globally independent between pressure categories ($|r| = 0.10$), supporting their ability to disentangle the effects of different anthropogenic pressures (e.g. Statzner & Bêche 2010), except for 'nitrates' and 'clogging risk'. Indeed, the high correlation between the importance of trait-based metrics in the two corresponding CTFs ($r = 0.72$) seemed to indicate the high similarities of trait combinations selected by benthic communities subjected to these two pressure categories. If clogging risk quantification, based on erosion, drainage and runoff potentials (cf. Mondy *et al.* 2012) and nutrient inputs are closely related to intensive agriculture pressure in the watershed (Sarriquet, Bordenave & Marmonier 2007), the similar biological response to 'nitrates' and 'clogging risk' probably more reflected the frequent co-occurrence of these two pressures (Cohen's Kappa = 0.45) than similar selective pressures of 'clogging risk' and 'nitrates' on benthic community biotrait combinations.

A potential explanation for the relatively lower efficiency of trait-based CTF models developed in ERA when compared to trait-based RFs used in PRA studies could be related to the multi-pressure context of rivers (e.g. Preston & Shackelford 2002; Comte *et al.* 2010). Each CTF model was built to detect changes in community trait-based metrics in response to a given anthropogenic pressure. However, this pressure did not act alone on benthic assemblages. The combined effects of cocktails of pressures on benthic communities are difficult to predict and highly depend on the nature and intensity of the pressures acting simultaneously (e.g. Preston & Shackelford 2002; Crain, Kroeker & Halpern 2008) because of (i) potential interactions between the pressures themselves (e.g. speciation of chemical contaminants can lead to different proportions of more or less toxic forms according to pH) or (ii) the context dependence of organisms responses (e.g. increasing gill activity alleviates low oxygen availability, but potentially

increases metal uptake). The detailed investigation of all the potential interactions among the 16 investigated pressures is beyond the scope of this study, but should be kept in mind when interpreting results.

Despite the complexity of predicting the nature of the interactions between pressures, previous works seemed to indicate that, at community level, the dominant type of between-pressure interaction could be antagonistic (Crain *et al.* 2008; Townsend *et al.* 2008). In that case, pressure interactions could decrease the individual impact of some pressure categories on invertebrate assemblages, potentially leading to a reduced efficiency of the models designed to detect such pressure categories.

4.5 – Conclusion

Bonada *et al.* (2006) listed twelve criteria to characterize 'ideal' biomonitoring tools (Table 1-1), and considered that multiple biological trait approaches fulfil 10 of the 12 criteria including (i) a sound ecological rationale (the habitat templet, Southwood 1977; Townsend & Hildrew 1994), (ii) a link with ecological functions (e.g. Vandewalle *et al.* 2010) and (iii) the discrimination of different types of human impact (e.g. Statzner *et al.* 2001; Mondy *et al.* 2012). However, the proofs of a reliable indication of changes for different types of human impacts (i.e. the diagnostic ability) and a clear, monotonous relationship with human impact (criteria XI and XII, respectively) remain to be demonstrated (Bonada *et al.* 2006). This study has brought out some evidence that macroinvertebrate trait-based CTFs fulfil, at least partially, the eleventh criteria of Bonada *et al.* (2006) "allowing to efficiently identify some pressure categories". The efficiency of the models is promising (i.e. models performed better than the random allocation of reaches), but has still to be enhanced, at least for the four pressure categories corresponding to the less efficient models, before a large scale utilization of this type of diagnostic tool could be proposed to river managers. Despite the apparent complexity of the construction of CTF models, the produced outputs (i.e. IP) are responses that can be easily communicated to river managers (Figure 4-1).

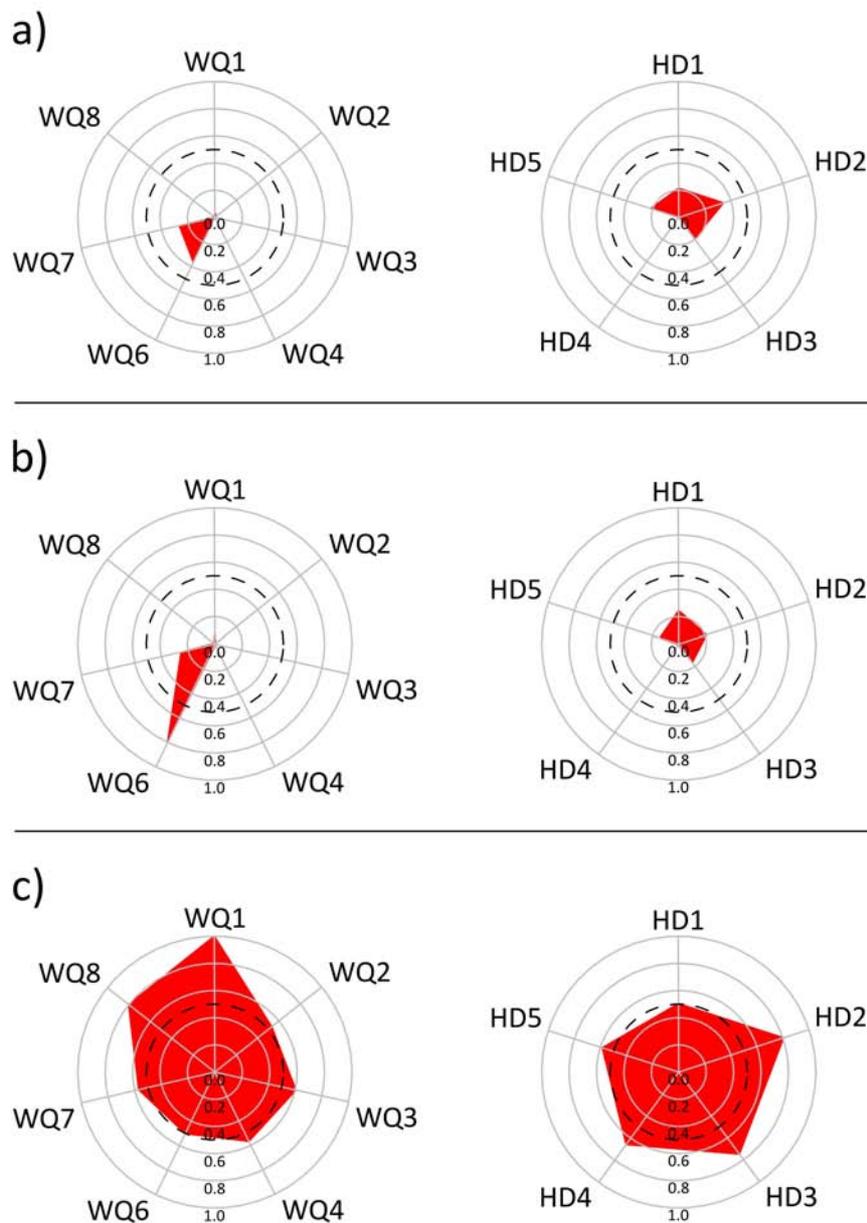
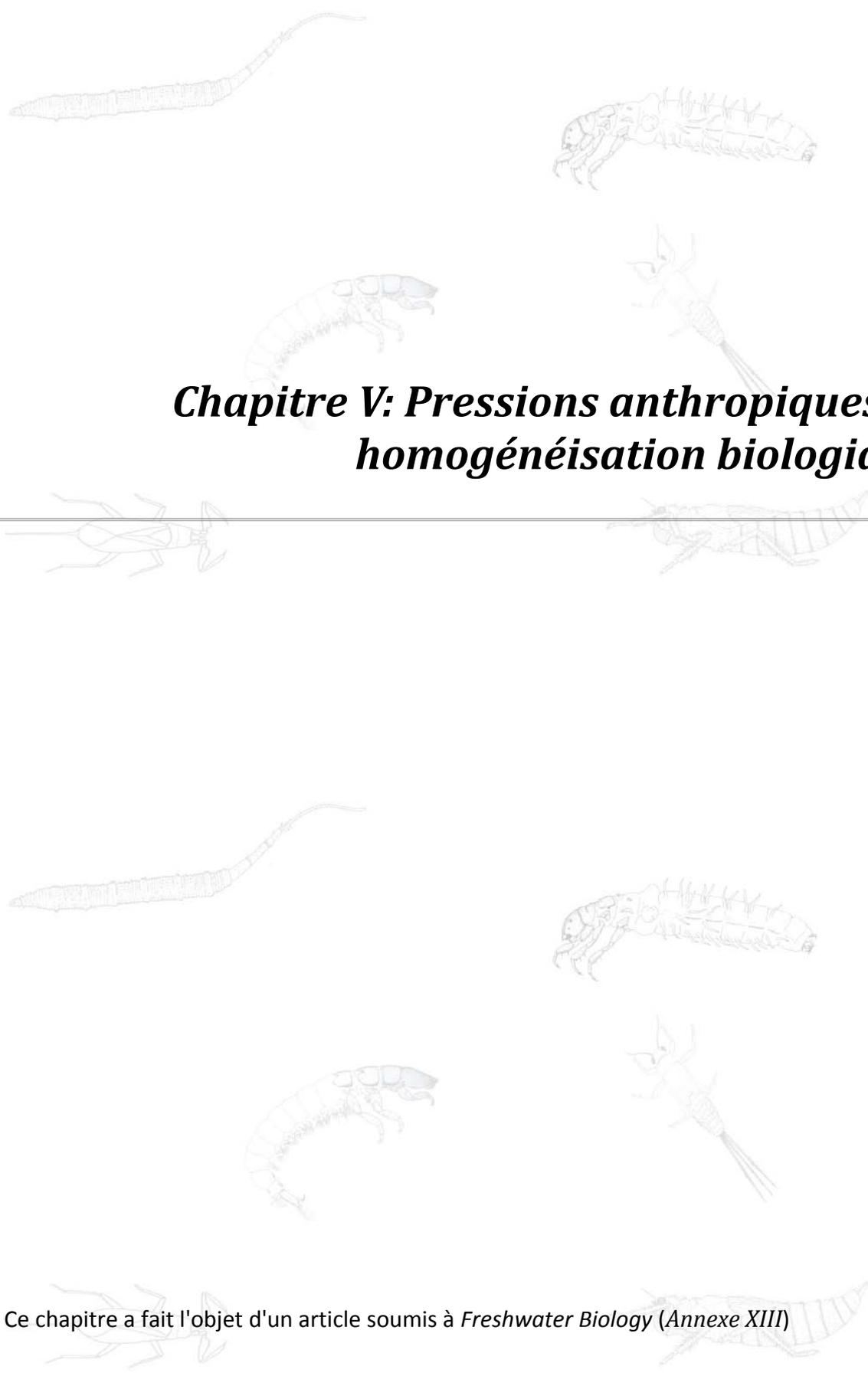


Fig. 4-1. Graphical output of the diagnostic tool applied to three reaches (a, b and c). Radial plots were built from impairment probabilities provided by the seven water quality (WQ) and the five habitat degradation (HD) conditional tree forest models exhibiting good efficiency ($AUC \geq 0.70$). Black dashed circle represent the lower value beyond which impairment probability is considered as significant (i.e. $IP = 0.5$).

The presented radial plots correspond to the results obtained for three reaches, with the twelve CTF models exhibiting at least good efficiency. Macroinvertebrate communities indicated that none of these twelve pressure categories seemed to impact reach (a), whereas one WQ pressure category (i.e. pesticide contamination) seem to impact reach (b). The impairment pattern was much more complex in reach (c) where WQ1, WQ8, HD2, HD3 and HD4 were simultaneously acting.

According to the WFD, the ecological quality of river reaches should not be only assessed via benthic macro-invertebrate assemblages but has also to consider informations provided by other biological quality elements (BQEs), namely diatoms, macrophytes and fish (cf. Annex V in European Council 2000). A future promising direction should be to combine biotraits of all these different BQEs, taking into account (i) the different sensitivity to - and potentially contrasted effects of - pressure categories on each of these groups (e.g. Feio *et al.* 2007; Marzin *et al.* 2012) and (ii) the different time scales with which such BQEs respond to - and recover from - anthropogenic pressures (see Hering *et al.* 2006b, and Table 1 in Culp *et al.* 2011). This important future research step, may improve the performances and robustness of models identifying significantly acting pressures (Clews & Ormerod 2009) on biotic communities under multiple pressure scenarii. However, it will need first to collate existing ecological information varying in format, quality, trait description and coverage, which precludes the merging and comparison of different databases needed to further develop and validate multi-BQEs trait-based diagnostic tools.



***Chapitre V: Pressions anthropiques et
homogénéisation biologique***

Ce chapitre a fait l'objet d'un article soumis à *Freshwater Biology* (Annexe XIII)

Résumé

L'homogénéisation fonctionnelle (« functional homogenization » = FH) est un problème majeur dans l'étude des effets des actions humaines sur la biodiversité. Cette homogénéisation a souvent été attribuée à un rôle non aléatoire des modifications anthropiques des habitats. Toutefois, la description du niveau de spécialisation des taxons (un estimateur approprié pour l'étude de l'homogénéisation fonctionnelle) a souvent été limitée à un codage binaire pour une ressource donnée (i.e. 'utilisation' ou 'non utilisation') malgré un continuum évident du niveau de spécialisation des taxons pour de multiples ressources. De plus, le caractère non aléatoire de la relation entre le niveau de spécialisation des communautés et les altérations anthropiques des habitats n'a que rarement été testé en tant que tel.

Dans ce chapitre, nous proposons un cadre conceptuel basé sur le codage flou des traits bio-écologiques permettant le calcul d'un nouvel indice continu de la spécialisation potentielle pour un grand nombre de taxons et d'écosystèmes. L'utilisation de cet indice est illustrée ici avec dix traits « eltoniens » et onze traits « grinnelliens » des invertébrés benthiques. Nous avons plus particulièrement testé (i) le caractère significatif des relations observées entre la spécialisation des communautés et deux types d'altération de la qualité de l'eau (acidification et contamination organique) à un niveau local et (ii) le caractère non aléatoire de ces relations.

Les gradients d'altération de la qualité de l'eau permettent d'expliquer, au travers d'effets non aléatoires, une part relativement importante de la variabilité observée dans les niveaux de spécialisation des communautés : en moyenne pour les 21 traits étudiés, 20 % de la variabilité pouvait être expliquée par le gradient d'acidification et 55 % par le gradient de contamination organique. Si la plupart de ces relations décrivent une homogénéisation fonctionnelle (i.e. un niveau de spécialisation décroissant avec l'intensité de l'altération), une augmentation des niveaux de spécialisation a également été observée pour quelques traits « eltoniens ».

Nous avons confirmé l'importance de l'utilisation d'indicateurs de l'homogénéisation fonctionnelle calculés au niveau de la communauté dans les études sur les effets des pressions

anthropiques sur la biodiversité. L'aspect multidimensionnel de notre approche de la spécialisation écologique semble une stratégie très prometteuse, car elle permet la mise en évidence des effets de l'altération des habitats sur les communautés en identifiant des patrons de spécialisation spécifiques. De plus, nous avons montré que l'intensité de l'homogénéisation fonctionnelle semblait dépendre d'un compromis entre les effets 'directs' et 'indirects' de l'altération de l'habitat.

5.1 – Introduction

Biotic homogenization (BH) is a serious threat to ecosystems, occurring in a wide range of taxonomic groups (e.g. plants Rooney *et al.* 2004; birds Lockwood, Brooks & McKinney 2000 or fish Rahel 2000). Olden *et al.* 2004 identified three components of BH: genetic (GH), taxonomic (TH) and functional (FH) homogenization. TH (i.e. the increasing similarity in taxonomic composition) has been the most extensively investigated component of BH (McKinney & Lockwood 1999). However, several authors have demonstrated that TH may be an incomplete descriptor of biodiversity loss (e.g. Clavel, Julliard & Devictor 2010). Indeed, under intermediate stress level (i.e. when the stress is not strong enough to promote the complete extinction of native populations), introduced or expanding species could inflate taxonomic diversity measures (e.g. Rahel 2002), leading to an underestimation of BH in contrast with FH measures (e.g. Devictor & Robert 2009; Abadie *et al.* 2011).

The FH concept is straightly linked to the niche concept (Hutchinson 1957), one of the corner-stone of theoretical ecology. The ecological niche could be seen as the hypervolume a species can occupy (i.e. the fundamental niche) or actually live in (i.e. the realized niche) in a multidimensional space where each of the dimensions represents an ecological factor (abiotic or biotic) interacting with the species. Devictor *et al.* (2010) recommended to distinguish two dimensions of the ecological niche in FH studies: i) the Grinnellian dimension corresponding to the species requirements, i.e. (a)biotic conditions necessary for species survival (Grinnell 1917) and ii) the Eltonian dimension, corresponding to the adaptations (e.g. in terms of morphology, feeding habits) selected by the species to fit their environment (Elton 1927).

The measure of ecological niche width or breadth, the so-called 'ecological specialization' (Futuyma & Moreno 1988), is a convenient proxy for studying FH (Clavel *et al.* 2010). However, in most of studies investigating FH, species are only considered as 'specialist' or 'generalist' for a given resource despite an obvious continuum of species specialization level for several resources (Devictor *et al.* 2008). Moreover, according to the (i) taxonomic group (e.g. plants vs animals), (ii) biological level (individual, population, species or community) and (iii) spatial scale, a large number

of specialization metrics exists with different potential interpretations according to the investigated ecological mechanism, causing some confusion that should be clarified in ecological studies (Devictor *et al.* 2010).

The trait-based approach has recently emerged as a powerful tool for studying mechanisms structuring plant (e.g. Ackerly & Cornwell 2007; Jung *et al.* 2010) or benthic invertebrate (e.g. Townsend & Hildrew 1994; Townsend *et al.* 1997; Poff 1997) communities. The potential of this approach is so important that McGill *et al.* (2006) have appealed to refund community ecology from the trait perspective.

Bio-ecological traits are variables describing biological attributes of species (i.e. the Eltonian dimension of ecological niche; e.g. Resh *et al.* 1994; Statzner & Bêche 2010) or reflecting species-habitat relationships (i.e. the Grinnellian dimension of ecological niche; e.g. Usseglio-Polatera *et al.* 2000b; Usseglio-Polatera *et al.* 2001; Vieira *et al.* 2006). Bio-ecological traits were used for elucidating the filtering role of habitat on the fauna and flora (e.g. Resh *et al.* 1994). Simultaneously considering a high number of taxa (e.g. 548 plant and animal species in Statzner *et al.* 1994a) highlighted the necessity to homogenize biological information, e.g. using the fuzzy coding approach (Chevenet *et al.* 1994). This approach has allowed information from various sources of data to be synthesized (e.g. literature, expert-advice) and uncertainty (e.g. phenotypic variability, ontogenic changes) for continuous and discrete traits to be described with a unique variable (the 'biotrait') resolved into several categories. In the two last decades, fuzzy-coded biotraits have demonstrated their pertinence and usefulness for studying the impact of anthropogenic stressors on benthic invertebrate assemblages (e.g. Dolédec *et al.* 1999; Charvet *et al.* 2000; Usseglio-Polatera & Beisel 2002; Gayraud *et al.* 2003; Liess & von der Ohe 2005; Archaimbault *et al.* 2010).

Very little attention has been focused on BH in freshwater macroinvertebrates in contrast to other taxonomic groups (but see Loughheed *et al.* 2008), e.g. plants (e.g. Smart *et al.* 2006; Abadie *et al.* 2011); birds (e.g. Lockwood *et al.* 2000; Devictor *et al.* 2008) or fish (e.g. Rahel 2000). However, this group plays a major role in stream functioning (e.g. Wallace & Webster 1996) and many invertebrate species invasions (e.g. Devin *et al.* 2005; Grabowski, Bacela & Konopacka 2007)

or extirpations (e.g. Doi, Takagi & Kikuchi 2007b; Friberg *et al.* 2010) have been reported as direct consequences of human activities.

In this paper, we focused on FH at local scale, where species extirpation could be of major importance (e.g. Rahel 2002; Abadie *et al.* 2011), in contrast with large scale studies where species invasion is supposed to be the primary driver of BH (e.g. Qian & Ricklefs 2006 ; Spear & Chown 2008). We designed both a new biotrait-based taxon specialization index (TSI') and a community specialization index (CSI') derived from the CSI of Julliard *et al.* (2006). We used the new CSI' to test, in local macroinvertebrate communities from small streams of North-eastern France, the following hypotheses: (H1) FH processes occur when streams are subjected to anthropogenic habitat alteration related to water quality (e.g. acidification or organic contamination) and (H2) FH results from non random action of anthropogenic habitat alteration, favouring generalist taxa in impaired systems (McKinney & Lockwood 1999; Smart *et al.* 2006).

5.2 – Material & Methods

5.2.1 – Study sites

Six reaches from six low order streams (Strahler's rank: 1-2) were studied in the piedmont of the sandstone part of the Vosges mountains (North-Eastern France, Fig. 2-4). All the reaches belong to the same stream type (TP4 in Wasson *et al.* 2002; Chandesris *et al.* 2006) and, except for water quality (hereafter WQ), exhibited similar environmental conditions (Table 2-VII). Reaches were classified in three sets: a 'reference' set (Maix: *ref1* and Plaine: *ref2*), an 'acidified' set (Ravines: *acid1* and Gentil Sapin: *acid2*) and an 'organic' set (Bièvre: *orga1* and Blette: *orga2*).

5.2.2 – Water chemistry

Reaches were sampled every four weeks from March 2009 to April 2010, except during the December 2009 - February 2010 due to difficulties in reach accessibility. For each sampling date (except in August 2009) and each reach, water quality was characterised using twenty physico-chemical parameters (cf. §2.2.2).

5.2.3 – Faunal sampling

For each 'reach x sampling date', faunal samples were performed in triplicates with a standardized Surber net (1/20 m²; 500 µm mesh-size) on gravels (2-16 mm), i.e. the dominant bottom substrate shared among the three reach benthic mosaics. Samples were fixed *in situ* with 3% formaldehyde. Samples were sorted and invertebrates were identified at genus level [except for Oligochaeta, some Diptera (mainly family level), Trichoptera Limnephilidae, Coleoptera Dytiscidae and Hydrophilidae (sub family level); i.e. norm XP T 90-388 in AFNOR 2010 (cf. Table 2-V)] and counted.

5.3 – Data analyses

Two principal component analyses (PCAs) were performed on water chemistry data from reference reaches and reaches from either the acidified set or the organic set (40 water samples x 20 parameters).

Correspondence Analysis (CA) was applied on the faunal data array (216 samples x 97 taxa). The percentage of variance explained by the 'sampling date' was quantified with a 'between-dates' CA. The significance of the 'sampling date' effect was tested with a Monte-Carlo permutation test (9999 permutations).

5.3.1 – Functional Homogenization

5.3.1.1 - Biotraits

Eltonian biotraits (10 biotraits; Table 5-I) described the adaptations of taxa for optimally fitting the environment characteristics of their habitat. They included descriptors of the life cycle of taxa (e.g. life cycle duration), as well as physiological or behavioural aspects of their life history (e.g. feeding habits). Grinnellian biotraits (11 biotraits; Table 5-I) gathered large- (e.g. longitudinal distribution), intermediate- (e.g. transversal distribution) or small-scale (e.g. mesohabitat preferences) descriptors of the 'spatial niche' of taxa, descriptors of their food requirements and

of their sensitivity to specific stressors [e.g. organic contamination (via saprobity), acidification (via low pH sensitivity), eutrophication (via river trophic status preferences)].

Table 5-1. Eltonian and Grinnellian traits used in this study (cf. Tables 2-XI and 2-XII for further details)

Eltonian traits	Grinnellian traits
Maximal size (cm)	Transversal distribution
Life span (year)	Longitudinal distribution
Number of reproductive cycles per year	Altitude
Aquatic stages	Substrate
Reproduction technique	Food
Dispersal	Current velocity
Resistance forms	Trophic status
Respiration mode	Salinity
Locomotion or substrate relation	Temperature
Feeding habits	Saprobity
	Low pH tolerance

Biotraits, resolved in different semi-quantitative (e.g. 'maximal potential size' or 'number of cycles per year') or qualitative (e.g. 'respiration' or 'reproduction techniques') categories (Usseglio-Polatera *et al.* 2000a), were fuzzy-coded (Chevenet *et al.* 1994). Fuzzy-coding consists in assigning to each taxon a score describing its affinity to each trait category, from '0' indicating 'no affinity' to '5' indicating 'high affinity' (see Chevenet *et al.* 1994 for further details) These affinity scores describe the actual frequency of trait category utilization by the taxa (summarizing published data and expert advices) and its uncertainty (e.g. related to phenotypic plasticity and/or ontogenic changes). For each 'taxon x biotrait', the affinity scores were then transformed in relative utilization frequency distribution by dividing the taxon affinity scores for the categories of a biotrait by their sum.

5.3.1.2 – Specialization index

For each recorded taxon and each biotrait, we calculated a taxon specialization index (TSI) following equation [1].

$$TSI_{ti} = \sum c_{tik}^2 / (\sum c_{tik})^2 \quad [1]$$

with TSI_{ti} the specialization index for the biotrait i of the taxon t and c_{tik} the relative utilization of the category k from the biotrait i by the taxon t .

A true specialist taxon (i.e. using only one trait category, e.g. taxon a in Table 5-II) is characterized by a maximal specialization score (i.e. 1.00). However, a true generalist taxon (i.e. evenly using all the trait categories, e.g. taxon c in Table 5-II) exhibits a low TSI score, but different from zero. Indeed, the minimal TSI value is $1/k$ with k being the number of categories of the trait.

Table 5-II. Taxon Specialization Index (TSI and TSI'): illustration of the index calculation with three taxa exhibiting contrasted trait profiles. See text for further details.

Taxon	Relative utilization of trait categories				Specialization indices	
	c1	c2	c3	c4	TSI	TSI'
a	0.00	1.00	0.00	0.00	1.00	1.00
b	0.10	0.50	0.30	0.10	0.36	0.15
c	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.00

Because the TSI minimal value depends on the number of categories describing a biotrait, the TSI score seemed to overestimate the specialization level of a taxon, especially when the number of categories is low. To obtain a non-biased estimator of the specialization level of a species bounded between 0 (for true generalists) and 1 (for true specialists), we designed an adjusted specialization index: TSI' (equation [2]).

$$TSI'_{ti} = (TSI - 1/k) / (1 - 1/k) \quad [2]$$

Then, we calculated the 21 community specialization indices (CSI') by averaging the individual taxon TSI', weighted by their respective log-transformed abundances (equation [3]).

$$CSI'_i = \sum (TSI'_{ti} * w_t) / \sum w_t \quad [3]$$

with w_t the log-transformed abundance of taxon t in the studied community.

5.3.2 – Null models

5.3.2.1 – Random community generation

We used a null model approach to compare the specialization level of the assemblages observed *in situ* (CSI' for 10 Eltonian and 11 Grinnelian biotraits) to those obtained for randomly assembled communities.

In near natural conditions, the six reaches should share similar benthic communities because belonging to the same stream type (Wasson *et al.* 2002). In randomly assembled communities, the individuals recorded in the observed assemblage matrix (samples x taxa; matrix O) were randomly assigned to the random community matrix (matrix E) cells with probabilities proportional to the matrix O row (i.e. samples) and column (i.e. taxa) total abundances, until the *in situ* total abundances were reached for each row and column of matrix E (IT algorithm in Ulrich & Gotelli 2010). This approach took into account differences that may exist (i) in carrying capacity among samples (i.e. row totals) and (ii) in occurrence among taxa (i.e. column totals).

The IT algorithm was applied (i) on the whole community matrix (216 samples x 97 taxa) or (ii) independently on each of the twelve sub-matrices corresponding to individual sampling dates (18 samples x 97 taxa, per date), considering a significant effect of sampling date on the faunal composition of invertebrate assemblages (option ii) or not (option i).

5.3.2.2 – Deviation from null expectations

For each sample (observed or randomly assembled), the 10 Eltonian and the 11 Grinnellian CSI' were calculated. We also measured for each sample and each CSI', the corresponding standardized effect size (Gotelli & McCabe 2002) as:

$$CSI'_{SES} = (obs - \mu_{null}) / \sigma_{null} \quad [5]$$

where, for a given index, *obs* was the observed value; μ_{null} and σ_{null} were the mean and the standard deviation of the null distribution, respectively. The CSI'_{SES} quantified the direction – lower (< 0) or higher (>0) than the null distribution average – and magnitude (in units of standard deviation) of the deviation of each sample from the null distribution.

5.3.3 – Functional homogenization with water quality gradients

To test if FH occurred along WQ gradients (H1), we used a non-linear regression approach: i.e. generalized additive models (GAMs; equation [6]). In contrast with more conventional regression methods, we did not need to assume a specific shape for the CSI' distribution along the WQ gradient, GAMs allowing the use of arbitrary, smooth distributions (Yuan 2004).

$$CSI' = s_0 + s(WQ) + \varepsilon \quad [6]$$

with CSI' the community specialization index, s_0 an additive constant, $s()$ the non-parametric smoothing function (here, a regression spline with 2 df), WQ the water quality gradient (related to acidification or organic contamination in our study cases) and ε the residual error.

Forty-two models (21 biotraits x 2 WQ gradients) were built. Applying the Bonferonni alpha-inflation correction method, the level of statistical significance adopted was $\alpha = 0.05/42$.

We considered that FH occurred in communities when models corresponded to a significant negative relationship between CSI' and the WQ gradient (H1). We also considered the observed

relationship between CSI' and a given WQ gradient as 'non randomly' obtained (H2), if this relationship was still significant when considering CSI'_{SES} instead of CSI'.

5.4 – Results

5.4.1 – Water quality

The reaches were distributed along the first principal component (PC1 in Figure 5-1) of each of the PCA_{acid} and PCA_{organic} analyses according to WQ gradient; the second principal component (PC2), mainly reflecting within-reach variability. Because the first factorial axes explained 36.59% (PCA_{acid}) and 59.25% (PCA_{organic}) of the total variance in PCAs, they were used as proxies of the two WQ gradients.

5.4.2 – Faunal composition

The 'sampling date' effect explained a low but significant part of the CA inertia: 8.41% (Monte-Carlo p-value = 0.0091). As a result, the null IT algorithm was applied independently on each sub-matrix corresponding to each sampling date [option (ii) in §5.3.5.1].

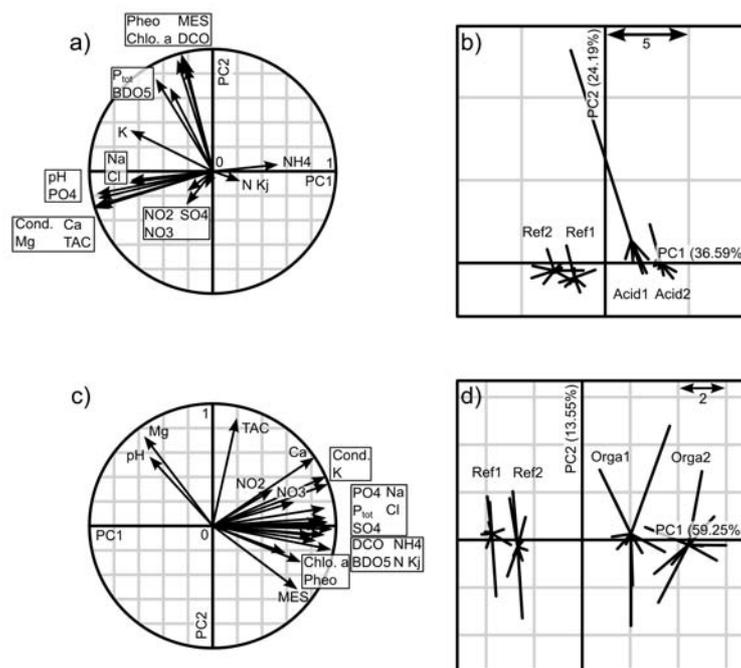


Figure 5-1. Ordination of water samples with two Principal Component Analyses (PCAs) performed on 20 water quality parameters for (i) the acidification gradient (a & b) and (ii) the organic contamination gradient (c & d). a & c) correlation circle giving the correlations of the 20 physico-chemical parameters with the two first principal components of each PCA (PC1 and PC2); b & d) first factorial plane of each PCA giving the location of the 40 water samples grouped by reach. Each reach was located at the weighted average (i.e. the centre of the star) of its corresponding samples. Explained variance was indicated for each of the two first principal components.

5.4.3 – Relationship between community specialization and WQ gradient

Results of the GAMs built from CSI' were summarized in Table 5-III. A significant relationship was found between CSI' and acidification for five Eltonian and seven Grinnellian biotraits. Corresponding models explained between 11.18% (aquatic stages) and 68.55% (pH preferendum) of the deviance. For all the tested biotraits, CSI' exhibited a significant relationship with the organic contamination gradient, explaining between 11.05% (resistance forms) and 85.77%

(locomotion and substrate relationship) of the deviance. The 21 'organic' models globally explained a significantly higher part of the variability (mean \pm sd = 55.49% \pm 23.88) than the "acidification" models (20.57% \pm 19.41) (paired Wilcoxon rank sum test, $p = 4.10 \times 10^{-05}$).

Table 5-III. Characteristics of the generalized additive models (GAMs) built from observed community specialization levels (CSI').

	Acidification		Organic contamination	
	Deviance explained (%)	p-value	Deviance explained (%)	p-value
Eltonian biotraits				
Aquatic stages	11.18	0.001(*)	24.81	5.7 10 ⁻⁰⁸ (*)
Dispersal	39.22	2.3 10 ⁻¹³ (*)	70.67	6.8 10 ⁻³² (*)
Feeding habits	1.68	0.3711	34.27	2.2 10 ⁻¹¹ (*)
Life cycle duration	1.67	0.3728	17.34	1.5 10 ⁻⁰⁵ (*)
Locomotion and substrate relation	6.59	0.0185	85.77	2.9 10 ⁻⁵⁰ (*)
Maximal potential size	39.39	1.9 10 ⁻¹³ (*)	84.60	3.0 10 ⁻⁴⁸ (*)
Potential number of cycles per year	5.59	0.0345	56.74	5.2 10 ⁻²² (*)
Reproduction	17.39	1.4 10 ⁻⁰⁵ (*)	59.10	1.9 10 ⁻²³ (*)
Resistance forms	10.07	0.0020	11.05	0.0011(*)
Respiration	26.92	1.1 10 ⁻⁰⁸ (*)	51.01	7.4 10 ⁻¹⁹ (*)
Grinnellian biotraits				
Altitude	20.69	1.3 10 ⁻⁰⁶ (*)	61.91	3.0 10 ⁻²⁵ (*)
Current velocity (preferendum)	46.78	9.4 10 ⁻¹⁷ (*)	67.98	1.2 10 ⁻²⁹ (*)
Food	20.80	1.2 10 ⁻⁰⁶ (*)	29.43	1.4 10 ⁻⁰⁹ (*)
Longitudinal distribution	5.27	0.0422	83.53	1.5 10 ⁻⁴⁶ (*)
pH (preferendum)	68.55	4.1 10 ⁻³⁰ (*)	60.15	4.2 10 ⁻²⁴ (*)
Salinity (preferendum)	3.40	0.1326	84.64	2.6 10 ⁻⁴⁸ (*)
Saprobity	13.33	0.0002(*)	46.50	1.3 10 ⁻¹⁶ (*)
Substrate (preferendum)	37.74	9.1 10 ⁻¹³ (*)	65.49	9.3 10 ⁻²⁸ (*)
Temperature (preferendum)	50.89	8.6 10 ⁻¹⁹ (*)	23.96	1.1 10 ⁻⁰⁷ (*)
Transversal distribution	0.80	0.6243	62.72	8.5 10 ⁻²⁶ (*)
Trophic status (preferendum)	3.93	0.0957	83.56	1.4 10 ⁻⁴⁶ (*)

(*) significant relationship

Results of the GAMs built from CSI'_{SES} were summarized in Table 5-IV. For each biotrait and each alteration category (acidification or organic contamination), the shape of the relationship between CSI'_{SES} and WQ gradient was similar to that of the relationship observed between CSI' and WQ gradient (e.g. Fig. 5-2).

Three models, based on Eltonian biotraits, were significant along the acidification gradient, when built with both CSI' and CSI'_{SES} (Fig. 5-2). Two models were significant only when built with CSI' and two others were significant only when built with CSI'_{SES} (Tables 5-III and 5-IV).

Table 5-IV. Characteristics of the generalized additive models built from deviations of the observed community specialization levels from null expectations (CSI'_{SES}).

	Acidification		Organic contamination	
	Deviance explained (%)	p-value	Deviance explained (%)	p-value
Eltonian biotraits				
Aquatic stages	7.44	0.0108	28.02	4.5 10 ⁻⁰⁹ (*)
Dispersal	31.41	2.6 10 ⁻¹⁰ (*)	50.93	8.2 10 ⁻¹⁹ (*)
Feeding habits	3.66	0.1127	24.10	9.8 10 ⁻⁰⁸ (*)
Life cycle duration	29.00	2.0 10 ⁻⁰⁹ (*)	18.73	5.4 10 ⁻⁰⁶ (*)
Locomotion and substrate relation	5.57	0.0351	73.08	4.5 10 ⁻³⁴ (*)
Maximal potential size	29.65	1.2 10 ⁻⁰⁹ (*)	72.69	1.1 10 ⁻³³ (*)
Potential number of cycles per year	4.89	0.0533	60.88	1.4 10 ⁻²⁴ (*)
Reproduction	7.17	0.0129	58.62	3.9 10 ⁻²³ (*)
Resistance forms	15.10	6.9 10 ⁻⁰⁵ (*)	13.15	0.0003(*)
Respiration	18.60	5.9 10 ⁻⁰⁶ (*)	49.65	3.7 10 ⁻¹⁸ (*)
Grinnellian biotraits				
Altitude	12.00	0.0006(*)	55.31	3.5 10 ⁻²¹ (*)
Current velocity (preferendum)	24.79	5.8 10 ⁻⁰⁸ (*)	60.56	2.3 10 ⁻²⁴ (*)
Food	19.01	4.4 10 ⁻⁰⁶ (*)	36.61	2.6 10 ⁻¹² (*)
Longitudinal distribution	9.70	0.0026	65.18	1.6 10 ⁻²⁷ (*)
pH (preferendum)	42.49	8.8 10 ⁻¹⁵ (*)	53.21	5.1 10 ⁻²⁰ (*)
Salinity (preferendum)	3.06	0.1623	69.58	5.9 10 ⁻³¹ (*)
Saprobity	1.99	0.3084	51.29	5.3 10 ⁻¹⁹ (*)
Substrate (preferendum)	16.75	2.2 10 ⁻⁰⁵ (*)	58.60	3.9 10 ⁻²³ (*)
Temperature (preferendum)	18.06	8.7 10 ⁻⁰⁶ (*)	25.59	3.1 10 ⁻⁰⁸ (*)
Transversal distribution	0.31	0.8324	54.69	7.7 10 ⁻²¹ (*)
Trophic status (preferendum)	3.29	0.1414	62.50	1.2 10 ⁻²⁵ (*)

(*) significant relationship

From the seven significant models built with Grinnellian CSI', six were still significant along the acidification gradient when using CSI'_{SES} (Fig. 5-3).

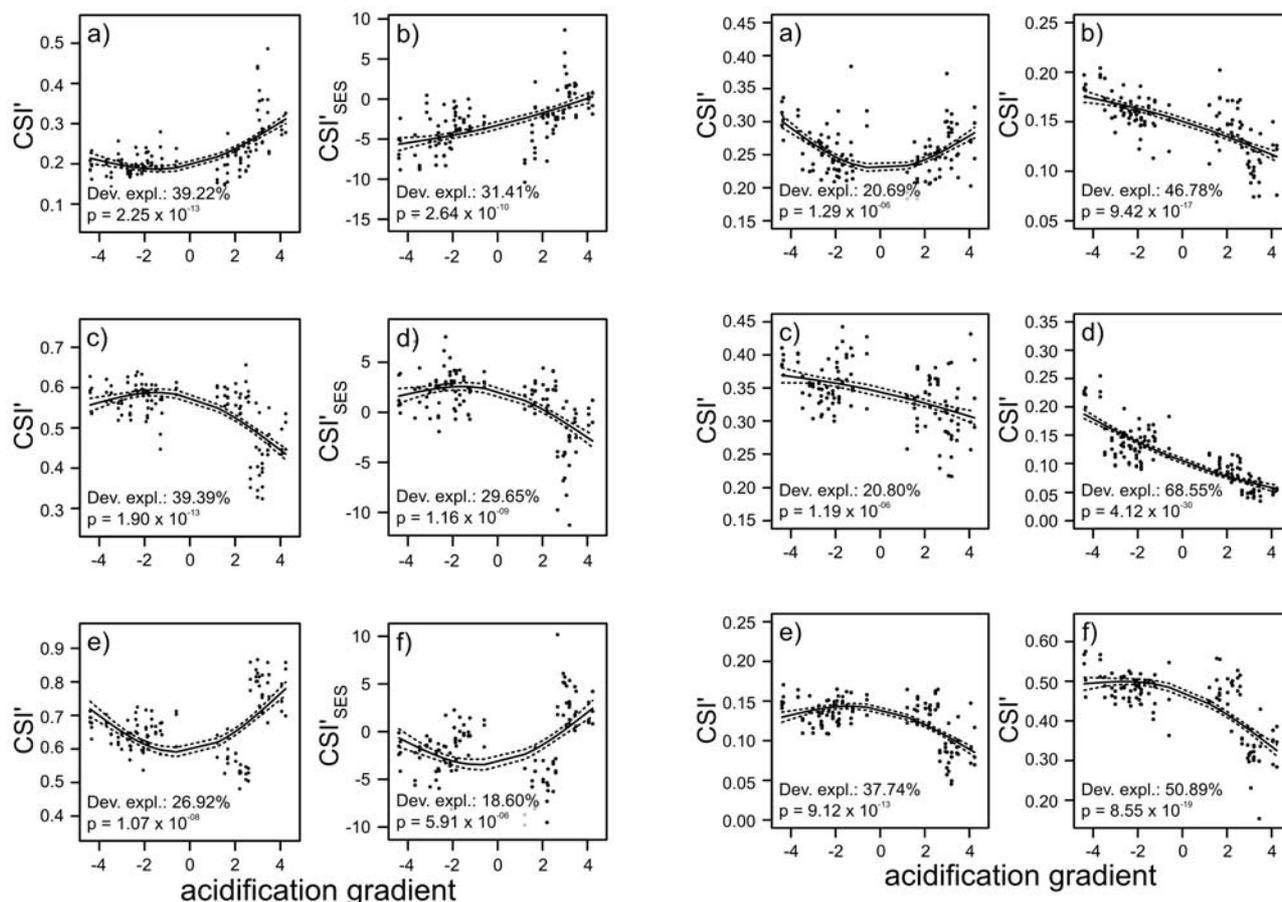


Figure 5-2. Modelling the observed community specialization (a, c, e) or deviation of community specialization from null expectations (b, d, f) along an acidification gradient for the Eltonian biotraits exhibiting significant and non-random relationship with the pressure gradient: (a, b) dispersal, (c, d) maximal potential size, (e, f) respiration techniques. Black solid lines and dotted lines correspond to predictions and 95% confidence intervals of generalized additive models (GAM), respectively. The percentage of explained deviance (Dev. expl.) and the p-value (p) were given in each case.

Figure 5-3. Modelling the observed community specialization along an acidification gradient for the Grinnellian biotraits exhibiting significant and non-random relationship with the pressure gradient: preferences in (a) altitude, (b) current velocity, (c) food, (d) pH, (e) substrate and (f) temperature. See text and the legend of Fig. 5-2 for further details.

All the models, from both Eltonian (Fig. 5-4) and Grinnellian (Fig. 5-5) biotraits, built regarding organic contamination gradient were still significant using CSI'_{SES} instead of CSI' (cf. Tables 5-III and 5-IV).

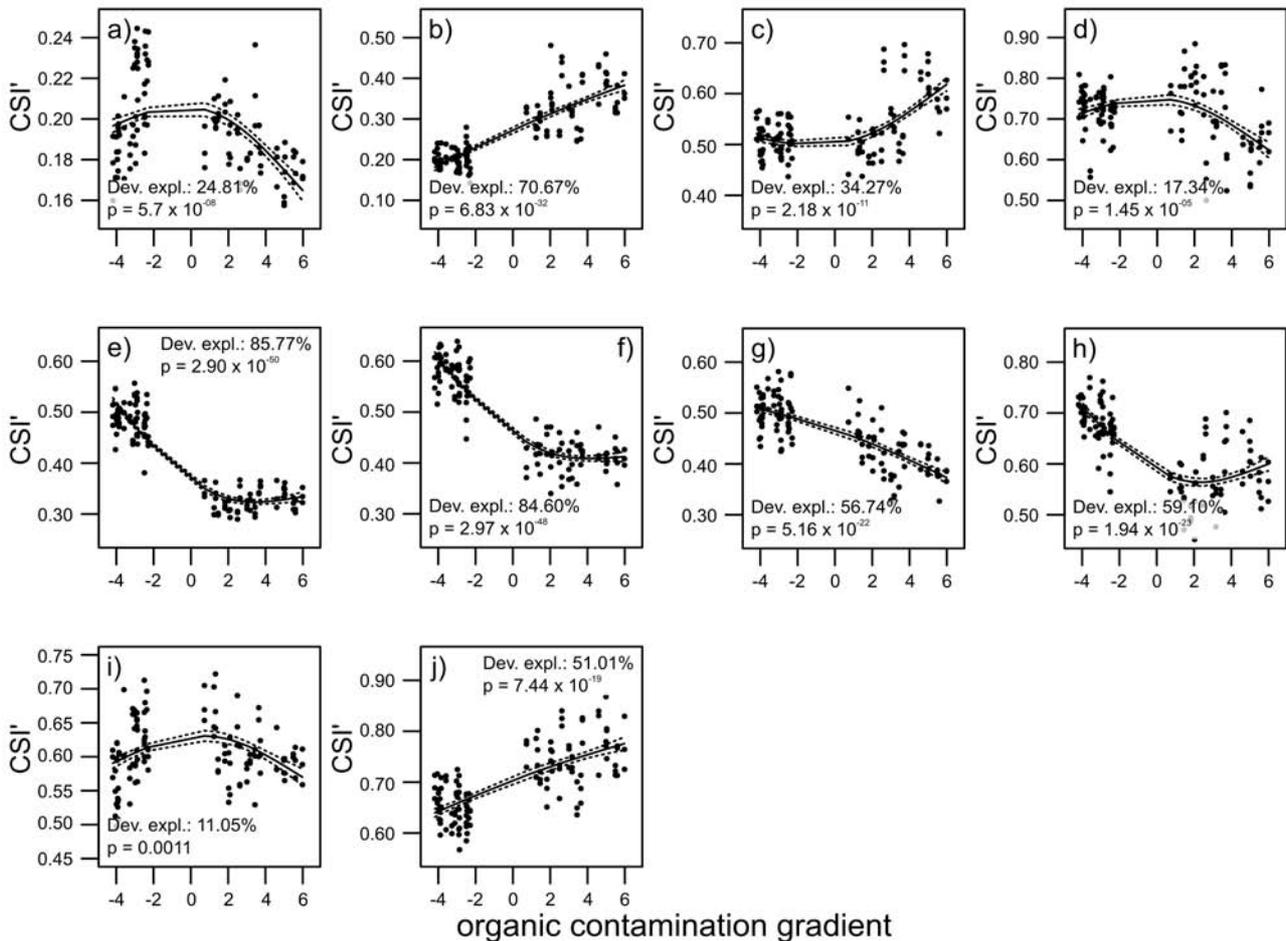


Figure 5-4. Modelling the observed community specialization along an organic contamination gradient for the Eltonian biotraits exhibiting significant and non-random relationship with the pressure gradient: (a) aquatic stages, (b) dispersal, (c) feeding habits, (d) life cycle duration, (e) locomotion and substrate relationship, (f) maximal potential size, (g) potential number of cycles per year, (h) reproduction techniques, (i) resistance forms and (j) respiration techniques. See text and the legend of Fig. 5-2 for further details.

5.5 – Discussion

BH has become a major concern in biodiversity studies (McKinney & Lockwood 1999; Olden & Rooney 2006), since it is much more community structure than community richness that defines the role of biological communities in ecosystem functioning (Clavero & Brotons 2010). BH was often described as resulting from a non-random effect of habitat alteration (e.g. McKinney & Lockwood 1999). This non-random action of the anthropogenic alteration of habitat on BH has been already demonstrated for TH (e.g. for birds, Lockwood *et al.* 2000), some families exhibiting a higher number of 'loser' species (i.e. preferentially lost species) than expected by chance whereas species from other families seemed to be more prone to invade or become dominant in altered systems (i.e. 'winner' species). Several authors (e.g. McKinney & Lockwood 1999; Lockwood *et al.* 2000) hypothesized that this non-random distribution of winner and loser species within taxonomic groups should be linked to the phylogenetically constrained clustering of biasing traits (e.g. body size, dispersal abilities) for a large set of taxa including birds, mammals, amphibians, insects and plants (cf. Table 2 in McKinney & Lockwood 1999). Habitat alteration should have a non-random role in the FH process, generalist taxa being favoured at the expense of specialized taxa (e.g. Futuyma & Moreno 1988; Smart *et al.* 2006; Devictor *et al.* 2008). However, to our knowledge, this study is one of the very first explicitly testing, with null models, the non-randomness of the relationship between community specialization level and anthropogenic habitat alteration. Our results confirmed that a great part of the observed relationship between CSI' and habitat alteration was the result of a non-random effect of habitat alteration. Indeed, the shape and the significance of the relationship between CSI' and the WQ gradient was maintained when considering the 'deviations from null expectations' instead of the 'raw values' of community specialization indices.

Acidification and organic contamination seemed to have rather different effects on community specialization level. Organic contamination had an important (about 55.5% of mean explained deviance), significant, and non-random effect on CSI' for all the studied biotraits (Tables 5-III and 5-IV, Figs 5-4 and 5-5). In contrast, acidification had a lower effect on CSI' (about 20% of mean explained deviance). This effect was significant for only 12 of the 21 biotraits and only nine

of these relationships were statistically non-random (Tables 5-III and 5-IV, Figs 5-4 and 5-5). This less important effect of acidification on community specialization, when compared to organic contamination effect, led us to put into perspective the supposed 'global' decline of specialists in response to the anthropogenic alteration of their habitats (e.g. Devictor *et al.* 2008). One of the main implicit assumptions of the hypothesis that FH occurs with habitat alteration, i.e. the specialization-disturbance hypothesis (Vázquez & Simberloff 2002), is that the effect of habitat alteration on taxa should be mainly 'indirect' (e.g. by changing their resource availability). However, the 'direct' effect (e.g. increasing mortality rate due to toxicity of particular chemical compounds) of habitat alteration on taxa could violate this assumption and mask FH (Vázquez & Simberloff 2002).

Organic contamination effects on benthic invertebrates might be considered as 'indirect', since this pressure can modify the availability of several key resources for invertebrates (e.g. substrate, food, oxygen), but does not fundamentally increase *per se* their mortality rate. In contrast, acidification can impair benthic macroinvertebrates both directly (e.g. via increasing mortality) and indirectly (via decreasing food quality). Indeed, low pH values can inhibit the microbial conditioning of leaf-litter (Larrañaga *et al.* 2010), one of the most important sources of energy for benthic communities in small headwater streams. In addition, the toxicity of acid waters has often been the main hypothesis explaining biodiversity loss in acidified streams (Felten & Guérold 2006). This toxicity may be linked either to the ionic depletion in haemolymph induced by low pH values (e.g. Felten & Guérold 2006) or to the high concentration of aluminium (e.g. McCahon & Pascoe 1989). This effect duality can probably explain why the 'acidification' models linking community specialization to pressure gradient were less efficient than the 'organic contamination' models.

A major part of the significant non-random relationship between CSI' and habitat alteration described a decreasing specialization level with increasing acidification (exhibited by 6 of the 9 models, Figs 5-2 and 5-3) or increasing organic contamination (exhibited by 15 of the 21 models, Figs 5-4 and 5-5). As reflected by such results, FH occurred as a major response of macroinvertebrate assemblages to the two studied habitat alterations. This work is one of the very first demonstrating the existence of FH in benthic macroinvertebrate communities, a biological

compartment of major importance in stream functioning (Wallace & Webster 1996). The results have supported both theoretical expectations (Futuyma & Moreno 1988) and previous studies performed on other combinations of taxa and habitat alteration types (e.g. McKinney & Lockwood 1999; Devictor *et al.* 2008).

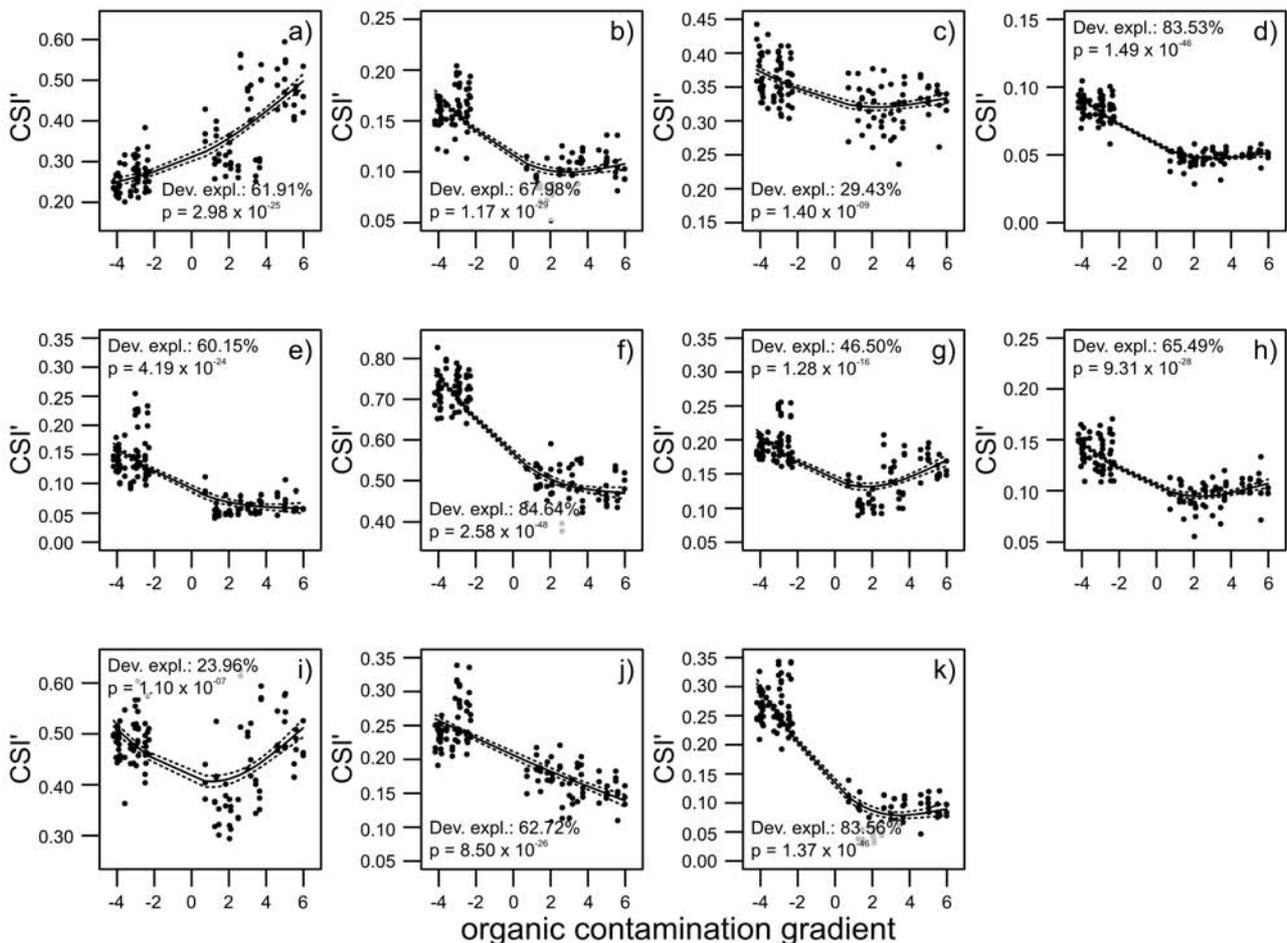


Figure 5-5. Modelling the observed community specialization along an organic contamination gradient for the Grinnellian biotraits exhibiting significant and non-random relationship with the pressure gradient: preferences in (a) altitude, (b) current velocity, (c) food, (d) longitudinal distribution, (e) pH, (f) salinity, (g) saprobity, (h) substrate, (i) temperature, (j) transversal distribution and (k) trophic status. See text and the legend of Fig. 5-2 for further details.

A curvilinear relationship between CSI' and the organic contamination gradient (see Figs 5-4e, 5-4f, 5-4h, 5-5b, 5-5c, 5-5d, 5-5e, 5-5f, 5-5h and 5-5k) has been identified for most of the traits. This non-linearity has been already observed between CSI and habitat alteration in bird communities subjected to habitat loss (Devictor *et al.* 2008). This type of relationship indicated that the minimal specialization level could be reached even for intermediate alteration levels.

For six models, invertebrate communities tended to be more specialized when habitat alteration increased. These results were rather unexpected, but not so surprising. Most of the previous studies focusing on habitat specialization have considered only a low number of Grinnellian traits (e.g. Julliard *et al.* 2006; Devictor *et al.* 2008; Abadie *et al.* 2011) and have evidenced no increase in specialization with increasing habitat alteration (but see Attum *et al.* 2006). Taking into account eleven Grinnellian traits, we have supported these findings since an increasing specialization was observed only for one trait (altitude preferendum, Fig. 5-5a) along a gradient of organic contamination. In contrast, the examined Eltonian traits were more prone to increase specialization with increasing habitat alteration: this was the case for two traits with increasing acidification (Figs. 5-2a and 5-2e) and three traits with increasing organic contamination (Figs. 5-4b, 5-4c and 5-4j). Considering a high number of ecological dimensions has resulted in a more accurate and realistic description of the specialization patterns and of the FH processes that may occur with habitat alteration. Such strategy should be promoted in future studies (Clavero & Brotons 2010).

The 'altitude preferendum' seemed to be the only one Grinnellian biotrait exhibiting a higher specialization level with increasing organic contamination. This specialization resulted from a preferential affinity of benthic communities for the trait category 'lowlands' (result not shown). A high affinity for lowlands has been already related to a high tolerance to organic contamination (see Fig. 3 in Usseglio-Polatera *et al.* 2000b) and oxygen depletion, since lowlands taxa less depend on high oxygen concentrations than taxa inhabiting mountain streams.

Two Eltonian traits showed an increasing specialization with both habitat alteration types (i.e. acidification and organic contamination): dispersal strategies (cf. Figs. 5-2a and 5-4b) and respiration techniques (cf. Figs. 5-2e and 5-4j). For each biotrait, the community specialization

resulted from a preferential utilization of one trait category by benthic communities: aquatic passive dispersal and tegumental breathing, respectively. In highly altered habitats, specialists could be preferentially selected over generalists (Attum *et al.* 2006; Clavero & Brotons 2010), the severe habitat alteration acting as a trait filter that allows only species well adapted to corresponding environmental conditions (i.e. with a high specialization level) to pass through (Statzner, Dolédec & Hugueny 2004). Dispersal has been already described as an important feature for understanding the species sensitivity to habitat alteration (e.g. Ford *et al.* 2001; Attum *et al.* 2006). Moreover, passive aquatic dispersal was already preferentially selected by benthic communities subjected to impaired (e.g. salinized river, Piscart *et al.* 2006b) or naturally harsh (e.g. ephemeral streams, Bonada *et al.* 2007) environments.

We also found that the 'feeding habits' specialization level of benthic communities increased with increasing organic contamination (Fig. 5-5c). Paradoxically, the increase in individual taxon specialization was accompanied by an increase in community complementarity, different taxa being specialized for different feeding habits. This complementarity partly resulted from the drastic simplification of the trophic network in impaired reach communities in comparison with reference reaches (results not shown). Moreover, OM-enriched reaches were characterized by a higher concentration of suspended matter than reference reaches (cf. Fig. 5-1). This abundant food type favoured the development of specialized invertebrate using suspended (i.e. filterers) or deposited (i.e. deposit-feeders) fine organic matter whereas scrapers and/or shredders declined (Chapter VI), probably because of a decrease in organic litter and biofilm availability due to clogging (eg. Bunn 1988).

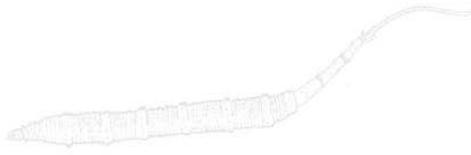
5.6 – Conclusion

Following Devictor *et al.* (2008), we consider that FH indicators calculated at the community level should greatly enhance the study of trends and consequences of biodiversity loss in ecosystems subjected to anthropogenic habitat alteration. Moreover, the multi-dimensional approach of ecological specialization seems to be a very promising strategy, because evidencing impaired habitats by identifying communities with trait-specific specialization patterns, e.g. increased generalization (e.g. Devictor *et al.* 2008) or increased specialization (e.g. Attum *et al.*

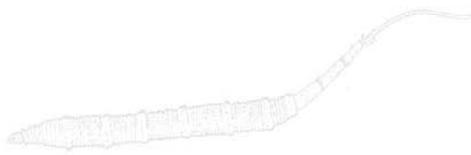
2006; Clavero & Brotons 2010). We have also confirmed that the intensity of FH depends of a trade-off between 'direct' and 'indirect' effects of habitat alteration (Vázquez & Simberloff 2002), and consider that more attention should be paid to the mechanisms with which habitat alteration acts on taxa.

The fuzzy-coded biotrait approach allows to synthesize information from different sources and to integrate uncertainty in the description of a large set of ecological niche dimensions (Chevenet *et al.* 1994). This approach had already proven its usefulness in biomonitoring (e.g. Archambault *et al.* 2010; Mondy *et al.* 2012). Investigating ecological mechanisms that lead to community assembly and ecosystem functioning would also deeply benefit from studies based on fuzzy-coded biotraits.

***Partie II: De nouveaux traits
pour étudier les niches
écologiques réalisées***



***Chapitre VI: Estimation des régimes
alimentaires réalisés des invertébrés
benthiques : une approche isotopique***



Summary

Investigating the feeding habits of macroinvertebrates is a traditional topic in functional ecology of freshwater ecosystems. The stable isotope analysis (SIA) approach is increasingly used in the study of food webs because stable isotopes potentially allow to trace the organic matter in food webs, from nutrients to predators. However, linear mixing models traditionally used could provide biased estimations of the diet of organisms due to (i) the variability in the isotopic signatures of the sources and (ii) the variability in trophic discrimination (e.g. $\Delta^{13}\text{C}$ and $\Delta^{15}\text{N}$).

In this chapter, we developed random forest-based models to predict the most probable diet of many invertebrates considering (i) the isotopic signatures of these organisms and of their potential food items, (ii) the variability of the trophic discrimination values and (iii) the food sources they are potentially able to use. These models exhibited, in average, a high level of efficiency (91.88 +/- 10.59% of good classification) allowing to identify the five major food sources (i.e. FPOM, perolithon, macrophytes, organic litter and animals) from their isotopic signatures.

The application of these models to benthic communities from six study sites demonstrated the feeding plasticity of benthic macroinvertebrates and some diet shifts during the ontogenic development of organisms (e.g. between larvae and imagines of *Limnius sp.* and between different size classes of *Gammarus sp.*). Diet plasticity can also slightly reduce food competition in least impaired conditions. However, when the pressure intensity increases, we observed higher food specialization level of communities and lower diet plasticity that could lead to a lower ability to reduce the effects of competition.

We have hypothesized that anthropogenic pressures could potentially, not only reinforce the abiotic filter, but also the biotic filter by reducing the ability of species to modulate the effects of competition in macroinvertebrate communities.

6.1 – Introduction

L'étude des réseaux trophiques a fait l'objet d'une attention particulière en écologie puisqu'elle permet de relier la structure des communautés à leur rôle dans le fonctionnement des écosystèmes (e.g. les rivières) au travers des flux d'énergie et de matière organique (Vannote *et al.* 1980 ; Rosi-Marshall & Wallace 2002 ; Woodward & Hildrew 2002b). La compréhension des mécanismes et des facteurs environnementaux régulant ces réseaux trophiques constitue donc un point d'étude particulièrement important (Vannote *et al.* 1980 ; Williams & Martinez 2000 ; Greathouse & Pringle 2006 ; Tomanova *et al.* 2007).

Le régime alimentaire est un trait biologique qui, comme de nombreux autres traits (cf. Chapitres III, IV et V), peut être significativement influencé par les pressions anthropiques. Ces pressions peuvent ainsi profondément modifier la structure trophique (Caquet 2006 ; Anderson & Cabana 2009) et/ou les flux de matière organique (deBruyn & Rasmussen 2002) au niveau de l'écosystème. Il apparaît donc que l'étude de la structure trophique des communautés benthiques peut apporter des indications sur les conséquences des pressions anthropiques non seulement sur les assemblages benthiques mais également au niveau du système « rivière » dans son ensemble, du fait des modifications des flux de matière organique.

Une première approche pour étudier la structure des réseaux trophiques a été de regrouper les espèces en unités non taxonomiques basées sur les modes d'alimentation sélectionnés et/ou les types de nourriture utilisés (Cummins & Klug 1979 ; Rawer-Jost *et al.* 2000). De manière similaire, des groupes de taxons ont également été définis à partir des traits potentiels utilisés dans ce travail de thèse en combinant les informations sur le régime alimentaire et les modes d'alimentations à d'autres traits biologiques (Usseglio-Polatera *et al.* 2000b) ou bio-écologiques (Usseglio-Polatera *et al.* 2001).

Les invertébrés benthiques constituent un groupe biotique relativement généraliste du point de vue de l'utilisation de la nourriture (Chapitre V, Cummins & Klug 1979). Les patrons de réponses obtenus avec de tels groupes trophiques (« *functional feeding groups* » ou FFG) ou en étudiant les

profils des traits biologiques relatifs aux modes d'alimentation et aux types de nourriture ingérés (cf. Chapitre II) peuvent donc se révéler délicats à interpréter. En effet, la plasticité alimentaire des invertébrés (Friberg & Jacobsen 1994 ; Felten *et al.* 2008), si elle n'est pas prise en compte, peut conduire à poser des hypothèses, si ce n'est erronées, du moins incomplètes sur les effets de pressions anthropiques sur le fonctionnement des réseaux trophiques et des flux de matière organique dans l'écosystème (Dangles 2002). De plus, les études basées sur les FFG ne permettent de ne considérer que la nourriture qui a été (potentiellement) ingérée par les organismes, ce qui ne traduit pas obligatoirement de manière pertinente la quantité et la nature des éléments effectivement assimilés par ces organismes (Mihuc 1997). Il est donc *a priori* délicat de tirer des conclusions sur les transferts de matière organique au sein des systèmes lotiques par simple extrapolation de résultats obtenus avec des études sur les FFG. Il convient donc de vérifier au préalable si la prise en compte de la plasticité alimentaire des populations du peuplement (i.e. leur régime alimentaire « réalisé ») et la différence potentielle entre nourriture ingérée et nourriture assimilée modifient significativement les conclusions obtenues en étudiant le trait biologique « type de nourriture » (i.e. le régime alimentaire « potentiel ») au sein des communautés d'invertébrés benthiques.

Les isotopes stables constituent un outil de choix pour l'étude des réseaux trophiques « réalisés » (Peterson & Fry 1987 ; Fry 1991). En effet, la composition isotopique des consommateurs reflète celles de leurs sources de nourriture (Peterson & Fry 1987 ; Jardine *et al.* 2005), une relation qui est illustrée par la célèbre maxime « je suis ce que je mange ». Toutefois la correspondance entre les signatures isotopiques des sources de nourriture et celle du consommateur n'est pas parfaite. En effet, il existe un léger décalage entre ces signatures, décalage également appelé « facteur d'enrichissement trophique » (« *trophic enrichment factor* » ou TEF, $\Delta = \delta_{\text{animal}} - \delta_{\text{nourriture}}$). A l'échelle de l'individu entier (tous tissus confondus), la valeur du TEF dépend, entre autres, du taxon (Jardine *et al.* 2005) et de la qualité de la ressource alimentaire (Adams & Sterner 2000). De manière générale, les valeurs de Δ pour le carbone sont faibles ($\Delta^{13}\text{C} < 1\%$) alors que celles pour l'azote sont plus élevées ($\Delta^{15}\text{N} \approx 3,4\%$, Peterson & Fry 1987). La stabilité du $\delta^{13}\text{C}$ en fait un bon traceur de l'origine des sources de nourriture, si celles-ci présentent des signatures contrastées. Les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ augmentent significativement avec le nombre de niveaux trophiques antérieurs au taxon considéré dans les réseaux trophiques.

L'utilisation combinée de ces deux marqueurs isotopiques permet donc de reconstituer les flux de matière dans des systèmes où l'on a échantillonné et analysé simultanément les organismes et les sources potentielles de nourriture. Pour plus de détails sur les isotopes stables en général et sur leur utilisation en écologie, le lecteur peut se reporter à Michener & Lajtha (2007).

Dans ce chapitre, les isotopes stables ont été utilisés pour estimer le régime alimentaire des invertébrés benthiques. Les régimes alimentaires « réalisés » ont ensuite été comparés aux régimes alimentaires « potentiels ». Un éventuel effet significatif des deux types de pressions anthropiques étudiés (acidification et contamination organique) sur (i) la déviation entre les régimes alimentaire potentiel et réalisé des taxons, (ii) l'utilisation potentielle ou réalisée des différents types de nourriture et (iii) leurs niveaux de spécialisation (cf. Chapitre V) et de compétition alimentaire, a été testé.

6.2 – Matériel & Méthodes

6.2.1 – Principe de l'approche isotopique

Des isotopes sont des atomes partageant le même nombre de protons et d'électrons mais ayant un nombre de neutrons différents. Une forme isotopique est dite instable (ou radioactive) si le noyau de l'atome se désintègre. Au contraire, les formes isotopiques pour lesquelles l'équilibre entre protons et neutrons au sein du noyau n'est pas rompu, sont dites stables. Les différentes formes isotopiques stables partagent donc globalement les mêmes propriétés chimiques. Toutefois, les formes isotopiques les plus lourdes forment des liaisons moléculaires plus robustes et par conséquent réagissent à une vitesse moindre que les formes isotopiques plus légères (Sulzman 2007).

Du fait de leur différence de masse, les différentes formes isotopiques stables d'un élément peuvent être discriminées et quantifiées avec une technique d'analyse du ratio isotopique en utilisant un spectromètre de masse (« *isotopic ratio mass spectrometer* » ou IRMS, Fig. 6-1).

L'IRMS analysant des gaz, il convient donc, dans une première étape, de réaliser la combustion des échantillons afin de générer des gaz comme le dioxyde de carbone (CO_2) et le diazote (N_2). Ces gaz seront ensuite ionisés, accélérés et déviés (cf. Fig. 6-1). En fonction de la masse des isotopes constituant les molécules de gaz, ces dernières seront plus ou moins déviées par le champ électromagnétique du déflecteur. En fonction des formes isotopiques les composant, on peut distinguer, pour chacun des deux gaz (CO_2 et N_2), trois formes de molécules gazeuses, chacune ayant une masse différente (Tableau 6-1, Fig. 6-1). Au niveau du déflecteur électromagnétique, la déviation sera d'autant plus forte que les molécules seront légères. Ainsi en fonction de la composition isotopique des gaz, le faisceau ionique sera séparé en trois faisceaux plus ou moins déviés. En fin de trajet, des détecteurs sont positionnés pour individuellement détecter le faisceau ionisé correspondant aux molécules gazeuses d'une masse donnée (Fig. 6-1).

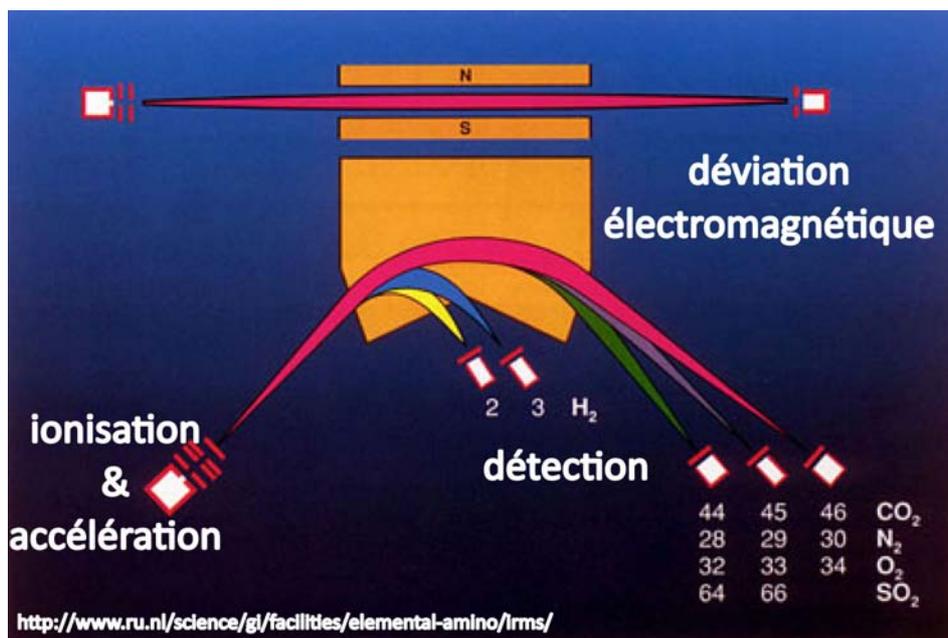


Figure 6-1. Schéma d'un spectromètre de masse IRMS et de son fonctionnement. Voir le texte pour plus de détails.

Tableau 6-I. Formes isotopiques stables du carbone, de l'oxygène et de l'azote et des molécules de dioxyde de carbone et de diazote

Élément	Isotope stable	Proportion dans l'environnement (%)	Formule moléculaire	Masses
Carbone	¹² C	98,892	¹² C ¹⁶ O ¹⁶ O	44
	¹³ C	1,108	¹³ C ¹⁶ O ¹⁶ O	45
Oxygène	¹⁶ O	99,759	¹² C ¹⁸ O ¹⁶ O	46
	¹⁷ O	0,037		
	¹⁸ O	0,204		
Azote	¹⁴ N	99,635	¹⁴ N ¹⁴ N	28
	¹⁵ N	0,365	¹⁴ N ¹⁵ N	29
			¹⁵ N ¹⁵ N	30

Les résultats des dosages isotopiques sont exprimés (i) en ratio (R) entre la quantité des formes lourde (e.g. ¹³C, ¹⁵N) et la quantité des formes légères (e.g. ¹²C, ¹⁴N) et (ii) en termes de déviations (δ) par rapport à un standard pour lequel le ratio R est connu avec précision. La déviation est exprimée en pour mille (‰), l'exemple de calcul de R et de δ est donné pour les isotopes stables du carbone :

$$R_{\text{sample}} = \frac{[^{13}\text{C}]}{[^{12}\text{C}]}$$

$$\delta^{13}\text{C} = \frac{(R_{\text{sample}} - R_{\text{standard}})}{(R_{\text{standard}})}$$

6.2.2 – Terrain

Une campagne d'échantillonnage a été réalisée en mars 2011 (campagne #16, Tableau 2-X) sur les six sites d'étude. Les invertébrés ont été échantillonnés avec un filet Surber (1/20 m², 500 µm de vide de maille). Les invertébrés ont été triés et déterminés sur place sous loupe binoculaire (Olympus SZ40). Les différents substrats ont été échantillonnés jusqu'à ce que le nombre de taxons identifiés, pour lesquels une biomasse suffisante (≈ 1 mg de masse sèche) semblait atteinte, n'augmente plus (Tableau 6-II).

Les invertébrés au dessus d'une certaine taille (≈ 1 cm) ont ensuite été disséqués pour retirer le tube digestif et congelés à -20°C , les invertébrés plus petits étant congelés entiers.

Les sources de nourriture potentielles – i.e. matière organique particulaire fine sédimentée (FPOM), litière organique, périlithon, algues filamenteuses, bryophytes, autres macrophytes – ont également été échantillonnées (Tableau 6-II) puis examinées sous loupe binoculaire pour éliminer tout invertébré potentiellement présent (car ces sources de nourriture peuvent également servir d'habitat pour la macrofaune) avant d'être congelées à -20°C .

Afin de permettre la comparaison avec le trait biologique « sources potentielles de nourriture » (Chapitre II), cinq grands types de nourriture ont été définis (Tableau 6-III). Le trait « sources potentielles de nourriture » a donc été recodé en regroupant les modalités correspondant au même type de nourriture.

Tableau 6-II. Plan d'échantillonnage pour l'étude isotopique. Pour chaque taxon et chaque source de nourriture, le nombre d'échantillons prélevés par site est indiqué. Le nombre d'individus par échantillon est indiqué entre parenthèses.

	ref1	ref2	acid1	acid2	orga1	orga2		ref1	ref2	acid1	acid2	orga1	orga2
Taxons							Taxons						
<i>Agabus</i>	0	0	0	2 (1)	0	0	<i>Odontocerum</i>	3 (1)	0	2 (3)	0	0	0
<i>Asellus</i>	0	0	0	0	0	3 (2)	<i>Oligochaeta</i>	0	0	0	0	3	0
<i>Baetis</i>	3 (12)	3 (4)	0	0	3 (5)	3 (5)	<i>Perlodes</i>	2 (1)	2 (1)	0	0	0	0
<i>Brachyptera</i>	0	3 (5)	2 (5)	0	0	0	<i>Philopotamus</i>	3 (1)	0	0	0	0	0
<i>Cordulegaster</i>	1 (1)	0	3 (1)	1 (1)	2 (1)	0	<i>Plectrocnemia</i>	0	0	0	3 (7)	0	0
<i>Dinocras</i>	3 (1)	0	0	0	0	0	<i>Potamophylax</i>	3 (3)	2 (2)	3 (1)	0	0	0
<i>Diura</i>	0	0	0	3 (2)	0	0	<i>Protonemura</i>	0	3 (30)	0	2 (27)	0	0
<i>Ecdyonurus</i>	3 (1)	0	0	0	0	0	<i>Rhithrogena</i>	3 (3)	3 (6)	0	0	0	0
<i>Epeorus</i>	3 (3)	3 (2)	0	0	0	0	<i>Rhyacophila</i>	0	3 (2)	3 (3)	0	0	0
<i>Ephemera</i>	0	3 (1)	0	0	0	0	<i>Sericostoma</i>	3 (2)	3 (2)	3 (2)	0	0	0
<i>Ephemerebella</i>	3 (29)	3 (15)	0	0	0	0	<i>Sialis</i>	0	0	0	3 (1)	0	0
<i>Erpobdella</i>	0	0	0	0	0	3 (1)	Simuliini	0	3 (7)	0	0	3 (9)	3 (6)
<i>Gammarus</i> (≈ 10 mm)	3 (4)	0	0	0	3 (3)	0	<i>Siphonoperla</i>	0	0	3 (23)	3 (22)	0	0
<i>Gammarus</i> (>20 mm)	0	0	0	0	3 (1)	0	<i>Tabanidae</i>	0	0	0	0	2 (1)	0
<i>Halesus</i>	0	2 (3)	0	0	0	0	<i>Velia</i>	0	0	0	3 (2)	0	0
Hexatomini	0	3 (4)	0	0	0	0	Types de nourriture						
<i>Hydropsyche</i>	2 (1)	3 (1)	0	0	3 (1)	0	Algues	0	1	0	3	1	3
<i>Isoperla</i>	3 (6)	0	0	0	0	0	Bryophytes	3	3	3	3	0	3
<i>Leuctra</i>	0	3 (20)	3 (20)	3 (25)	0	0	Hydrophytes	0	0	0	0	3	3
<i>Limnius</i> (imago)	0	0	3 (11)	0	0	0	Litiere	3	3	2	3	0	3
<i>Limnius</i> (larve)	0	0	3 (19)	0	0	0	FPOM	3	3	3	3	3	3
<i>Nepa</i>	0	0	0	0	3 (1)	3 (1)	Perilithon	3	3	3	3	0	3

Tableau 6-III. Définition des types de nourriture utilisés pour reconstituer les régimes alimentaires réalisés des taxons

Type de nourriture	Types d'échantillons	Modalités originales du trait « sources potentielles de nourriture » (Tachet <i>et al.</i> 2010)
FPOM	FPOM	Sédiments fins + microorganismes, débris (< 1mm)
Périlithon	Périlithon	Microphytes vivants
Macrophytes	Algues, bryophytes, hydrophytes	Macrophytes vivants
Litière	Litière	Débris végétaux (> 1mm)
Animaux	Macro-invertébrés	Animaux morts, microinvertébrés et macro-invertébrés vivants, vertébrés

6.2.3 – Laboratoire

6.2.3.1 – Préparation des échantillons

Les échantillons collectés (invertébrés et sources de nourriture) ont été séchés en étuve (65°C pendant 48h). La suite de la préparation des échantillons et les dosages élémentaires ont été réalisés au sein du plateau technique d'écologie fonctionnelle (PTEF) de l'INRA de Nancy (Champenux, 54).

Les échantillons ont été broyés à l'aide d'un broyeur à bille (Retscher MM200, Fig. 6-2a) réglé sur une fréquence de 30 mouvements par seconde pour une durée variable en fonction de la nature de l'échantillon (15 s pour les invertébrés, 30 s pour les algues, macrophytes, bryophytes, FPOM et périlithon et 120 s pour les litières organiques contenant des éléments ligneux).

Une fois les échantillons broyés, environ 1 mg par échantillon (1,282 +/- 0,137 mg) ont été conditionnés dans de petites nacelles d'étain (6 x 4 mm), pesés avec une balance de précision (Mettler Toledo MX5, $\delta = 1 \mu\text{g}$, max = 5 g, Fig. 6-2b) et placés dans des microplaques de 96 puits (Fig. 6-2c). Sur chaque plaque, les trois premiers puits ainsi que le douzième puits de chaque ligne sont réservés pour un standard.

6.2.3.2 – Analyses isotopiques

Les échantillons sont ensuite analysés dans un analyseur élémentaire (Carlo Erba NA 1500NC, Milan, Italy) pour doser l'azote (N) et le carbone (C). Cet analyseur élémentaire est couplé à un spectromètre de masse (IRMS : Finnigan Mat, Delta S, Bremen, Germany ; Fig. 6-2d) pour doser simultanément les formes isotopiques stables du carbone (^{12}C et ^{13}C) et de l'azote (^{14}N et ^{15}N).

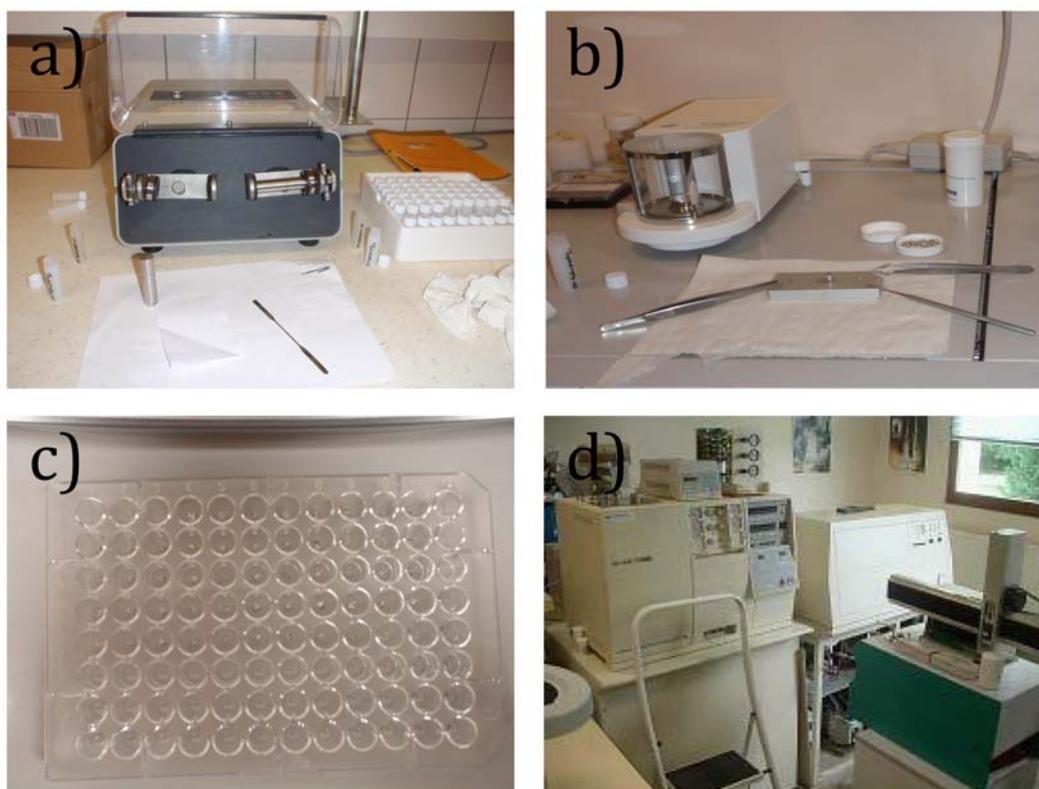


Figure 6-2. Préparation et analyse des échantillons pour analyse isotopique. a) Broyeur à billes (Retscher MM200), b) Balance de précision (Mettler Toledo MX5), c) microplaque 96 puits avec les nacelles en étain refermées, d) spectromètre de masse (IRMS: Finnigan Mat, Delta S) couplé à un analyseur élémentaire (Carlo Erba NA 1500NC)

Les résultats sont exprimés en $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ en utilisant les standards internationaux suivants :

- le polyéthylène (IAEA-CH-7) pour le ^{13}C
- le sulfate d'ammonium (IAEA-N-1 et IAEA-N-2) pour le ^{15}N

6.3 – Analyse des données

6.3.1 – Validation de la sélection de taxons

Dans un premier temps, nous avons vérifié que la combinaison de taxons utilisée dans les études isotopique et stœchiométrique (chapitre suivant) était représentative des communautés présentes sur chacun des sites d'étude. Une analyse factorielle des correspondances (AFC) a donc été réalisée sur les listes faunistiques (en présence/absence) obtenues au cours des 12 campagnes de prélèvements pour lesquelles le tri et la détermination des échantillons ont été réalisés (cf. § 5.2).

Puis, les listes faunistiques de chacun des sites, i.e. la liste de taxons utilisés dans les analyses isotopique et stœchiométrique, ont été projetées en tant qu'« individus supplémentaires » (Lebart, Piron & Morineau 2006) sur le premier plan factoriel défini par l'AFC. La position de ces nouvelles « listes faunistiques » sur le premier plan factoriel a ensuite été comparée visuellement avec la position des relevés issus du suivi annuel correspondant au même site d'étude.

6.3.2 – De la signature isotopique au régime alimentaire

6.3.2.1 – Types de nourriture

Une analyse de classification hiérarchique ascendante (distance euclidienne et critère d'agrégation de Ward) a été réalisée sur les signatures isotopiques ($\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$) obtenues pour les différents réplicats des échantillons correspondant aux différents types de nourriture non animale (FPOM, périlithon, algues, bryophytes, hydrophytes et litière).

6.3.2.2 – Facteurs d'enrichissement trophique

Par manque de données précises sur les facteurs d'enrichissement trophique (Δ) aux niveaux taxonomiques auxquels les taxons des communautés étudiées ont été identifiés, ceux-ci ont été définis pour chaque isotope stable (i.e. $\Delta^{13}\text{C}$ et $\Delta^{15}\text{N}$) avec une seule valeur pour l'ensemble des taxons. Dans la littérature, de nombreuses estimations des $\Delta^{13}\text{C}$ et $\Delta^{15}\text{N}$ sont disponibles parmi lesquelles, pour les invertébrés aquatiques, celles de Vander Zanden & Rasmussen (2001) et de Jardine *et al.* (2005) (Tableau 6-IV).

Tableau 6-IV. Facteurs d'enrichissement trophique moyens (+/- un écart-type) pour les isotopes stables du carbone ($\Delta^{13}\text{C}$) et de l'azote ($\Delta^{15}\text{N}$) chez les invertébrés aquatiques

Référence	$\Delta^{13}\text{C}$	$\Delta^{15}\text{N}$
Vander Zanden & Rasmussen (2001)	0,3 (+/- 1,5)	2,7 (+/- 2,4)
Jardine <i>et al.</i> (2005)	-0,3 (+/- 1,0)	0,5 (+/- 0,8)

6.3.2.3 – Modèles utilisés

Afin de mieux prendre en compte la grande variété de sources potentielles de nourriture (taxons compris) et la grande incertitude qui existe dans les valeurs de Δ (cf. Tableau 6-IV), nous avons préféré développer une méthode d'estimation du régime alimentaire plus souple d'utilisation que les « *mixing models* » classiques (e.g. le logiciel IsoSource, Phillips & Gregg 2003)

qui, en première approche, n'ont pas donné de résultats satisfaisant sur nos données. L'approche choisie repose sur l'utilisation de modèles de type RF (cf. §2.4.3).

Dans ce chapitre, les modèles de type RF sont utilisés pour estimer le régime alimentaire probable des taxons à partir des signatures isotopiques des échantillons analysés. Un modèle constitué de 9999 arbres de classification est construit par site et par taxon. L'estimation du régime alimentaire le plus probable de chaque taxon s'effectue alors en trois étapes :

1. un modèle RF est construit pour chaque site d'étude pour modéliser la probabilité pour un échantillon d'appartenir à un type de nourriture (variable dépendante = e.g. *Baetis*, *Siphonoperla*, FPOM, périlithon) en fonction de sa signature isotopique (variables prédictives = $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$),
2. un enrichissement isotopique d'un facteur Δ a lieu entre les sources de nourriture et le taxon qui les a assimilé. De ce fait, pour obtenir la signature isotopique originale de la nourriture assimilée par le taxon (tous types de nourriture confondus) il suffit de soustraire la valeur de Δ à la signature du taxon pour l'isotope correspondant (i.e. $\delta^{15}\text{N}_{\text{nourriture}} = \delta^{15}\text{N}_{\text{taxon}} - \Delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}_{\text{nourriture}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{taxon}} - \Delta^{13}\text{C}$),
3. le modèle RF défini en (1) est ensuite utilisé pour prédire avec quelle probabilité chacun des types de nourriture recensé sur le site d'étude a pu contribuer au mélange alimentaire assimilé par l'organisme étudié. Ces probabilités sont alors interprétées comme représentatives des contributions de chacun des types de nourriture au régime alimentaire du taxon.

Afin d'améliorer la pertinence de ces régimes alimentaires « observés », deux autres paramètres ont été intégrés dans le processus de modélisation : le régime alimentaire potentiel des taxons et la variabilité des valeurs de Δ .

Si un taxon et un (autre) type de nourriture présentent des signatures isotopiques très similaires (e.g. *Baetis* et les FPOM dans le site *orga1*, cf. Fig. 6-3e), ils auront, d'après les modèles RF, des probabilités similaires de faire partie du mélange alimentaire assimilé par un autre taxon.

Or, tous les taxons ne sont pas susceptibles d'utiliser de la même façon les différents types de nourriture disponibles. Par exemple, si le deuxième taxon est un prédateur, la probabilité réelle qu'il se nourrisse des larves de *Baetis* est plus élevée que celle que ce prédateur se nourrisse de FPOM. Afin de prendre en compte ces différences potentielles d'ingestion des différents types de nourriture, un système de pondération a été utilisé lors de la construction des modèles. Pour un taxon donné, les signatures isotopiques de chaque type de nourriture ont été respectivement pondérées par l'utilisation potentielle de chacun de ces type de nourriture par le taxon (i.e. utilisation relative de la modalité correspondante dans le trait biologique « sources potentielles de nourriture », cf. Tableau 6-III). L'efficacité des modèles ainsi construits est ensuite estimée en utilisant le taux de bons classements (cf. §2.4.3).

Les valeurs de Δ utilisées dans cette étude sont des estimations tirées de la littérature. Toutefois, la variation autour des valeurs moyennes de ces estimations est très importante (> 88%, cf. Tableau 6-IV). Ne connaissant pas les valeurs réelles de $\Delta^{13}\text{C}$ et $\Delta^{15}\text{N}$ dans les communautés étudiées, il est donc particulièrement important de tenir compte de cette variabilité.

Pour chaque isotope, nous avons défini un ensemble de valeurs possibles de Δ . Cet ensemble correspond à une division en dix parts égales de la gamme de valeurs correspondant à la moyenne plus ou moins un écart-type des valeurs de Δ renseignées dans la littérature (Tableau 6-IV). Les onze valeurs ainsi obtenues par isotope (i.e. $11 \times 11 = 121$ combinaisons possibles, Fig. 6-4) permettent d'estimer la variabilité des facteurs d'enrichissement trophique utilisés pour reconstituer les régimes alimentaires des taxons (Fig. 6-4). Chacune des combinaisons [$\Delta^{13}\text{C} / \Delta^{15}\text{N}$] a donc été utilisée pour obtenir une estimation du régime alimentaire d'un taxon. Au total, pour un organisme échantillonné, 121 estimations de régimes alimentaires sont donc générées, permettant ainsi, en calculant la moyenne et l'écart-type de l'utilisation de chaque type de nourriture estimée pour les 121 régimes alimentaires, d'estimer son régime alimentaire le plus probable et l'incertitude autour de ce dernier (Fig. 6-4).

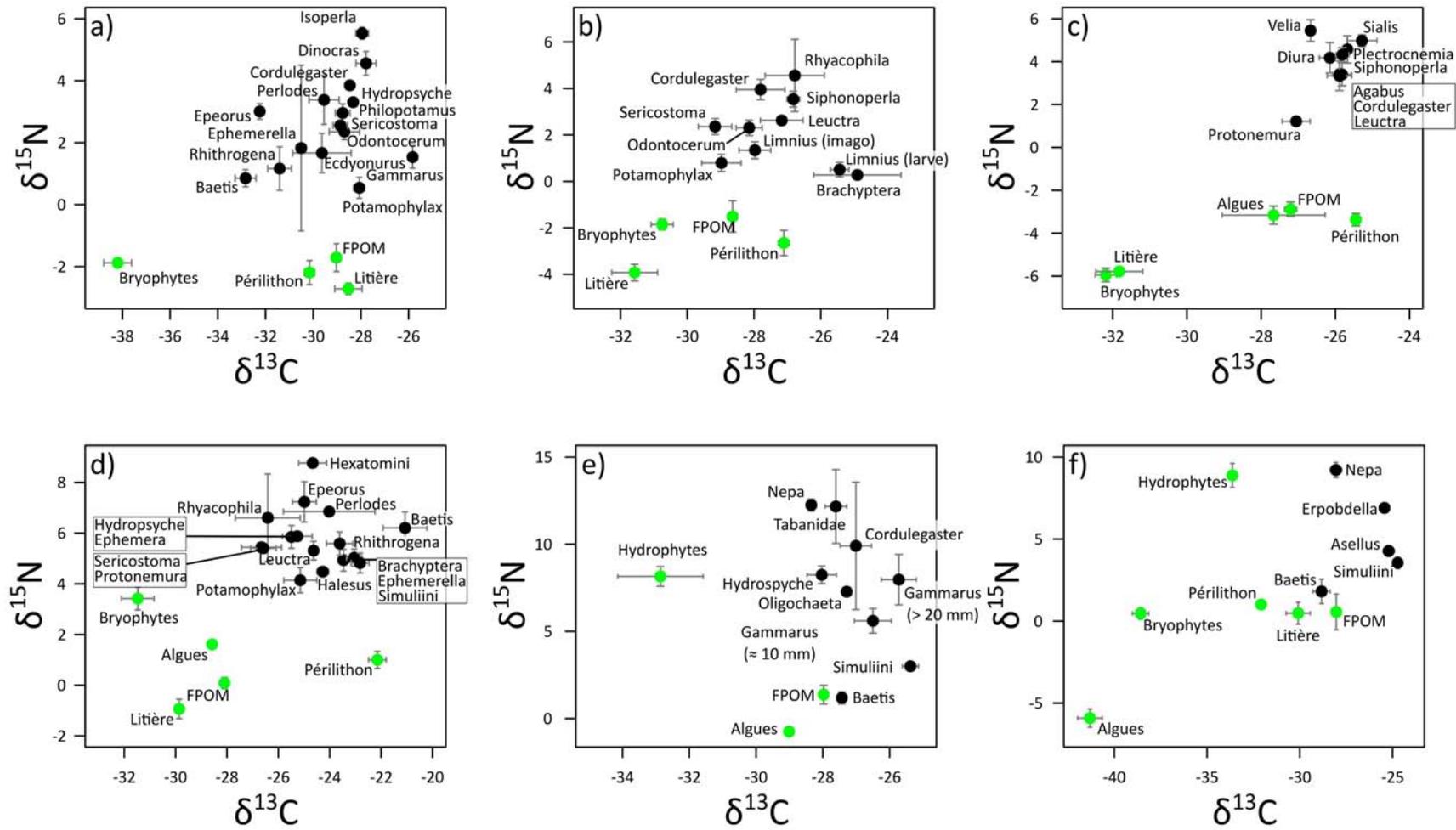


Figure 6-3. Diagrammes isotopiques (plan $\delta^{13}\text{C} / \delta^{15}\text{N}$) pour chacun des sites d'études (a : ref1, b : acid1, c : acid2, d : ref2, e : orga1 et f : orga2) lors de la campagne de mars 2011. La position moyenne des répliquats des échantillons de taxons (cercles noirs) et des autres types de nourriture (cercles verts) ainsi que leur degré de variation (barres grises : ± 1 écart-type) sont indiquées.

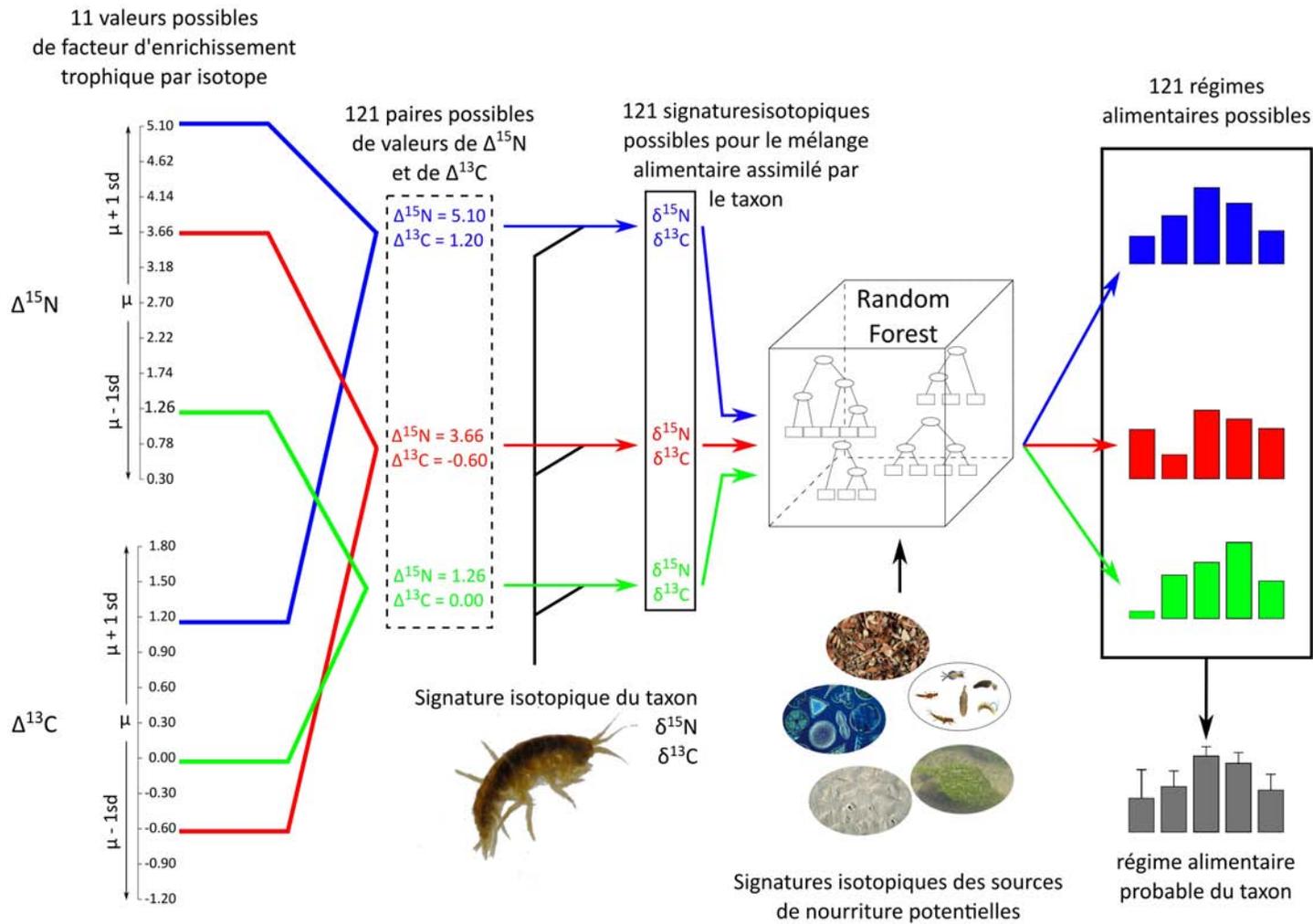


Figure 6-4. Prise en compte de la variabilité des valeurs d'enrichissement trophique (Δ) dans la procédure d'estimation du régime alimentaire probable d'un taxon. Illustration avec les valeurs de Δ données par Vander Zanden & Rasmussen 2001 (cf. tableau 6-IV) et trois scénarios possibles (bleu, rouge et vert) de paires de valeurs de $\Delta^{13}\text{C}$ et $\Delta^{15}\text{N}$.

6.3.2.4 – Différence entre profils alimentaires « potentiel » et « estimé »

Pour chaque répliquat d'un taxon dans un site d'étude donné, la différence entre le régime alimentaire potentiel et chacun des régimes alimentaires estimés a été testée avec un test du Chi² et l'intensité de la déviation du régime alimentaire estimé par rapport au régime alimentaire potentiel (D) a été quantifiée de la manière suivante :

$$D = -\ln\left(\frac{p}{1-p}\right) \text{ avec } p \text{ la p-value du test du Chi}^2.$$

6.3.2.5 – Spécialisation alimentaire

Le degré de spécialisation alimentaire des taxons a été mesuré en utilisant le nouvel indice TSI' (Chapitre V) sur les profils alimentaires potentiels (TSI'_{pot}) et estimés (TSI'_{obs}) des taxons.

6.3.2.6 – Compétition alimentaire

Le niveau de compétition alimentaire entre les taxons a été estimé à l'aide de l'indice de recouvrement de niche de Pianka (1974) :

$$O_{jk} = \frac{\sum_i^n p_{ij} \times p_{ik}}{\sqrt{\sum_i^n p_{ij}^2 \times \sum_i^n p_{ik}^2}}$$

avec O_{jk} le recouvrement de niche entre les taxons j et k, p_{ij} et p_{ik} les proportions du type de nourriture i (parmi n) utilisées par les taxons j et k, respectivement.

Cet indice de compétition est calculé pour chaque couple de taxons dans chaque communauté à partir de leurs régimes alimentaires potentiels (O_{pot}) ou réalisés (O_{obs}). Ensuite, pour chaque site d'étude et chaque taxon échantillonné, la valeur moyenne de compétition alimentaire d'un taxon avec les autres taxons présents dans la communauté est calculée (i.e. compétition inter-taxons ; \bar{O}_{pot} et \bar{O}_{obs}).

Une analyse CIT (9999 permutations) a ensuite permis de tester si les valeurs de compétition inter-taxons moyenne (\bar{O}) variaient de manière significative en fonction (i) du site d'étude où avaient été échantillonnés les taxons et (ii) du caractère potentiel ou réalisé de cette compétition.

6.3.3 – Réponses différentielles du régime alimentaire (potentiel ou réalisé) entre les différents sites d'étude

L'expression différentielle des différentes métriques décrivant le régime alimentaire utilisées (utilisation de chacune des sources de nourriture, D, TSI'_{pot} et TSI'_{obs}) entre sites d'étude a été testée avec une approche de type CIT (cf. §2.4.2). Pour chaque métrique, un arbre CIT a été construit (9999 permutations) pour déterminer si, statistiquement, les valeurs de cette métrique variaient significativement entre les différents sites d'étude et donc entre les différentes conditions de pression anthropique.

6.4 – Résultats

6.4.1 – Validation des sélections de taxons utilisées dans les études isotopique et stœchiométrique

Les positions des relevés des études isotopique et stœchiométrique sont proches de celles des relevés de l'étude communautaire (Fig. 6-5). Pour les deux études (isotopique et stœchiométrique) les relevés sont suffisamment proches des groupes de relevés des sites d'étude qu'ils sont censés représenter pour que l'on puisse raisonnablement considérer que les résultats obtenus avec ces relevés dans les études isotopique et stœchiométrique soient représentatifs des communautés benthiques d'où proviennent les invertébrés.

Trente-neuf taxons ont été échantillonnés sur l'ensemble des six sites d'étude (*ref1* : 17, *ref2* : 16, *acid1* : 15, *acid2* : 14, *orga1* : 8, *orga2* : 5), correspondant à un total de 75 combinaisons « taxon x site ». Les cinq types de nourriture (FPOM, périlithon, macrophytes, litière et animaux, Tableau 6-III) n'ont pu être échantillonnés que sur cinq des six sites d'étude (Tableau 6-II). Sur le site *orga1* nous n'avons trouvé ni litière – malgré la présence d'arbres sur les rives – ni périlithon (Fig. 6-3, Tableau 6-II), aussi pour ce site d'étude, les profils alimentaires des taxons n'ont pas été reconstitués.

Six taxons (*Agabus*, *Cordulegaster*, *Erpobdella*, *Nepa*, *Plectrocnemia* et *Velia*) sont des prédateurs stricts ne se nourrissant que d'un seul type de nourriture, les animaux. Pour ces taxons, la construction d'un modèle n'est donc pas nécessaire, le régime observé étant équivalent au régime potentiel. De plus, deux taxons sont spécifiques au site *orga1* (Oligochaeta et Tabanidae) et ne seront donc pas pris en compte dans les modèles d'estimation des régimes alimentaires. Quarante-sept modèles ont donc été construits afin d'estimer le régime alimentaire observé pour 31 taxons des sites d'étude *ref1*, *ref2*, *acid1*, *acid2* et *orga2*.

6.4.2 – Facteurs d'enrichissement trophique

Les diagrammes isotopiques obtenus sur les six sites d'étude (Fig. 6-3) tendent à indiquer un fort enrichissement en ^{15}N ($\Delta^{15}\text{N} \geq 2\text{‰}$) entre les sources de nourriture et les taxons qui sont susceptibles de les consommer. La valeur de $\Delta^{15}\text{N}$ proposée par Jardine *et al.* (2005) pour les invertébrés aquatiques est relativement faible ($0,5 \pm 0,8$) au contraire de celle proposée par Vander Zanden & Rasmussen (2001) ($2,7 \pm 2,4$) qui se rapproche beaucoup plus des valeurs observées dans notre étude. Les valeurs de Δ utilisées pour reconstituer les régimes alimentaires seront donc celles proposées par Vander Zanden & Rasmussen (Tableau 6-V).

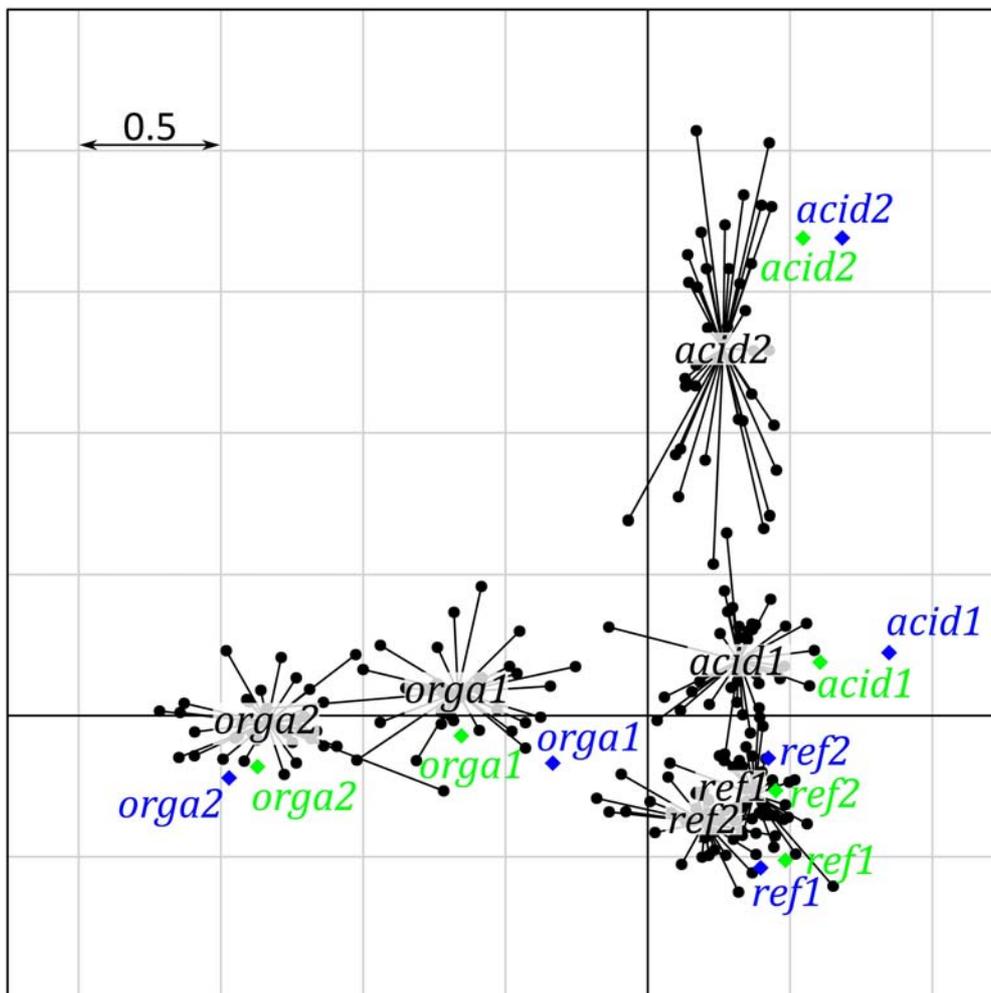


Figure 6-5. Comparaison de la composition faunistique des relevés de l'étude communautaire (points noirs), de l'étude isotopique (losanges verts) et de l'étude stœchiométrique (losanges bleus) sur le premier plan factoriel de l'AFC réalisée sur le tableau faunistique (162 taxons x 216 relevés). Les relevés de l'étude communautaire sont regroupés, toutes campagnes confondues, par site d'étude. Les « relevés » correspondant aux études isotopique et stœchiométriques sont projetés en tant qu'individus supplémentaires sur ce premier plan factoriel.

6.4.3 – Sources de nourriture

Certains types de nourriture ont des signatures isotopiques difficilement distinguables (e.g. algues et FPOM ou litière et bryophytes dans le site *acid2*, Figs. 6-3c et 6-6d). En particulier, les FPOM et la litière organique ont des signatures proches sur les deux sites de référence ainsi que sur le site *orga2* (Figs. 6-4a, 6-4d, 6-4e, 6-5a, 6-5b et 6-5e). Au contraire, dans les deux sites acidifiés ces deux types de nourriture ont des signatures isotopiques bien distinctes (Figs. 6-3b, 6-3c, 6-6c et 6-6d).

6.4.4 – Régimes alimentaires

Les cinq grand types de nourriture sont bien discriminés par les modèles utilisés. En effet, sur les 47 modèles construits on observe en moyenne 91,88% (+/- 10,59%) de bons classements (Tableau 6-V). Un modèle, toutefois, possède de mauvaises performances, celui construit pour le taxon *Leuctra* dans le site *acid2* (42,33% +/- 50,85 de bons classements).

La valeur de D correspondant à un seuil de significativité de $\alpha = 0,01$ est de 4,59. Lorsque l'on considère l'ensemble des taxons échantillonnés sur les cinq sites d'étude, les régimes alimentaires estimés diffèrent, en moyenne, des régimes alimentaires potentiels d'un facteur D supérieur à 5,31. Il y a donc, globalement, une déviation significative entre les régimes alimentaires potentiels et observés (Tableau 6-V).

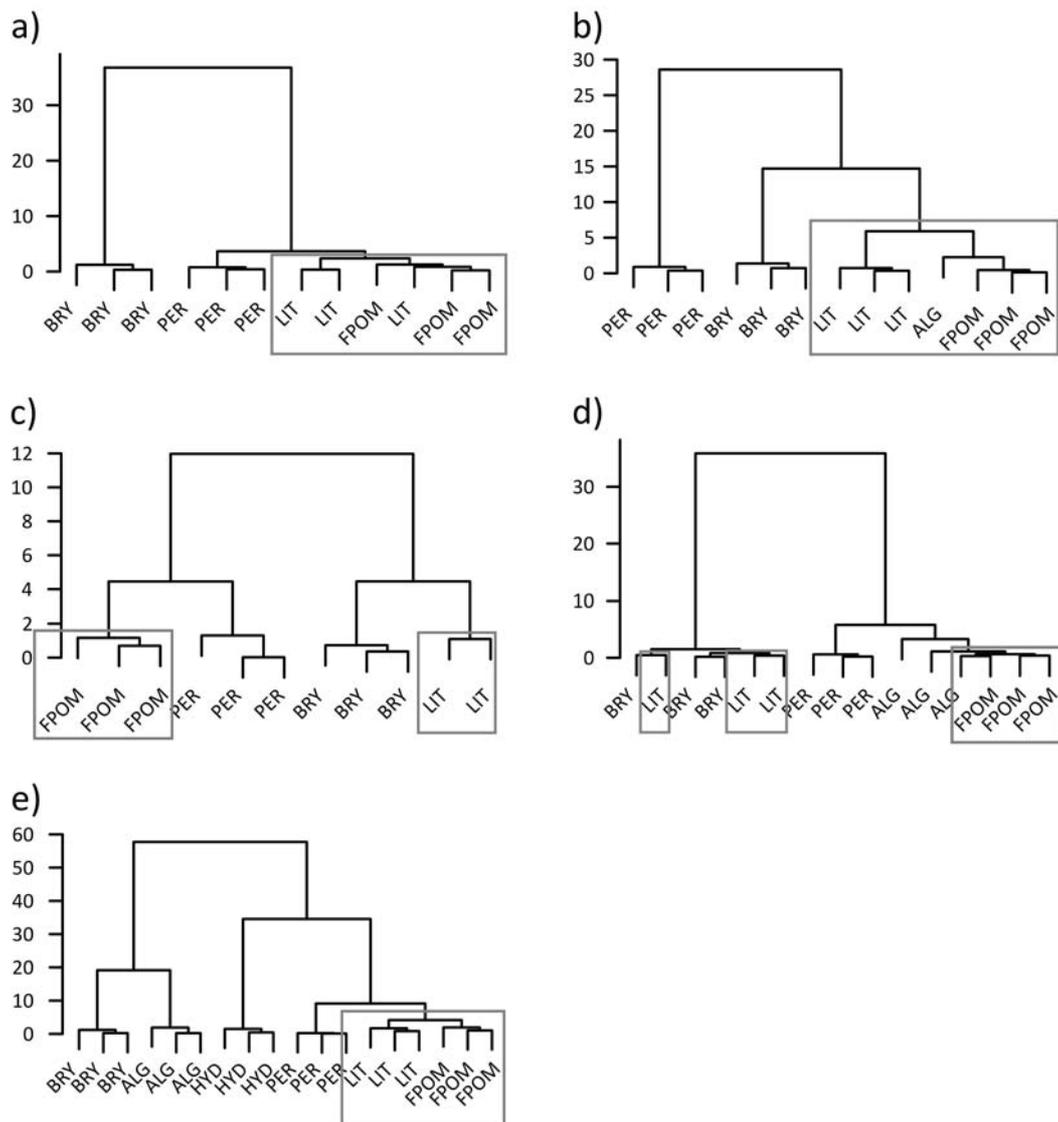


Figure 6-6. Classification des types de nourriture d'après leurs signatures isotopiques ($\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$) pour les différents sites d'étude : a) ref1, b) ref2, c) acid1, d) acid2 et e) orga2. Les dendrogrammes sont construits avec la méthode d'agrégation de Ward en utilisant les distances euclidiennes entre réplicats. Les cadres gris visualisent la position des types de nourriture « litière » et « matière organique fine ». MOF : matière organique fine, PER : périlithon, ALG : algues, BRY : bryophytes, HYD : hydrophytes et LIT : litière.

Tableau 6-V. Profils alimentaires potentiels et observés des 31 taxons pour lesquels un modèle de type RF a été construit. L'efficacité des modèles, les différences entre profils potentiels et observés (D) et les niveaux de spécialisation (TSI') sont donnés (moyenne +/- 1 écart-type).

Taxon	Profil	Efficacité du modèle (%)	Utilisation des types de nourriture					TSI'	D
			FPOM	Litière	Pérlithon	Macrophytes	Animaux		
Asellus	potentiel		0,17	0,50	0,17	0,17	0,00	0,17	
	orga2	75,00 (+/- 31,91)	0,77 (+/- 0,07)	0,18 (+/- 0,06)	0,04 (+/- 0,03)	0,01 (+/- 0,02)	0,00	0,54 (+/- 0,09)	36,73 (+/- 6,12)
Baetis	potentiel		0,18	0,18	0,45	0,09	0,09	0,11	
	ref1	86,67 (+/- 29,81)	0,04 (+/- 0,05)	0,12 (+/- 0,15)	0,27 (+/- 0,18)	0,17 (+/- 0,12)	0,40 (+/- 0,34)	0,33 (+/- 0,32)	29,99 (+/- 25,93)
	ref2	95,00 (+/- 11,18)	0,01 (+/- 0,04)	0,00 (+/- 0,00)	0,44 (+/- 0,24)	0,05 (+/- 0,05)	0,50 (+/- 0,26)	0,47 (+/- 0,22)	35,88 (+/- 17,08)
	orga2	86,67 (+/- 18,26)	0,43 (+/- 0,26)	0,46 (+/- 0,26)	0,03 (+/- 0,04)	0,05 (+/- 0,06)	0,03 (+/- 0,05)	0,42 (+/- 0,11)	36,06 (+/- 5,85)
Brachyptera	potentiel		0,29	0,00	0,43	0,29	0,00	0,18	
	ref2	91,67 (+/- 14,43)	0,11 (+/- 0,18)	0,00	0,61 (+/- 0,17)	0,28 (+/- 0,21)	0,00	0,46 (+/- 0,18)	17,93 (+/- 6,21)
	acid1	77,78 (+/- 19,25)	0,24 (+/- 0,20)	0,00	0,73 (+/- 0,22)	0,04 (+/- 0,05)	0,00	0,59 (+/- 0,26)	20,86 (+/- 11,17)
Dinocras	potentiel		0,20	0,00	0,00	0,00	0,80	0,60	
	ref1	100,00 (+/- 0,00)	0,07 (+/- 0,15)	0,00	0,00	0,00	0,93 (+/- 0,15)	0,89 (+/- 0,18)	9,50 (+/- 5,34)
Diura	potentiel		0,17	0,00	0,00	0,00	0,83	0,65	
	acid2	95,00 (+/- 7,07)	0,16 (+/- 0,19)	0,00	0,00	0,00	0,84 (+/- 0,19)	0,76 (+/- 0,22)	6,68 (+/- 8,52)
Ecdyonurus	potentiel		0,38	0,38	0,25	0,00	0,00	0,18	
	ref1	88,89 (+/- 19,25)	0,35 (+/- 0,27)	0,20 (+/- 0,29)	0,45 (+/- 0,31)	0,00	0,00	0,52 (+/- 0,15)	26,34 (+/- 9,13)
Epeorus	potentiel		0,20	0,00	0,60	0,20	0,00	0,30	
	ref1	88,89 (+/- 19,25)	0,33 (+/- 0,08)	0,00	0,55 (+/- 0,10)	0,12 (+/- 0,12)	0,00	0,32 (+/- 0,09)	5,31 (+/- 3,23)
	ref2	91,67 (+/- 14,43)	0,12 (+/- 0,11)	0,00	0,31 (+/- 0,24)	0,57 (+/- 0,14)	0,00	0,40 (+/- 0,06)	23,59 (+/- 11,37)
Ephemera	potentiel		0,38	0,25	0,13	0,00	0,25	0,10	
	ref2	99,40 (+/- 1,19)	0,07 (+/- 0,10)	0,00 (+/- 0,00)	0,05 (+/- 0,06)	0,00	0,88 (+/- 0,14)	0,77 (+/- 0,25)	44,89 (+/- 14,52)
Ephemerella	potentiel		0,08	0,25	0,33	0,25	0,08	0,06	
	ref1	86,67 (+/- 29,81)	0,09 (+/- 0,15)	0,19 (+/- 0,27)	0,22 (+/- 0,21)	0,02 (+/- 0,03)	0,48 (+/- 0,40)	0,53 (+/- 0,31)	43,68 (+/- 26,25)
	ref2	95,00 (+/- 11,18)	0,10 (+/- 0,13)	0,01 (+/- 0,05)	0,28 (+/- 0,25)	0,11 (+/- 0,10)	0,50 (+/- 0,33)	0,44 (+/- 0,30)	40,41 (+/- 21,19)
Gammarus	potentiel		0,07	0,36	0,14	0,07	0,36	0,11	
	ref1	79,47 (+/- 29,39)	0,05 (+/- 0,05)	0,19 (+/- 0,21)	0,01 (+/- 0,01)	0,00 (+/- 0,00)	0,75 (+/- 0,21)	0,61 (+/- 0,26)	24,25 (+/- 12,58)
Halesus	potentiel		0,00	0,33	0,00	0,33	0,33	0,17	
	ref2	100,00 (+/- 0,00)	0,00	0,13 (+/- 0,14)	0,00	0,22 (+/- 0,11)	0,65 (+/- 0,16)	0,43 (+/- 0,22)	17 (+/- 13,09)
Hexatomini	potentiel		0,10	0,30	0,10	0,00	0,50	0,20	
	ref2	99,40 (+/- 1,19)	0,00 (+/- 0,02)	0,00 (+/- 0,00)	0,00 (+/- 0,01)	0,00	1,00 (+/- 0,02)	0,99 (+/- 0,04)	31,07 (+/- 1,27)

Tableau 6-V (suite). Profils alimentaires potentiels et observés des 31 taxons pour lesquels un modèle de type RF a été construit. L'efficacité des modèles, les différences entre profils potentiels et observés (D) et les niveaux de spécialisation (TSI') sont donnés (moyenne +/- 1 écart-type).

Taxon	Profil	Efficacité du modèle (%)	Utilisation des types de nourriture					TSI'	D
			FPOM	Litière	Pérlithon	Macrophytes	Animaux		
Hydropsyche	potentiel		0,20	0,10	0,30	0,00	0,40	0,13	
	ref1	83,33 (+/- 19,25)	0,15 (+/- 0,22)	0,05 (+/- 0,09)	0,06 (+/- 0,14)	0,00	0,74 (+/- 0,31)	0,68 (+/- 0,28)	28,54 (+/- 10,16)
	ref2	100,00 (+/- 0,00)	0,11 (+/- 0,16)	0,00 (+/- 0,01)	0,06 (+/- 0,09)	0,00	0,83 (+/- 0,21)	0,72 (+/- 0,30)	27,97 (+/- 13,26)
Isoperla	potentiel		0,00	0,00	0,29	0,00	0,71	0,49	
	ref1	98,68 (+/- 1,86)	0,00	0,00	0,01 (+/- 0,03)	0,00	0,99 (+/- 0,03)	0,98 (+/- 0,07)	16,64 (+/- 3,04)
Leuctra	potentiel		0,14	0,14	0,29	0,29	0,14	0,03	
	ref2	95,00 (+/- 11,18)	0,14 (+/- 0,20)	0,00 (+/- 0,01)	0,17 (+/- 0,19)	0,12 (+/- 0,12)	0,57 (+/- 0,32)	0,47 (+/- 0,34)	37,22 (+/- 22,39)
	acid1	83,33 (+/- 23,57)	0,15 (+/- 0,19)	0,00 (+/- 0,00)	0,15 (+/- 0,22)	0,03 (+/- 0,05)	0,67 (+/- 0,34)	0,62 (+/- 0,32)	48,26 (+/- 20,52)
	acid2	42,33 (+/- 50,85)	0,13 (+/- 0,20)	0,00 (+/- 0,00)	0,12 (+/- 0,17)	0,06 (+/- 0,09)	0,69 (+/- 0,27)	0,58 (+/- 0,23)	46,85 (+/- 14,87)
Limnius	potentiel		0,25	0,00	0,75	0,00	0,00	0,53	
	acid1 (larves)	100,00 (+/- 0,00)	0,23 (+/- 0,19)	0,00	0,77 (+/- 0,19)	0,00	0,00	0,65 (+/- 0,26)	6,92 (+/- 4,53)
	acid1 (imagos)	100,00 (+/- 0,00)	0,64 (+/- 0,32)	0,00	0,36 (+/- 0,32)	0,00	0,00	0,68 (+/- 0,25)	27,82 (+/- 22,49)
Odontocerum	potentiel		0,00	0,00	0,11	0,33	0,56	0,29	
	ref1	99,12 (+/- 1,52)	0,00	0,00	0,25 (+/- 0,26)	0,02 (+/- 0,03)	0,73 (+/- 0,28)	0,68 (+/- 0,24)	25,68 (+/- 9,75)
	acid1	100,00 (+/- 0,00)	0,00	0,00	0,20 (+/- 0,25)	0,14 (+/- 0,19)	0,66 (+/- 0,28)	0,59 (+/- 0,28)	19,24 (+/- 13,52)
Perlodes	potentiel		0,13	0,00	0,13	0,00	0,75	0,49	
	ref1	88,03 (+/- 18,55)	0,15 (+/- 0,23)	0,00	0,10 (+/- 0,18)	0,00	0,75 (+/- 0,31)	0,72 (+/- 0,26)	14,99 (+/- 13,72)
	ref2	99,22 (+/- 1,34)	0,03 (+/- 0,08)	0,00	0,10 (+/- 0,21)	0,00	0,87 (+/- 0,21)	0,83 (+/- 0,22)	13,22 (+/- 9,93)
Philopotamus	potentiel		0,29	0,00	0,43	0,14	0,14	0,13	
	ref1	91,67 (+/- 16,67)	0,19 (+/- 0,25)	0,00	0,10 (+/- 0,18)	0,01 (+/- 0,03)	0,70 (+/- 0,35)	0,69 (+/- 0,30)	48,69 (+/- 24,67)
Potamophylax	potentiel		0,00	0,43	0,00	0,29	0,29	0,18	
	ref1	100,00 (+/- 0,00)	0,00	0,48 (+/- 0,28)	0,00	0,05 (+/- 0,06)	0,46 (+/- 0,28)	0,51 (+/- 0,21)	19,64 (+/- 13,97)
	ref2	100,00 (+/- 0,00)	0,00	0,18 (+/- 0,18)	0,00	0,27 (+/- 0,12)	0,55 (+/- 0,17)	0,35 (+/- 0,18)	16,51 (+/- 13,48)
	acid1	83,33 (+/- 28,87)	0,00	0,15 (+/- 0,19)	0,00	0,41 (+/- 0,24)	0,45 (+/- 0,29)	0,46 (+/- 0,24)	24,07 (+/- 15,68)
Protonemura	potentiel		0,25	0,50	0,25	0,00	0,00	0,22	
	ref2	100,00 (+/- 0,00)	0,48 (+/- 0,17)	0,02 (+/- 0,08)	0,50 (+/- 0,17)	0,00	0,00	0,43 (+/- 0,17)	33,65 (+/- 8,96)
	acid2	88,89 (+/- 19,25)	0,79 (+/- 0,25)	0,00 (+/- 0,01)	0,21 (+/- 0,25)	0,00	0,00	0,74 (+/- 0,23)	46,84 (+/- 8,85)

Tableau 6-V (suite). Profils alimentaires potentiels et observés des 31 taxons pour lesquels un modèle de type RF a été construit. L'efficacité des modèles, les différences entre profils potentiels et observés (D) et les niveaux de spécialisation (TSI') sont donnés (moyenne +/- 1 écart-type).

Taxon	Profil	Efficacité du modèle (%)	Utilisation des types de nourriture					TSI'	D
			FPOM	Litière	Pérlithon	Macrophytes	Animaux		
Rhithrogena	potentiel		0,20	0,00	0,60	0,20	0,00	0,30	
	ref1	88,89 (+/- 19,25)	0,23 (+/- 0,14)	0,00	0,71 (+/- 0,16)	0,06 (+/- 0,05)	0,00	0,51 (+/- 0,22)	8,14 (+/- 4,42)
	ref2	91,67 (+/- 14,43)	0,07 (+/- 0,12)	0,00	0,58 (+/- 0,22)	0,35 (+/- 0,20)	0,00	0,46 (+/- 0,18)	14,85 (+/- 5,92)
Rhyacophila	potentiel		0,05	0,09	0,19	0,00	0,68	0,38	
	ref2	100,00 (+/- 0,00)	0,20 (+/- 0,27)	0,05 (+/- 0,13)	0,01 (+/- 0,02)	0,00	0,74 (+/- 0,35)	0,76 (+/- 0,28)	26,08 (+/- 18,56)
	acid1	100,00 (+/- 0,00)	0,07 (+/- 0,17)	0,00 (+/- 0,01)	0,09 (+/- 0,17)	0,00	0,84 (+/- 0,25)	0,79 (+/- 0,26)	17,03 (+/- 9,63)
Sericostoma	potentiel		0,00	0,38	0,13	0,25	0,25	0,10	
	ref1	91,67 (+/- 16,67)	0,00	0,08 (+/- 0,14)	0,20 (+/- 0,24)	0,01 (+/- 0,02)	0,71 (+/- 0,31)	0,64 (+/- 0,28)	41,27 (+/- 13,86)
	ref2	100,00 (+/- 0,00)	0,00	0,05 (+/- 0,06)	0,07 (+/- 0,08)	0,27 (+/- 0,19)	0,62 (+/- 0,25)	0,46 (+/- 0,29)	28,49 (+/- 16,04)
	acid1	87,50 (+/- 25,00)	0,00	0,03 (+/- 0,09)	0,08 (+/- 0,13)	0,33 (+/- 0,29)	0,56 (+/- 0,32)	0,55 (+/- 0,29)	35,81 (+/- 13,88)
Sialis	potentiel		0,11	0,11	0,00	0,00	0,78	0,54	
	acid2	98,33 (+/- 2,89)	0,04 (+/- 0,08)	0,00 (+/- 0,00)	0,00	0,00	0,96 (+/- 0,08)	0,92 (+/- 0,14)	10,58 (+/- 2,14)
Simuliini	potentiel		0,60	0,00	0,20	0,00	0,20	0,30	
	ref2	99,21 (+/- 1,37)	0,09 (+/- 0,16)	0,00	0,37 (+/- 0,28)	0,00	0,54 (+/- 0,32)	0,55 (+/- 0,27)	40,82 (+/- 19,14)
	orga2	72,22 (+/- 34,69)	0,36 (+/- 0,19)	0,00	0,02 (+/- 0,02)	0,00	0,62 (+/- 0,19)	0,49 (+/- 0,20)	26,05 (+/- 16,67)
Siphonoperla	potentiel		0,18	0,18	0,09	0,00	0,55	0,21	
	acid1	100,00 (+/- 0,00)	0,09 (+/- 0,18)	0,00 (+/- 0,00)	0,15 (+/- 0,21)	0,00	0,76 (+/- 0,28)	0,71 (+/- 0,27)	23,99 (+/- 9,02)
	acid2	98,75 (+/- 2,50)	0,09 (+/- 0,14)	0,00 (+/- 0,00)	0,14 (+/- 0,20)	0,00	0,77 (+/- 0,20)	0,65 (+/- 0,21)	21,85 (+/- 7,30)

De plus, cette déviation est significativement différente entre les sites d'étude. On observe une diminution continue de cette déviation depuis les sites de référence jusqu'aux sites les plus impactés (Fig. 6-7).

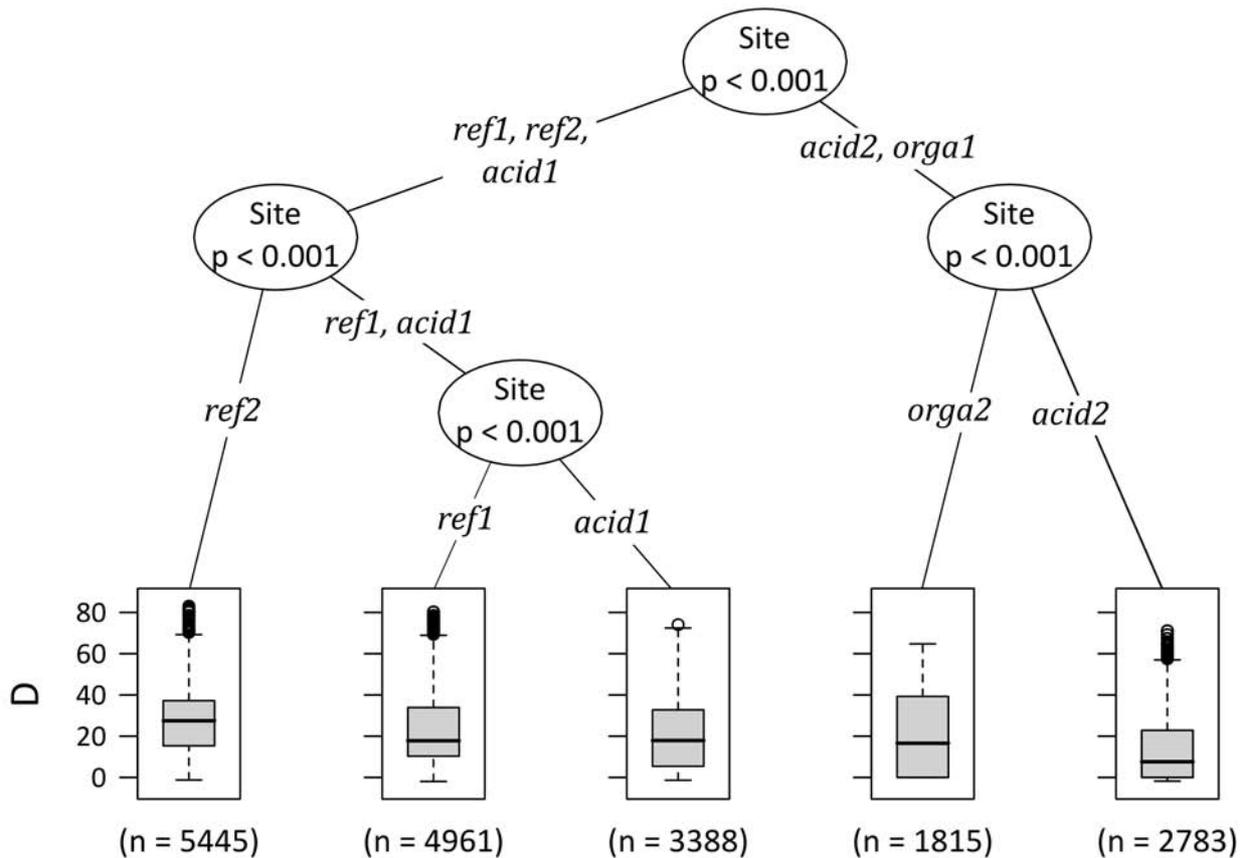


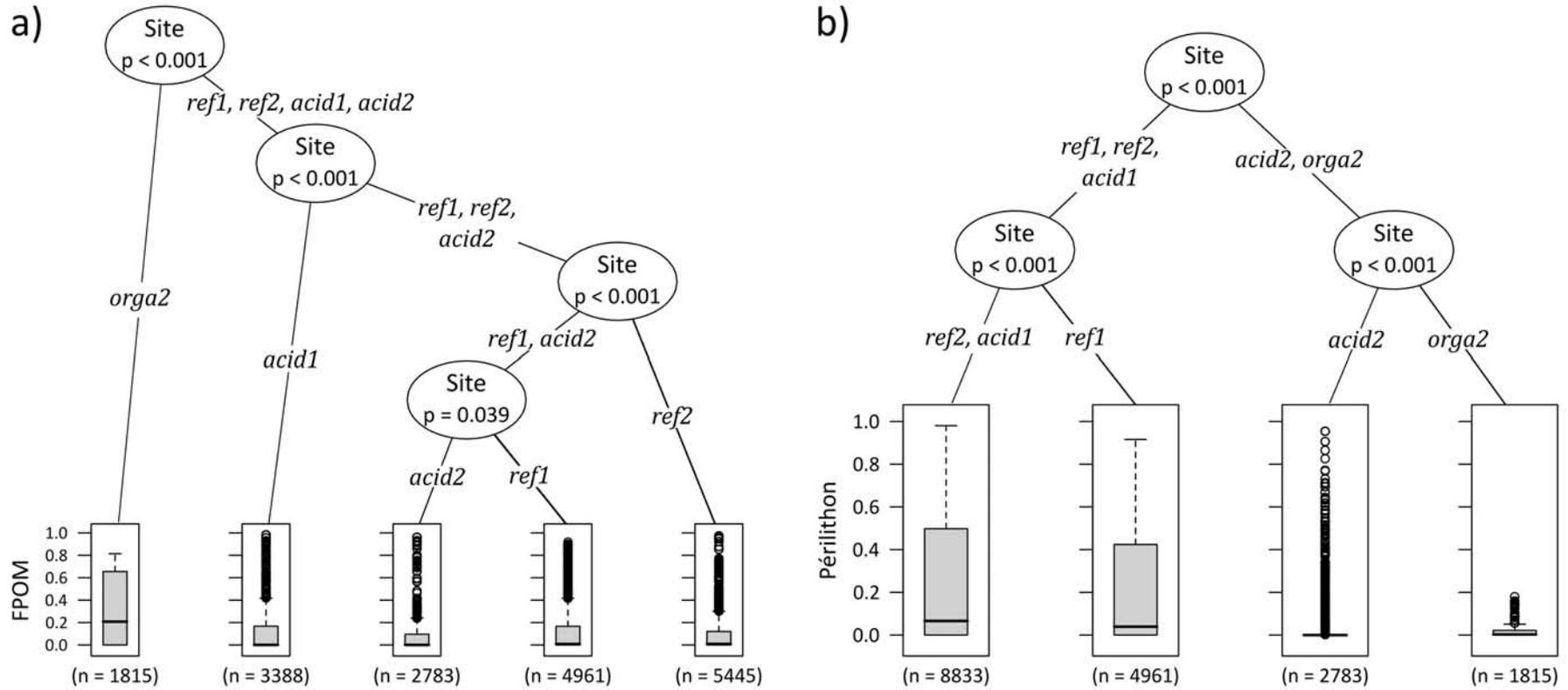
Figure 6-7. Niveaux de différence (D) entre les régimes alimentaires observés et potentiels dans les différents sites d'études. La p-value associée à l'effet « Site » est indiquée à chaque nœud de l'arbre d'inférence conditionnelle, les distributions des valeurs de D dans les groupes de sites sont représentées sous la forme de boîtes (1er, 2ème et 3ème quartiles) à moustaches (valeurs extrêmes non aberrantes), les valeurs aberrantes sont représentées par des cercles blancs, le nombre de régimes alimentaires reconstitués est indiqué en dessous des boîtes à moustaches.

La seule différence significative mise en évidence par les analyses CIT réalisées sur les profils potentiels est une plus grande utilisation du type de nourriture « animaux » dans la communauté benthique du site *acid2* (p= 0.044).

L'utilisation des régimes alimentaires estimés permet d'obtenir, pour chaque type de nourriture un classement des sites d'étude en fonction de l'utilisation de ce type de nourriture par les invertébrés échantillonnés dans ces sites (Tableau 6-VI). On peut noter en particulier une utilisation plus importante des FPOM comme source de nourriture dans le site soumis à une forte contamination organique (*orga2*) que dans les autres sites (Fig. 6-8a). Au contraire, l'utilisation du périlithon comme source de nourriture (Fig. 6-8b) est plus importante dans les sites soumis à des pressions faibles ou très faibles (*ref1*, *ref2* et *acid1*) que dans les sites subissant les pressions les plus importantes (*acid2*, *orga2*).

Tableau 6-VI Classement des sites par ordre croissant d'utilisation des cinq types de nourriture par les communautés benthiques. Résultats obtenus avec des analyses CIT (voir le texte pour plus de détails).

	Classement des sites ($p < 0.05$)
FPOM	<i>orga2 > acid1 > acid2 > ref1 > ref2</i>
Litière	<i>orga2 > ref1 > ref2 > acid1 > acid2</i>
Périlithon	<i>ref2 > acid1 > ref1 > acid2 > orga2</i>
Macrophytes	<i>ref2 > acid1 > ref1 > orga2 > acid2</i>
Animaux	<i>acid2 > orga2 > ref1 > ref2 > acid1</i>



6.4.5 – Spécialisation alimentaire

Les taxons ont un niveau de spécialisation alimentaire potentielle relativement faible ($0,35 \pm 0,31$) alors que le niveau observé de spécialisation alimentaire est significativement plus important ($0,65 \pm 0,30$; test de Wilcoxon; $p = 5,9 \times 10^{-12}$). Le niveau potentiel de spécialisation alimentaire des taxons est significativement supérieur dans les deux sites *acid2* et *orga2* (TSI'_{pot} médian = 0.59) par rapport aux sites *ref1*, *ref2* et *acid1* (TSI'_{pot} médian = 0,18 ; $p = 0,012$).

Lorsque les régimes alimentaires réalisés sont considérés, un gradient statistiquement plus discriminant est observé avec les sites impactés (*acid2*, *orga2* puis *acid1*) montrant des niveaux de spécialisation alimentaire plus élevés que les sites de référence (*ref1* puis *ref2*, Fig. 6-9).

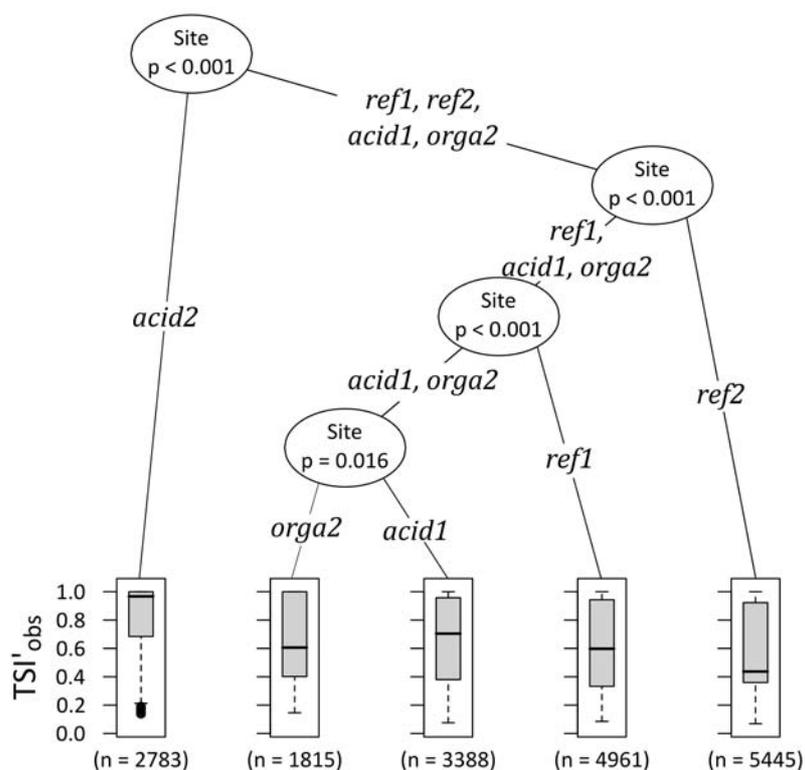


Figure 6-9. Niveaux observés de spécialisation alimentaire dans les différents sites d'études (cf. légende de la figure 6-6 pour plus de détails).

Nous avons également trouvé que l'intensité de la déviation entre régimes alimentaires potentiels et réalisés était directement liée au niveau potentiel de spécialisation des taxons (corrélation de Pearson : $r = -0,61$; $p < 2,2 \cdot 10^{-16}$).

6.4.6 – Compétition alimentaire

Les niveaux de compétition alimentaire observés dans les communautés benthiques sont relativement modérés, sauf dans le site *acid2* (Fig. 6-10). De plus, ces niveaux sont dépendants des sites d'étude considérés (cf. Fig. 6-10), ainsi les plus forts niveaux sont observés dans le site *acid2* (moyenne \pm écart-type : $0,71 \pm 0,24$), puis dans les sites de référence ($0,54 \pm 0,11$) et enfin dans les sites *acid1* et *orga2* ($0,44 \pm 0,12$).

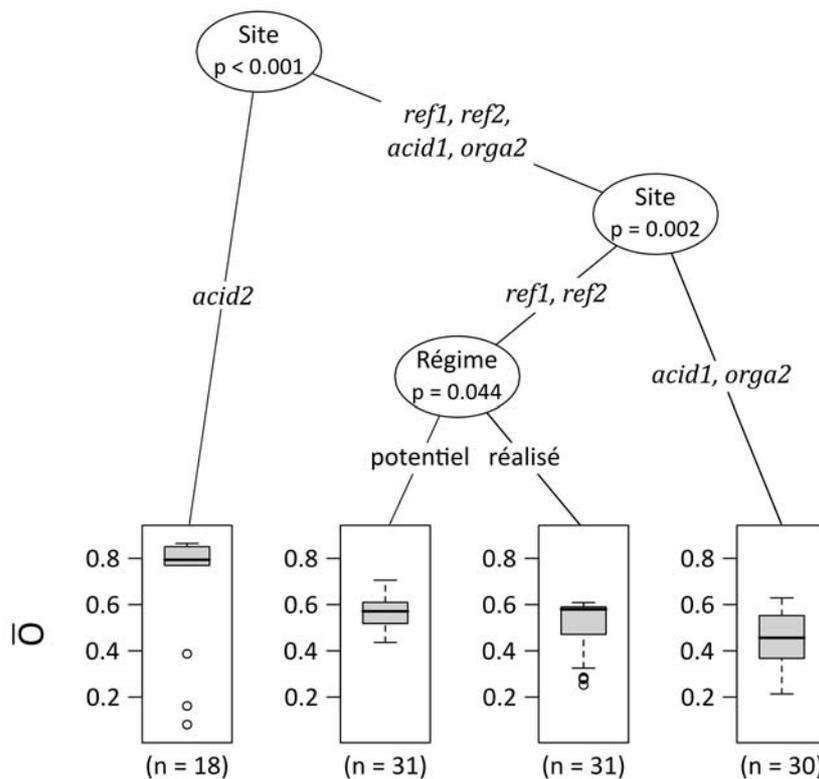


Figure 6-10. Niveaux observés de compétition alimentaire (\bar{O}) en fonction des différents sites d'étude et du type de régime alimentaire utilisé (cf. légende de la figure 6-6 pour plus de détails).

Dans les sites soumis à une pression anthropique, le niveau de compétition alimentaire inter-taxons est similaire selon que l'on considère le régime alimentaire potentiel ou le régime alimentaire réalisé. Au contraire, dans les sites de référence, il semble que la compétition inter-taxons soit légèrement plus faible en considérant les régimes alimentaires réalisés plutôt que potentiels (Fig. 6-10).

6.5 – Discussion

6.5.1 – Limitations de la méthode isotopique employée

L'estimation des taux d'enrichissement trophique (Δ) représente l'un des problèmes majeurs dans les études se proposant d'estimer le régime alimentaire d'organismes sur la base de leurs signatures isotopiques et de celles de leurs sources potentielles de nourriture (e.g. Hart & Lovvorn 2002 ; McCutchan Jr *et al.* 2003). Afin d'obtenir une estimation des régimes alimentaires la plus fiable possible, il conviendrait donc de disposer de ces valeurs de Δ pour chacun des taxons étudiés. Toutefois, pour les invertébrés aquatiques, ces valeurs de Δ ne sont déjà disponibles que pour un nombre limité de taxons (e.g. Vander Zanden & Rasmussen 2001 ; Jardine *et al.* 2005) et, de plus, ces valeurs présentent une forte variabilité (> 89 %, cf. Tableau 6-IV) liée à la sélection de taxons et de sources de nourriture utilisée (Adams & Sterner 2000 ; Jardine *et al.* 2005).

Vander Zanden & Rasmussen (2001) ont étudié quel impact pouvait avoir la variabilité des taux d'enrichissement trophiques (i) sur l'estimation de la position trophique des taxons et (ii) sur les erreurs associées aux résultats de « *mixing models* ». Leurs résultats montrent que la variabilité associée aux valeurs de $\Delta^{15}\text{N}$ et de $\Delta^{13}\text{C}$ était à l'origine d'importantes erreurs dans l'estimation du niveau trophique et de la contribution des différentes sources de nourriture au régime alimentaire d'un taxon. Ces erreurs sont d'autant plus importantes (i) chez les taxons qui ne sont pas strictement prédateurs et (ii) lorsque les sources de nourriture ont des signatures isotopiques proches (Vander Zanden & Rasmussen 2001). Les résultats obtenus dans ce chapitre corroborent les conclusions de l'étude précédemment citée. En effet, l'intégration de la variabilité des valeurs de Δ dans les modèles RF s'est traduite par des niveaux d'incertitude importants dans l'estimation de l'utilisation des différents types de nourriture par les invertébrés (Tableau 6-V). De plus, le seul

modèle montrant de mauvaises performances (*Leuctra* dans le site *acid2*) correspond au pire scénario décrit par Vander Zanden & Rasmussen (2001) : un consommateur primaire dont les sources de nourriture potentielles ont des signatures isotopiques similaires (algues/FPOM et litière/bryophytes ; cf. Fig. 6-6c).

Afin d'améliorer l'étude des réseaux trophiques, il est possible de mesurer, pour chaque espèce étudiée, les valeurs de Δ . Ceci peut être réalisé, soit en nourrissant en laboratoire les organismes avec des sources de nourriture ayant des signatures isotopiques connues (Tibbets, Wheeless & Rio 2008), soit en mesurant les signatures des contenus digestifs des organismes (Jardine *et al.* 2005). Ces approches, toutefois, sont particulièrement lourdes à mettre en œuvre du fait (i) de la nécessité d'acclimater en laboratoire un grand nombre de taxons différents pour travailler à l'échelle d'une communauté ou (ii) de la collecte et de la dissection d'un très grand nombre d'individus pour obtenir une masse suffisante (≈ 1 mg de masse sèche) de contenus digestifs pour réaliser les analyses isotopiques. De plus, pour un taxon donné, nourri avec un type de nourriture donné, les valeurs de Δ peuvent encore varier en fonction de l'âge et de l'état physiologique de ce taxon (e.g. période de jeûne ou non, période de mue ou non ; Doi *et al.* 2007a ; Tibbets *et al.* 2008). Il convient donc (même si des valeurs plus précises de Δ sont à disposition), de prendre en considération – comme cela a été réalisé dans les modèles RF présentés dans ce chapitre – la variabilité de ces valeurs d'enrichissement trophique.

Afin de mieux discerner les contributions relatives de sources de nourriture ayant des signatures similaires dans le régime alimentaire d'un taxon, deux approches isotopiques peuvent être employées : les expériences en abondance enrichie et l'utilisation d'autres isotopes que ceux du carbone et de l'azote. L'expérience isotopique présentée dans ce chapitre est une expérience dite en « abondance naturelle », c'est à dire que les concentrations des sources de nourriture en formes isotopiques lourdes (^{13}C ou ^{15}N) sont celles naturellement présentes, et donc très faibles (Tableau 6-1). Dans un expérience isotopique en abondance enrichie (e.g. §3.7 dans Peterson 1999), une des sources de nourriture est très fortement enrichie (à des niveaux jamais rencontrés en conditions naturelles), généralement avec la forme lourde d'un élément, avant d'être intégrée dans l'écosystème (e.g. de la litière organique « marquée » avec du ^{15}N dans un cours d'eau). Ceci permet de suivre directement le devenir de cette source de nourriture dans les réseaux

trophiques. Bien que les isotopes du carbone et de l'azote soient les plus utilisés dans les études portant sur les réseaux trophiques (Füreder *et al.* 2003 ; Li & Dudgeon 2008 ; Bergfur *et al.* 2009), d'autres éléments possèdent des formes isotopiques qui peuvent être utilisées dans de telles études comme le soufre (McCutchan Jr *et al.* 2003), ou l'hydrogène (Finlay, Doucett & McNeely 2010). L'intégration de ces éléments dans l'analyse isotopique des réseaux trophiques (voir Peterson & Howarth 1987 pour une utilisation combinée des isotopes du carbone, de l'azote et du soufre) pourraient permettre de lever les incertitudes liées à la similarité des signatures isotopiques $\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$ entre différents types de nourriture (voir par exemple les figures 6-3 et 6-6).

6.5.2 – Transfert de la matière organique au sein des communautés benthiques

Dans nos sites d'étude, certaines sources de nourriture présentent des signatures isotopiques ($\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$) proches (cf. Figs. 6-3 et 6-6). Si cette proximité peut devenir gênante pour l'interprétation des résultats en termes d'estimation des régimes alimentaires des invertébrés, son étude peut toutefois être intéressante en tant que telle. En 1980, Vannote *et al.* ont formalisé – au sein du « *river continuum concept* » (RCC, Fig. 6-11) – les relations entre (i) les stratégies biologiques sélectionnées par les communautés benthiques, (ii) les sources d'énergie et de matière organique au sein du système et (iii) les caractéristiques géomorphologiques et physiques des cours d'eau le long de leur continuum longitudinal.

Dans les petits cours d'eau de tête de bassin, similaires à ceux étudiés dans ce travail, il est ainsi proposé que la matière organique allochtone (e.g. chute de feuilles mortes ; Webster *et al.* 1999) représente une partie importante (Wallace *et al.* 1999 ; Moore *et al.* 2004), de l'apport en matière organique de ces systèmes alors que la production primaire serait limitée par les conditions environnementales de ces cours d'eau (e.g. fort ombrage, vitesse de courant importante et faibles températures). Cette matière organique particulière grossière (CPOM) serait alors dégradée en FPOM par des micro-organismes (e.g. bactéries, hyphomycètes) et les macro-invertébrés ayant un mode d'alimentation de type broyeur (Fig. 6-11 ; Gessner, Chauvet & Dobson 1999).

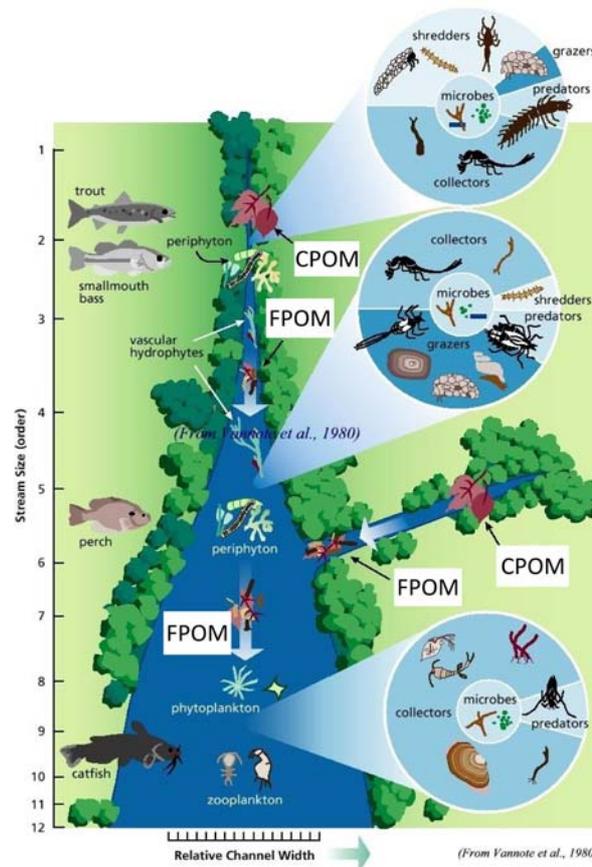


Figure 6-11. Relation proposée par Vannote et al. (1980) entre la taille des cours d'eau et les changements progressifs de structure et de caractéristiques fonctionnelles des communautés d'invertébrés benthiques. Voir le texte pour plus de détails.

Nos résultats semblent confirmer cette hypothèse du RCC pour les sites de référence et le site *orga1*. En effet, sur ces sites les litières et les FPOM présentent des signatures isotopiques très similaires aussi bien pour le carbone que pour l'azote (Figs. 6-6a, b et e), ce qui suggère que les FPOM pourraient en effet provenir de la dégradation des litières. Au contraire, dans les deux sites acidifiés, les signatures isotopiques de ces deux types de nourriture (FPOM et litières) sont très éloignées, à des extrémités différentes des dendrogrammes (Figs. 6-5c et d). Ces résultats laissent suggérer que dans des milieux acidifiés, le processus de dégradation de la matière organique allochtone serait fortement altéré, puisque les FPOM semblent bien plus proches, du point de vue isotopique, de la matière organique autochtone (e.g. périlithon et algues filamenteuses) que de la

matière organique allochtone (i.e. litière ; cf. Fig. 6-6). Ces résultats, donnant des indications sur l'origine des FPOM, sont complémentaires de ceux obtenus dans des études précédentes réalisées dans le même bassin versant (Dangles *et al.* 2004 ; Baudoin *et al.* 2008). Ces études démontraient que le processus de dégradation de la litière était très fortement ralenti à cause des effets néfastes de l'acidification (faibles pH et alcalinité, fortes concentrations en aluminium) sur la structure des communautés d'hyphomycètes (Baudoin *et al.* 2008) colonisant les litières organiques. Les effets de l'acidification sur les communautés fongiques réduirait alors l'appétence des litières organiques pour les broyeurs (Larrañaga *et al.* 2010), ce qui en combinaison avec les effets toxiques de l'acidification modifierait la composition des communautés d'invertébrés (Dangles *et al.* 2004).

Le trait « régime alimentaire potentiel » ne permet de mettre en évidence qu'une augmentation de l'utilisation de sources de nourriture animales dans le site *acid2* par rapport aux autres sites d'étude; un résultat confirmé par les régimes alimentaires « réalisés ». Les invertébrés prédateurs sont affectés par l'acidification, le nombre de prédateurs retrouvés dans les cours d'eau diminuant avec une acidification croissante (Townsend, Hildrew & Francis 1983 ; Guérold *et al.* 2000). Toutefois cette diminution est moins importante que celle observée pour les invertébrés appartenant à d'autres FFGs, en particulier les racleurs (Townsend *et al.* 1983 ; Guérold *et al.* 2000). En effet, les taxons considérés comme racleurs disparaissent de manière systématique des cours d'eau les plus acidifiés (pH < 5) alors que les richesses en prédateurs et en broyeurs restent relativement importantes (entre 5 et 10 taxons pour chacun de ces FFG ; Guérold *et al.* 2000). Ces tendances, retrouvées dans nos résultats, peuvent expliquer l'augmentation de l'importance relative de la source de nourriture « animaux » dans les régimes alimentaires de la communauté benthique du site *acid2*. De plus, l'approche isotopique indique que l'utilisation de la ressource alimentaire animale est plus élevée non seulement dans le site *acid2*, mais également dans le site *orga2* (Tableau 6-VII), en cohérence avec les résultats de Rawer-Jost *et al.* (2000). Ces auteurs ont en effet montré que pour différents types de pressions anthropiques (e.g. acidification, contaminations organique et métallique), la proportion de taxons prédateurs dans les communautés augmentait.

Malgré la persistance des taxons broyeur dans les sites acidifiés, l'utilisation de la ressource litière semble, d'après les analyses isotopiques, plus faible dans les sites acidifiés (particulièrement dans le site *acid2*) que dans les sites de référence. Ces résultats semblent de nouveau confirmer le ralentissement du processus de dégradation des litières dans les cours d'eau acidifiés (Dangles *et al.* 2004 ; Baudoin *et al.* 2008).

Le périlithon est un ensemble d'algues (e.g. diatomées), de micro-organismes hétérotrophes (e.g. bactéries et champignons) et de fins détritiques piégés dans une structure complexe. Le périlithon constitue une source de nourriture plutôt caractérisée par une meilleure qualité (en termes de composition élémentaire) que d'autres types de nourriture (e.g. litière organique, FPOM ; Cummins & Klug 1979). Toujours d'après l'analyse isotopique, l'utilisation de cette ressource alimentaire est très fortement réduite dans les sites les plus impactés (*acid2* et *orga2*) par rapport aux sites de référence (*ref1* et *ref2*) ou subissant un niveau de pression plus faible (*acid1*). Dans les cours d'eau acidifiés, nous avons vu que les racleurs, se nourrissant préférentiellement du biofilm, voyaient leur présence diminuer de manière importante (Guérol *et al.* 2000), en cohérence avec la plus faible utilisation de cette ressource alimentaire observée dans le site *acid2*. Les taxons racleurs semblent donc particulièrement sensibles à l'acidification des cours d'eau (Rawer-Jost *et al.* 2000), mais la diminution de l'utilisation du périlithon comme source de nourriture pourrait également s'expliquer par une diminution de la qualité alimentaire de cette ressource dans les cours d'eau acidifiés (cf. Chapitre VII). Nous avons également observé, lors de l'analyse isotopique, une diminution de l'utilisation du périlithon et une importante augmentation de l'utilisation des FPOM dans la communauté benthique du site *orga2*. Ce site est caractérisé par de fortes concentrations en matières en suspension (cf. Tableau 2-VIII et Figure 2-12). Cette importante quantité de MES favoriserait ainsi les taxons se nourrissant des FPOM en suspension (filtreurs) ou sédimentées (mangeurs de sédiment fin) au détriment des taxons racleurs dont la ressource alimentaire serait, du fait du colmatage, devenue inaccessible (e.g. Bunn 1988). La contamination organique conduirait ainsi à une structure trophique (i.e. dominance des taxons collecteurs) similaire à ce qui pourrait être observé naturellement bien plus en aval le long du gradient longitudinal (Fig. 6-11 ; Vannote *et al.* 1980).

6.5.3 – Pressions anthropiques et structuration trophique des communautés benthiques

Jusque récemment, la variabilité inter-taxons – évaluée grâce à des bases de données de valeurs potentielles (ou moyennes) de traits (e.g. Usseglio-Polatera *et al.* 2000a ; Vieira *et al.* 2006 ; Kattge *et al.* 2011) – a principalement été mise en avant afin d'élucider les mécanismes d'assemblage des communautés (Weiher & Keddy 1995 ; Poff 1997) alors que la variabilité intra-spécifique était, elle, largement négligée (Violle *et al.* 2012). Ces dernières années, il est devenu de plus en plus évident que cette variabilité intra-spécifique avait, en réalité, un rôle non négligeable dans les mécanismes de structuration des communautés (Blanck & Lamouroux 2007 ; Albert *et al.* 2010b ; Berg & Ellers 2010 ; Jung *et al.* 2010 ; Bolnick *et al.* 2011 ; Violle *et al.* 2012).

Les déviations entre régimes alimentaires potentiels et réalisés que nous avons observées dans ce travail (Tableau 6-V), particulièrement en conditions de référence (Fig. 6-7), indiquent que les invertébrés benthiques sont capables d'une certaine plasticité alimentaire (Friberg & Jacobsen 1994 ; Dangles 2002).

Cette plasticité peut également traduire des différences de régime alimentaire liées au développement des organismes (e.g. Felten *et al.* 2008); différences dont l'amplitude peut dépasser celle existant entre taxons (Woodward & Hildrew 2002a). Par exemple, les larves et les adultes du coléoptère *Limnius* (Fig. 6-3b) utilisent les mêmes ressources alimentaires (FPOM et périlithon) mais la composante dominante de leur régime alimentaire est inversée (Tableau 6-V), les larves se nourrissant majoritairement de périlithon (77%) alors que les adultes préfèrent les FPOM (64%). Bien que les régimes alimentaires des taxons échantillonnés sur le site *orga1* n'aient pas pu être reconstitués, on peut noter que les deux classes de taille de *Gammarus* retrouvées dans ce site occupent des positions bien distinctes dans le plan isotopique (Fig. 6-3e). Les gammares de plus grande taille ($\approx 20\text{mm}$) ont des signatures en $\delta^{15}\text{N}$ plus élevées que celles des gammares de plus petite taille ($\approx 10\text{mm}$). Si l'on considère qu'un $\delta^{15}\text{N}$ plus élevé accompagne une augmentation du niveau trophique du taxon correspondant, on peut donc supposer que les gammares prélevés dans ce site d'étude passent à un régime alimentaire plus carnivore au fur et à mesure de leur développement.

Ces résultats confirment les observations déjà réalisées sur les contenus digestif de cet amphipode dans le même secteur d'étude (Felten *et al.* 2008).

Les mécanismes d'assemblages des communautés sont classiquement décrits par deux grandes étapes (Fig. 6-12 ; e.g. Jung *et al.* 2010) : (i) la sélection de taxons adaptés aux conditions environnementales locales (i.e. la sélection de taxons présentant des caractéristiques bio-écologiques voisines et compatibles avec les caractéristiques de l'environnement) et (ii) l'élimination, du fait de la compétition, de taxons présentant des niches écologiques trop similaires (i.e. la différenciation de niches).

L'indice de Pianka, utilisé dans cette étude, a permis d'estimer le recouvrement moyen des régimes alimentaires des taxons (un estimateur de la compétition alimentaire subie par chaque taxon) dans les communautés. Les résultats obtenus permettent de confirmer que la plasticité (génétique ou phénotypique) alimentaire permet, au sein des communautés d'invertébrés benthiques, de réduire légèrement la pression de compétition moyenne subie par les taxons présents dans les sites de référence (Fig. 6-12a).

Au contraire, les communautés benthiques soumises à de fortes pressions anthropiques (e.g. provenant des sites *acid2* et *orga2*) ont montré des niveaux de déviation entre régimes alimentaires potentiels et réalisés relativement faibles (Fig. 6-7).

Les invertébrés constituant ces communautés semblent avoir des spectres alimentaires plus restreints (i.e. une plus forte spécialisation) et une plus faible plasticité alimentaire (i.e. faibles valeurs de déviation) que ceux provenant des sites de référence. Compte tenu de cette plus faible plasticité, la capacité des taxons à moduler la pression de compétition alimentaire qu'ils subissent devrait donc être également amoindrie. De fait, aucune diminution significative du niveau de compétition alimentaire subi par les taxons n'a été trouvée en considérant les régimes alimentaires réalisés à la place des régimes alimentaires potentiels (Fig. 6-10).

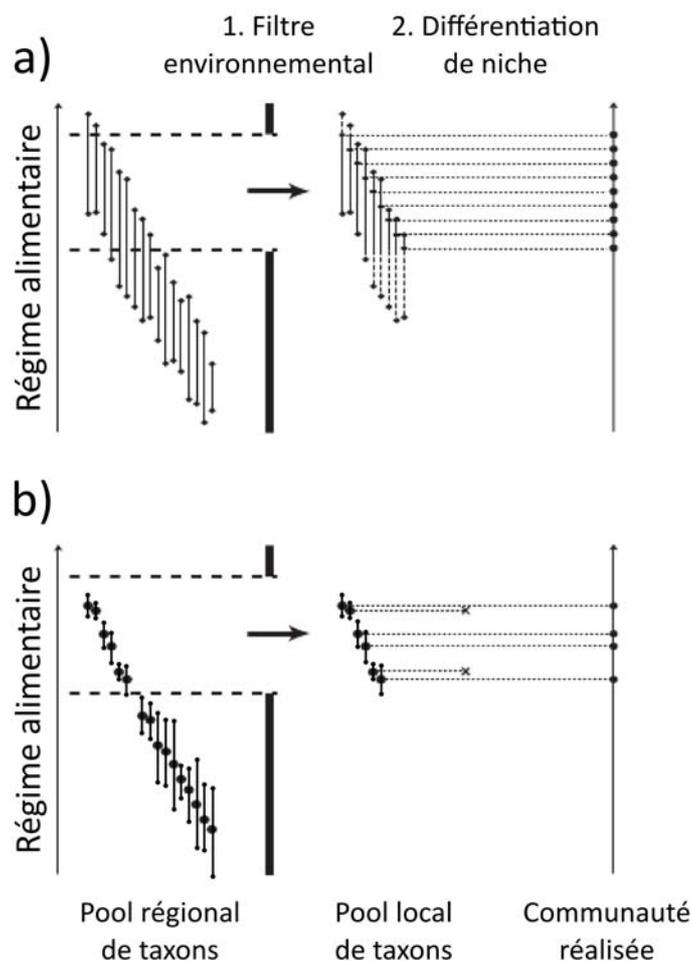


Figure 6-12. Application du modèle conceptuel décrivant le rôle de la plasticité des traits dans les processus d'assemblages des communautés de Jung et al. 2010 à l'étude du rôle des pressions anthropiques dans la plasticité alimentaire des communautés benthiques. Les cercles noirs représentent les taxons et les barres verticales représentent l'étendue de la plasticité alimentaire des taxons. a) conditions de référence (plasticité alimentaire présente) b) conditions de pressions anthropiques (plasticité alimentaire réduite). Voir le texte pour plus de détails

Un nombre croissant d'auteurs (voir par exemple Violle *et al.* 2012) suggère que la variabilité intra-spécifique – qui peut être très importante (> 30 % de la variabilité totale ; Blanck & Lamouroux 2007 ; Albert *et al.* 2010a ; Jung *et al.* 2010) – permettrait aux organismes de modifier leurs valeurs de traits pour (i) s'adapter aux conditions locales (i.e. filtre environnemental) et (ii)

limiter la compétition (i.e. différenciation de niche ; Fig. 6-12a). Notre étude semble montrer que, dans les communautés benthiques en conditions de référence, la compétition alimentaire peut être légèrement, mais significativement, diminuée du fait de la plasticité alimentaire des taxons, ce qui permettrait la coexistence d'un plus grand nombre de taxons dans les sites subissant de faibles pressions anthropiques.

Toutefois, ce mécanisme semble moins bien fonctionner dans les sites soumis à des pressions anthropiques importantes (e.g. *acid2* et *orga2*). On peut alors conceptualiser les effets des pressions anthropiques sur les règles d'assemblages, et plus particulièrement sur la structure trophique, des communautés benthiques. Les fortes pressions anthropiques, en augmentant la pression de sélection du filtre environnemental, ne permettraient le franchissement de ce filtre que pour un faible nombre de taxons particulièrement bien adaptés aux conditions locales (Statzner *et al.* 2004). Ces taxons, plutôt spécialisés (cf. Fig. 6-9), ne pourraient alors limiter que faiblement, voire pas du tout, l'intensité de la compétition inter-taxons (e.g. alimentaire ; Fig. 6-12b). Les pressions anthropiques renforceraient alors non seulement l'action du filtre environnemental mais également celle du filtre biotique (car la compétition, non limitée par la plasticité alimentaire, serait plus intense). Cette action serait d'autant plus forte que les taxons tolérants aux pressions anthropiques seraient également de bons compétiteurs (Emery, Ewanchuk & Bertness 2001 ; Devin & Beisel 2007).

L'une des conséquences de cette hypothèse est que la structure des réseaux trophiques constitués dans des conditions de fortes pressions anthropiques serait fortement simplifiée. En comparaison avec les communautés provenant des sites de référence, les communautés provenant de sites subissant des pressions anthropiques seraient caractérisées, par (i) un plus petit nombre de taxons, (ii) un niveau de spécialisation potentielle relativement élevé, (iii) une plus faible plasticité alimentaire et (iv) des régimes alimentaires plutôt non recouvrants (Fig. 6-12b). Lorsque l'on confronte cette hypothèse avec les résultats obtenus sur les sites impactés (*acid1*, *acid2* et *orga2*), on remarque effectivement que la communauté benthique du site *orga2* répond parfaitement à ces critères et que celles des sites *acid1* et *acid2* y répondent au moins partiellement (cf. Tableau 6-VII).

Tableau 6-VII. Test du concept de renforcement du filtre biotique par les pressions anthropiques sur les cinq sites d'études considérés dans l'analyse isotopique. Les valeurs données (moyenne \pm écart-type) correspondent aux estimateurs de richesse (obtenue sur l'ensemble des douze campagnes mensuelles), de la spécialisation des taxons (TSI'), de la plasticité (D) et de la compétition (\bar{O}) pour le trait « sources de nourriture ».

site	Richesse	TSI' _{pot}	D	\bar{O}_{obs}
<i>ref1</i>	39 \pm 6	0.30 \pm 0.25	24.01 \pm 19.94	0.50 \pm 0.13
<i>ref2</i>	46 \pm 6	0.20 \pm 0.12	28.93 \pm 17.45	0.51 \pm 0.12
<i>acid1</i>	29 \pm 6	0.34 \pm 0.28	22.57 \pm 19.15	0.43 \pm 0.14
<i>acid2</i>	21 \pm 4	0.63 \pm 0.40	15.28 \pm 19.46	0.75 \pm 0.25
<i>orga2</i>	20 \pm 4	0.52 \pm 0.45	19.77 \pm 18.57	0.42 \pm 0.13

Les sites *acid2* et *orga2* sont caractérisés par des niveaux de richesse taxonomique (estimée à partir des trois réplicats sur graviers lors des douze campagnes de l'étude communautaire, cf. chapitre V) réduits environ de moitié par rapport aux sites de référence (Tableau 6-VIII). Les niveaux de spécialisation potentielle de leurs taxons sont environ deux fois plus élevés (Tableau 6-VIII) et l'intensité de la déviation entre régimes alimentaires potentiels et observés (un estimateur de la plasticité alimentaire) est sensiblement plus faible que dans les sites de référence (Fig. 6-7 et Tableau 6-VIII). Sur ces trois points, les observations réalisées sur les deux sites soumis à forte pression concordent avec les hypothèses posées. Pour le dernier point – le niveau de compétition entre taxons au sein des communautés – les communautés provenant des deux sites montrent des réponses différentes. Les taxons provenant du site *orga2*, montrent des régimes alimentaires réalisés moins recouvrant qu'au sein des sites de référence (Fig. 6-10 et Tableau 6-VIII), ce qui est conforme avec la théorie. Au contraire, le niveau de recouvrement des régimes alimentaires des taxons dans le site *acid2* est particulièrement élevé, supérieur de 50 % à ce qui est observé dans les sites de référence (Fig. 6-10 et Tableau 6-VIII).

Il convient toutefois de relativiser ce fort recouvrement. En effet, les taxons présents dans le site *acid2* sont essentiellement des prédateurs, très spécialisés pour une nourriture d'origine animale (cf. §6.4.4). Or, l'utilisation de cette ressource commune ne présage pas obligatoirement

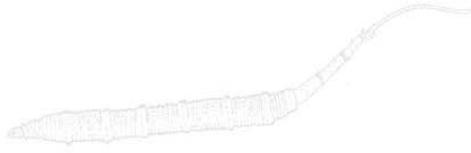
d'une compétition réellement importante entre les taxons. En effet, ce type de nourriture regroupe des types de proies très différents aussi bien par la taille (de quelques millimètres à quelques centimètres) que par le comportement (e.g. fousseurs, marcheurs, nageurs) dont la capture implique des comportements de prédation relativement différents (e.g. affût, chasse active). Ainsi, la forte compétition observée au niveau de la communauté du site *acid2* pourrait provenir en partie d'une faible résolution dans la définition des types de nourriture. Le niveau de compétition réel pourrait alors être significativement inférieur à ce qui a été mesuré.

La communauté du site *acid1* présente des caractéristiques (richesse taxonomique, TSI'_{pot} et D) intermédiaires entre celles des sites de référence et celles des sites soumis à des pressions plus fortes (Tableau 6-VIII). Ces résultats semblent également valider notre hypothèse initiale puisque le site *acid1* est caractérisé par un niveau de pression (i.e. d'acidification) modéré. En conséquence, le renforcement des filtres de sélection (Fig. 6-12) serait également modéré. Le niveau de recouvrement entre les régimes alimentaires des taxons (\bar{O}_{obs}) est, quand à lui, similaire à celui observé dans le site *orga2*. Ces résultats tendraient donc à indiquer que le renforcement du filtre biotique (i.e. l'étape de différenciation de niche) pourrait se produire dès les faibles niveaux de pression anthropique alors que l'action du filtre environnemental serait plus graduelle, en fonction de l'intensité de la pression.

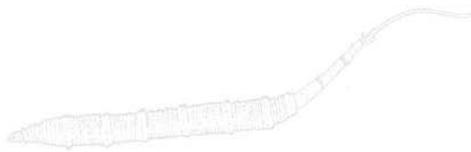
6.6 – Conclusion

L'étude présentée dans ce chapitre a permis de montrer que l'approche isotopique pour l'estimation des régimes alimentaires des invertébrés benthiques était très prometteuse. En effet, même si l'approche n'est pas encore totalement opérationnelle et qu'un travail d'optimisation reste à produire – en particulier sur la précision des valeurs estimées d'enrichissement trophique (Δ) à utiliser dans les modèles – elle permet d'ores et déjà d'apporter de précieuses informations sur les transferts de matière et d'énergie au sein des communautés benthiques et sur la structuration trophiques de ces communautés.

Nous avons posé l'hypothèse que les pressions anthropiques modifiaient les processus de structuration des communautés non seulement en agissant sur la première étape de sélection (le filtre environnemental) mais également en renforçant la pression de compétition impliquée dans la seconde étape de sélection des taxons (la différenciation de niche) par une diminution de la capacité d'adaptation des taxons. Il convient de tester plus avant cette hypothèse, notamment en intégrant dans l'analyse d'autres traits que le régime alimentaire et en étudiant de manière plus approfondie l'effet des pressions sur la spécialisation alimentaire. En effet, les résultats obtenus dans ce chapitre semblent en contradiction avec ceux obtenus sur la spécialisation alimentaire potentielle au cours de l'étude communautaire réalisée entre mars 2009 et avril 2010 (cf. Figs. 5-3c et 5-5c). Plusieurs explications peuvent être avancées : tout d'abord, les résultats obtenus dans le chapitre V, correspondent à un suivi annuel des communautés alors que les résultats obtenus dans ce chapitre ne correspondent qu'à une seule date d'échantillonnage (mars 2011). Cette différence temporelle est potentiellement d'autant plus importante que la part de variabilité de la spécialisation alimentaire expliquée par les pressions était relativement modérée (acidification : 20,8 % et contamination organique : 29,4%) et que d'autres facteurs semblent structurer cette spécialisation (e.g. relations biotiques, variabilité saisonnière). D'autre part, la mesure de spécialisation utilisée dans le chapitre V est le CSI' qui intègre l'abondance des différents taxons alors que les résultats présentés dans ce chapitre correspondent au TSI' qui n'intègre pas ces abondances., ce qui pourrait également expliqué les résultats a priori contradictoires obtenus dans ces deux études.



***Chapitre VII : Une approche
stœchiométrique du développement
des invertébrés benthiques***



Summary

Benthic macroinvertebrates play a key role in stream functioning, being both consumers and potential preys for fish or birds. Thus, understanding the factors influencing invertebrate growth and development, which are key parameters of life history, is crucial to have some insights on stream functioning. Ecological stoichiometry focuses on the balance of several nutrients (C, N, P) among the different components of food webs. This research topic has produced an interesting theory: the “growth rate hypothesis” (GRH) that proposes to mechanistically link the elemental composition (C : N : P) of organisms to their growth rate through the differential allocation of nutrients (e.g. phosphorous and nitrogen) to different intra-cellular constituents (e.g. nucleic acids or ribosoms).

In this work, we aimed at testing the potential of the stoichiometrical approach to investigate benthic macroinvertebrate development. In particular, we aimed at testing (i) if the elemental composition of benthic macroinvertebrates could be linked to their potential development rate, (ii) if the elemental composition of taxa is stable among reaches subjected to different anthropogenic pressures (i.e. acidification and organic contamination) and (iii) if the elemental requirements of taxa influence the differential composition of benthic assemblages in response to anthropogenic pressures.

We identified the nutrient ratio N : P as an efficient proxy for discriminating groups of taxa with contrasted potential rates of development: the lower the N:P ratio is, the higher the potential development rate is. Most of the studied taxa seemed to be homeostatic in different environmental conditions even if several Trichoptera species seemed to be able to adjust their elemental composition to nutrient availability. Moreover, the whole benthic assemblages from reaches subjected to different anthropogenic pressures exhibit different elemental compositions. These results suggest that the main driver of observed community stoichiometry variation seems to be more the differential taxon composition of communities than the deviation from homeostasis of individual taxa.

These results seem to indicate that not only toxicological (e.g. sensitivity to aluminium) or physiological (e.g. tolerance to low oxygen concentrations) factors but also the stoichiometric requirements of taxa could influence the response of faunal assemblages to human-induced habitat alteration.

7.1 – Introduction

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les invertébrés constituent un groupe faunistique clé dans les flux d'énergie et de matière dans les écosystème lotiques (Wallace & Webster 1996), ayant entre autres un rôle dans la consommation de la matière organique autochtone (e.g. algues, biofilm), ou la dégradation de la matière organique allochtone (e.g. litière) et une importante contribution dans la production secondaire de ces systèmes (Huryn & Wallace 2000 ; Allan & Castillo 2007). De plus, les modifications des réseaux trophiques formés par ces communautés benthiques peuvent avoir des conséquences à des échelles spatiales bien supérieures à celles de leur habitat aquatique (Woodward & Hildrew 2002b). Par exemple, les insectes amphibiotiques constituent une source importante de transfert d'énergie entre le milieu aquatique et le milieu terrestre, les adultes fournissant, de manière temporaire, une source importante de nourriture aux prédateurs riverains (e.g. pour les oiseaux ; Murakami & Nakano 2001). L'étude des facteurs pouvant modifier l'histoire de vie des invertébrés benthiques, et en particulier leur croissance et leur développement – des paramètres centraux de l'histoire de vie (Arendt 1997) – semble donc particulièrement importante pour appréhender le fonctionnement de ces écosystèmes (Imholt *et al.* 2010).

Du point de vue des traits biologiques « potentiels », le développement des invertébrés peut être décrit par deux traits complémentaires : la « durée du cycle de vie » et le « nombre de génération(s) par an » ou voltinisme (cf. Chapitre II). Dans les chapitres précédents, il a été montré que ces traits réagissaient fortement à la présence de pressions anthropiques (Chapitres III et V). La croissance et le développement des invertébrés benthiques sont souvent étudiés avec des mesures biométriques. Une telle étude a été initiée dans le cadre de ce travail de thèse mais n'a, pour le moment, pu être menée à terme et ne sera donc pas présentée dans ce manuscrit. Notre objectif est donc de tester une autre approche, la stœchiométrie écologique (Elser *et al.* 1996), qui définit de nouveaux traits, les ratios stœchiométriques et qui semble être une approche très prometteuse pour étudier la croissance des organismes.

La stœchiométrie écologique est une discipline basée sur le principe de la conservation de la matière et qui étudie plus particulièrement l'équilibre de plusieurs éléments – par exemple le carbone (C), l'azote (N) et le phosphore (P) – dans les relations écologiques, notamment les relations nourriture-consommateurs (Elser *et al.* 1996). L'application de ce concept a permis des avancées significatives dans l'étude des zones pélagiques dans des domaines allant de la dynamique des populations à l'étude des cycles bio-géochimiques (Sterner & Elser 2002), mais est relativement récente dans les systèmes benthiques d'eau douce (Stelzer & Lamberti 2002 ; Cross *et al.* 2005 ; Frost, Cross & Benstead 2005).

L'azote et le phosphore sont des éléments limitant pour le développement des organismes (Main, Dobberfuhl & Elser 1997). Alors que l'azote est souvent présent en quantité relativement importante dans un certain nombre de composants cellulaires (e.g. protéines, acides nucléiques), le phosphore est surtout abondant dans les os (vertébrés), les phospholipides membranaires et les acides nucléiques (tous animaux). Chez les invertébrés, les variations de la quantité de phosphore seraient majoritairement attribuables aux variations de contenus en acides nucléiques et plus particulièrement en ARN ribosomiques (Elser *et al.* 1996). La synthèse protéique dépendrait plus du nombre de ribosomes (nécessitant donc une relativement « grande » quantité de phosphore) que de leur efficacité (Weider *et al.* 2005), ce qui implique que la croissance et le développement des organismes seraient également limités par le nombre de ces ribosomes.

La limitation de l'activité ribosomale totale par certaines carences dans les apports en nutriments (en particulier en phosphore), assurés par l'alimentation est à la base de l'hypothèse du taux de croissance ou « *Growth Rate Hypothesis* » (GRH, Elser *et al.* 1996) qui lie, dans une relation tri-parties (i) le taux de croissance des organismes à leurs concentrations en (ii) ARN ribosomiques et en (iii) phosphore (Elser *et al.* 1996). La figure 7-1 illustre le principe de cette théorie au niveau cellulaire. Des cellules (ou organismes) ayant un fort taux de croissance (Fig. 7-1c) mettraient en place une importante « machinerie » de synthèse des protéines. Cette « machinerie » est majoritairement composée d'ARN ribosomiques riches en phosphore.

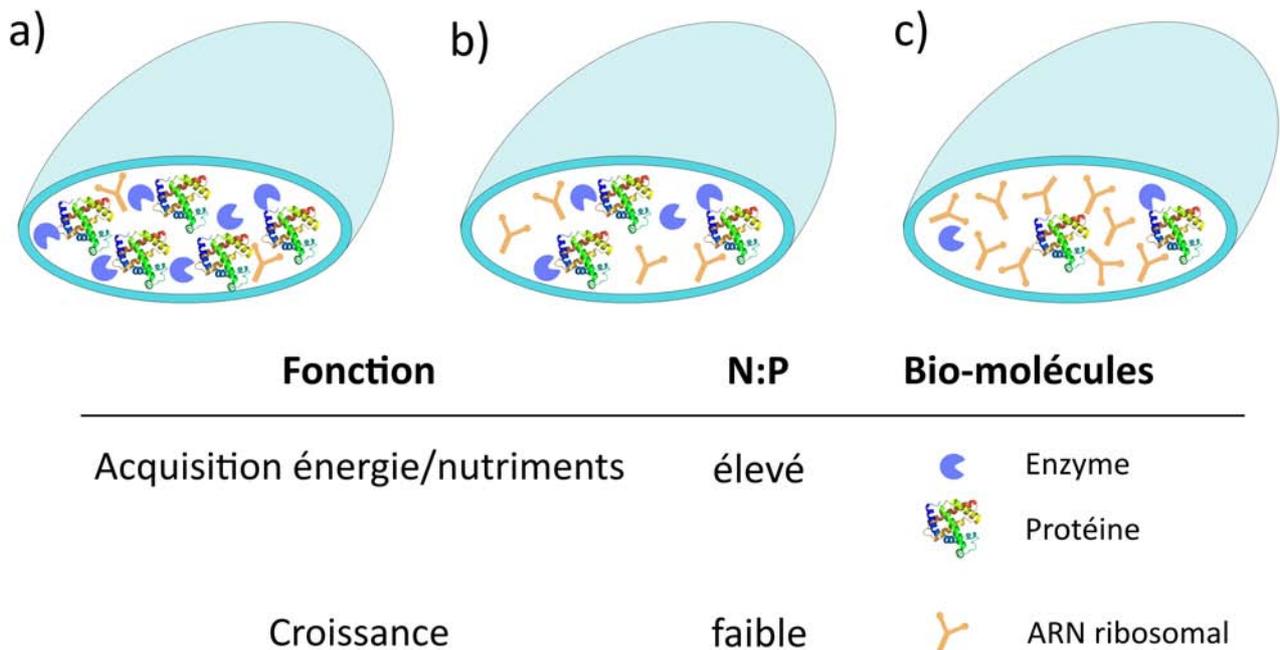


Figure 7-1. Trois stratégies de croissance et leurs conséquences au niveau de la répartition des bio-molécules et de la stœchiométrie (ratio N:P) dans les cellules. a) croissance lente, b) croissance modérée et c) croissance rapide (d'après Arrigo 2005)

En conséquence, le ratio N : P de ces cellules (ou organismes) est faible et le maintien de cette fonction de croissance devrait nécessiter une quantité de phosphore importante, donc des sources de nourriture présentant de faibles ratios N : P. Au contraire, les cellules d'organismes caractérisés par un faible taux de croissance (Fig. 7-1a) assureraient principalement des fonctions de maintenance à l'aide d'une forte proportion de bio-molécules telles que des protéines ayant un ratio N : P plus élevé que les ARN ribosomiaux (Arrigo 2005).

Cette hypothèse a été vérifiée pour la première fois chez des espèces de Daphnies (Main *et al.* 1997) avant d'être validée sur un plus grand nombre de taxons (Elser *et al.* 2003 ; Weider *et al.* 2005). Mais jusque très récemment, les études portant sur la stœchiométrie écologique en général, et le test de la GRH en particulier, ne s'intéressaient que peu aux communautés benthiques des cours d'eau (Frost *et al.* 2002 ; Stelzer & Lamberti 2002 ; Frost *et al.* 2005).

De manière similaire, des organismes présentant une vitesse de développement rapide nécessiteraient une importante synthèse de protéines pour assurer les changements physiologiques caractérisant le passage d'un stade au stade suivant de leur cycle biologique. On pourrait donc s'attendre à observer également une relation entre la composition élémentaire des organismes et leur vitesse de développement.

Si cette hypothèse est confirmée, des organismes présentant des taux de développement de plus en plus élevés devraient être caractérisés par un ratio N : P de plus en plus faible (Elser *et al.* 2003). Dans ce chapitre les invertébrés collectés pour l'étude isotopique (cf. Chapitre VI) ont été utilisés pour (i) tester la GRH (adaptée au développement des organismes) chez les invertébrés benthiques et (ii) comparer les réponses des communautés benthiques en termes de développement potentiel ou réalisé à deux types de pressions anthropiques (acidification et contamination organique).

7.2 – Matériel & Méthodes

7.2.1 – Terrain

Les organismes utilisés dans cette étude proviennent de l'échantillonnage réalisé pour l'étude isotopique (cf. Chapitre VI). Les individus séchés et broyés pour lesquels, après les dosages isotopiques (C & N), une masse suffisante (≈ 1 mg) était encore disponible ont été utilisés pour les dosages de phosphore (Tableau 7-1).

7.2.2 – Laboratoire

Le dosage du carbone (C) et de l'azote (N) des échantillons est réalisé pendant l'étude isotopique avec un analyseur élémentaire (cf. §6.2.3.2 : Carlo Erba NA 1500NC, Milan, Italy).

Le dosage du phosphore organique est réalisé après oxydation par du persulfate de sodium en conditions alcalines. Pour cela, 1 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH 1M) et 2,38 ml de persulfate de sodium (Na₂S₂O₈ 125 g/L) sont ajoutés soit (i) à l'échantillon séché et broyé (≈ 1 mg)

mis en suspension dans 4 ml d'eau Milli-Q, soit (ii) à un certain volume (0,00 / 0,01 / 0,02 / 0,04 / 0,08 / 0,14 ou 0,22 ml) d'une solution mère de potassium di-hydrogène phosphate (KH₂PO₄ 50 mg P/L) afin de réaliser une gamme étalon. Les solutions (échantillons et gamme) sont ensuite complétées à 10 ml avec de l'eau Milli-Q puis passées à l'étuve (120°C, 2h) pour accélérer le processus de minéralisation du phosphore.

Tableau 7-I. Plan d'échantillonnage pour l'étude stœchiométrique. Pour chaque taxon et chaque source de nourriture, le nombre d'échantillons prélevés par site est indiqué. Le nombre d'individus par échantillon est indiqué entre parenthèses pour les taxons.

	<i>ref1</i>	<i>ref2</i>	<i>acid1</i>	<i>acid2</i>	<i>orga1</i>	<i>orga2</i>
Taxons						
<i>Asellus</i>	0	0	0	0	0	3 (2)
<i>Baetis</i>	3 (12)	3 (4)	0	0	3 (5)	3 (5)
<i>Brachyptera</i>	0	3 (5)	2 (5)	0	0	0
<i>Cordulegaster</i>	1 (1)	0	3 (1)	1 (1)	2 (1)	0
<i>Ephemerella</i>	3 (29)	3 (15)	0	0	0	0
<i>Erpobdella</i>	0	0	0	0	0	3 (1)
<i>Gammarus</i>	3 (4)	0	0	0	3 (3)	0
<i>Hydropsyche</i>	2 (1)	3 (1)	0	0	3 (1)	0
<i>Isoperla</i>	3 (6)	0	0	0	0	0
<i>Leuctra</i>	0	3 (20)	3 (20)	3 (25)	0	0
<i>Nepa</i>	0	0	0	0	3 (1)	3 (1)
<i>Oligochaeta</i>	0	0	0	0	3	0
<i>Perlodes</i>	2 (1)	2 (1)	0	0	0	0
<i>Plectrocnemia</i>	0	0	0	3 (7)	0	0
<i>Potamophylax</i>	3 (3)	2 (2)	3 (1)	0	0	0
<i>Protonemura</i>	0	3 (30)	0	2 (27)	0	0
<i>Rhithrogena</i>	3 (3)	2 (6)	0	0	0	0
<i>Rhyacophila</i>	0	3 (2)	3 (3)	0	0	0
<i>Sericostoma</i>	3 (2)	3 (2)	3 (2)	0	0	0
<i>Sialis</i>	0	0	0	3 (1)	0	0
Simuliini	0	3 (7)	0	0	3 (9)	3 (6)
<i>Velia</i>	0	0	0	3 (2)	0	0
Sources de nourriture						
Bryophytes	3	3	3	3	0	3
Litière	3	3	3	3	0	3
MOF	3	3	3	3	3	3
Pérlithon	3	3	3	3	0	3

Une fois les échantillons et la gamme refroidis, 2 ml de réactif combiné (H_2SO_4 : 15% v/v ; $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$, $0,5\text{H}_2\text{O}$: 2,8g/L ; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, $4\text{H}_2\text{O}$: 40g/L) et 0,5 ml d'acide ascorbique (20 g/L) sont ajoutés dans chaque tube. Après 30 minutes, 2 ml de cette solution sont mis dans des cuves et la mesure de l'absorbance à 880 nm est réalisée avec un spectrophotomètre (Specord 205, Analytik Jena, Germany). La concentration en phosphore est ensuite calculée en comparant les absorbances mesurées pour l'échantillon et pour la gamme étalon.

7.3 – Analyse des données

7.3.1 – Développement potentiel

Les traits biologiques « nombre de générations par an » et « durée du cycle de vie » ont été utilisés pour estimer la vitesse de développement potentielle des invertébrés. Dans un premier temps, une analyse multivariée adaptée au traitement des traits bio-écologiques décrits avec la technique du codage flou, a été utilisée. Cette analyse des correspondances sur codage flou (*fuzzy correspondence analysis* = FCA, Chevenet *et al.* 1994) a été réalisée sur les profils de l'ensemble des invertébrés présents dans la base nationale (cf. chapitre II) pour ces deux traits biologiques (969 taxons, 5 modalités). Une analyse de classification ascendante a ensuite été réalisée sur les coordonnées des invertébrés sur le premier plan factoriel de la FCA (distance euclidienne et algorithme d'agrégation de Ward). Suite à cette analyse, les taxons ayant des profils similaires sont regroupés en k groupes. Une variable catégorielle « taux de développement potentiel » (TDP) avec k niveaux est donc créée et sera utilisée pour étudier l'effet des pressions anthropiques prises en compte sur le rythme de développement des invertébrés benthiques.

7.3.2 – Traits stœchiométriques réalisés

Une fois les concentrations en carbone (C), azote (N) et phosphore (P) mesurées, les ratios molaires suivants ont été calculés C : N, C : P et N : P. La pertinence de l'utilisation de chacun de ces ratios élémentaires comme estimateur de la vitesse de développement a été testée en construisant un modèle de type CIT (9999 permutations, cf. §2.4.2) avec le TDP comme variable dépendante et les trois ratios (C : N, C : P et N : P) comme variables explicatives.

7.3.3 – Réponses différentielles des estimateurs du développement entre les différents sites d'étude

Les différences de qualité des sources de nourriture non animales (exprimées en termes de ratios élémentaires C : N et C : P) ont également été testées avec un modèle CIT (9999 permutations) en fonction de (i) leur nature (e.g. litière, bryophytes, FPOM) et (ii) du statut des sites d'étude (*ref*, *acid*, *orga*).

L'expression différentielle des différentes métriques de trait utilisées (TDP, ratio élémentaire) entre les sites d'étude a également été testée avec une approche de type CIT. Pour chaque métrique, un arbre CIT a été construit (9999 permutations) pour tester si ces mesures présentaient des différences inter-sites d'étude significatives et donc des différences significatives entre conditions de pressions anthropiques.

L'effet des pressions anthropiques sur les valeurs de ratio élémentaire a également été testé pour les taxons pris individuellement. Vu le faible nombre de réplicats, les invertébrés appartenant au même taxon et ayant été récoltés dans les sites de même statut (*ref*, *acid* ou *orga*) ont été regroupés et le caractère significatif de la déviation des valeurs de ratio élémentaire entre les sites de référence et les sites soumis à un (test de Wilcoxon) ou deux (test de Kruskal-Wallis) types de pressions a été testé.

7.4 – Résultats

7.4.1 – Qualité des sources de nourriture

L'analyse CIT des différents échantillons de sources de nourriture non animale a permis de montrer que la litière organique était la source de nourriture de plus mauvaise qualité élémentaire ($C : N = 38,76 \pm 8,09$; $C : P = 1505,59 \pm 1293,09$; $N : P = 36,04 \pm 26,89$) et que cette qualité ne semblait pas dépendre du site d'étude dans lequel elle avait été collectée (Fig. 7-2). Le périlithon est le type de nourriture présentant le plus faible ratio $C : N$ (Fig. 7-2a) et ce ratio ne semble pas dépendre significativement du site d'étude. Dans tous les autres cas ($C : N$ des bryophytes et FPOM ; $C : P$ et $N : P$ des bryophytes, FPOM et périlithon) le statut du site d'étude (i.e. *ref*, *acid* ou *orga*) influence significativement les valeurs de ratios élémentaires.

Les sources de nourriture prélevées dans les sites acidifiés présentent la plus faible qualité élémentaire (fortes valeurs de $C : N$, $C : P$ et $N : P$) alors que celles prélevées dans les sites avec une contamination organique avaient une meilleure qualité élémentaire que dans les sites de référence (Fig. 7-2).

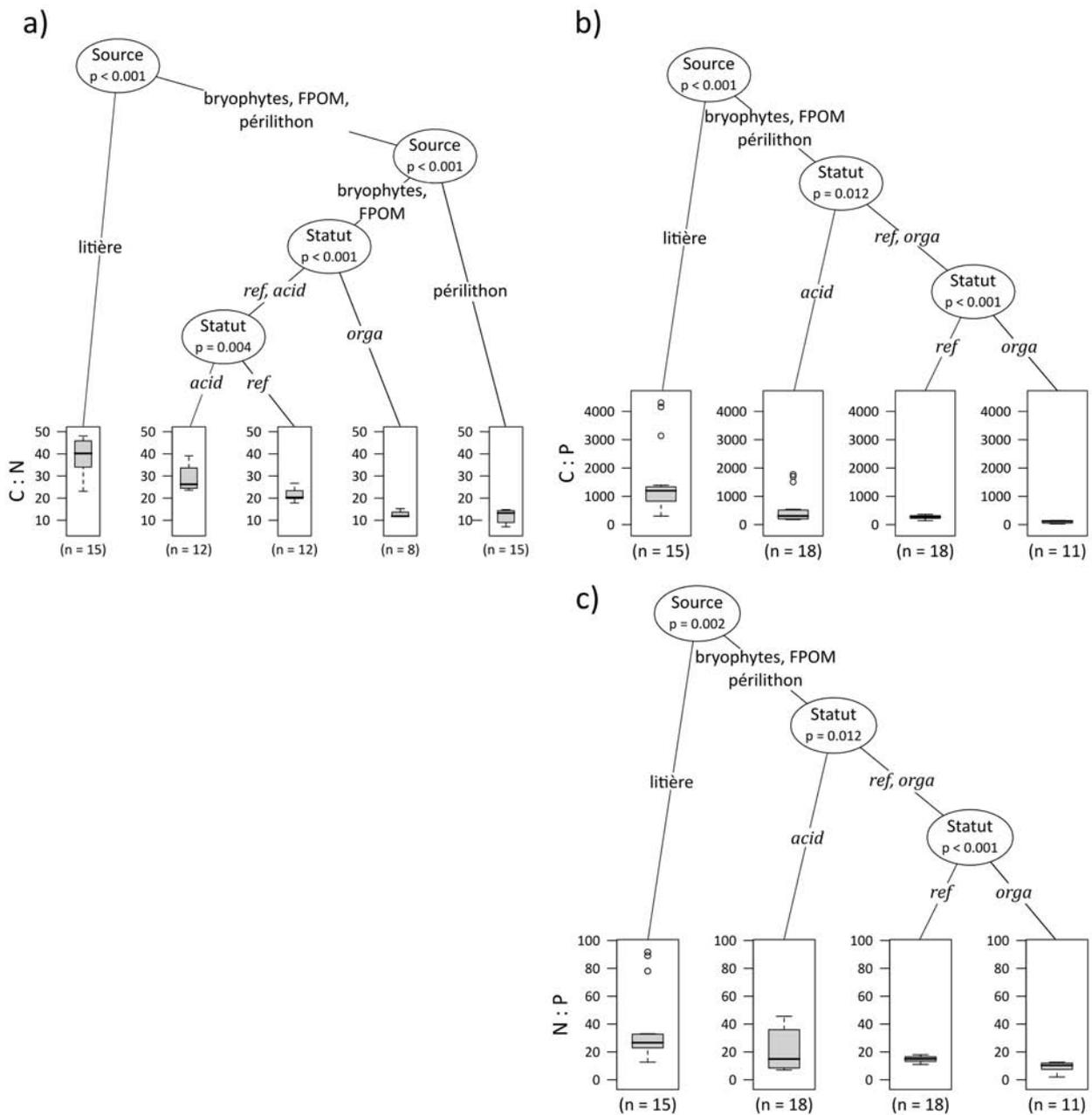


Figure 7-2. Distribution des valeurs de ratio C : N (a), C : P (b) et N : P (c) des sources de nourriture non animales en fonction du type de nourriture et des sites d'étude La p-value associée à l'effet « Site » ou « Statut » est représentée à chaque nœud de l'arbre d'inférence conditionnelle. Les distributions des valeurs de C : N ; C : P et N : P dans les groupes de sites sont représentées sous la forme de boîtes (1er, 2ème et 3ème quartiles) à moustaches (valeurs extrêmes non aberrantes), les valeurs aberrantes sont représentées par des cercles blancs. Le nombre d'échantillons dans chaque groupe de sites est indiqué en dessous des boîtes à moustaches.

7.4.2 – Vitesse de développement potentielle

L'analyse de classification réalisée à partir des profils des invertébrés benthiques pour les traits « Nombre de générations par an » et « Durée du cycle de vie » a conduit à la définition de quatre groupes de taxons présentant des vitesses de développement différentes (Fig. 7-3). L'appartenance des taxons à ces groupes permet à elle seule d'expliquer 69,54% (FCA inter-groupes suivi d'un test de Monte Carlo avec 9999 permutations; $p = 10^{-4}$) de la variabilité inter-taxons dans les profils des deux traits étudiés.

Un premier groupe de taxons caractérisés par un faible nombre de générations par an et une durée de vie longue (Fig. 7-3), est considéré comme étant à développement lent (DL). Deux autres groupes caractérisés par une durée de vie d'un an environ et ayant généralement une seule génération par an correspondent à des taxons avec des taux de développement modérés (DM1 et DM2). Un dernier groupe, caractérisé par une durée de vie inférieure ou égale à une année et plusieurs générations annuelles, correspond à des taxons ayant un taux de développement rapide (DR). La nouvelle variable « taux de développement potentiel » (TDP) est donc une variable catégorielle à quatre niveaux : DL, DM1, DM2 et DR. Parmi les vingt-deux taxons échantillonnés, deux taxons appartiennent au groupe DL (*Cordulegaster* et *Sialis*), neuf au groupe DM1, six au groupe DM2 et cinq au groupe DR (Tableau 7-II). Sur la base des groupes TDP auxquels appartiennent les taxons pris en compte dans l'étude stœchiométrique, l'analyse par arbre d'inférence conditionnelle permet de distinguer les trois groupes de sites d'étude (Fig. 7-4).

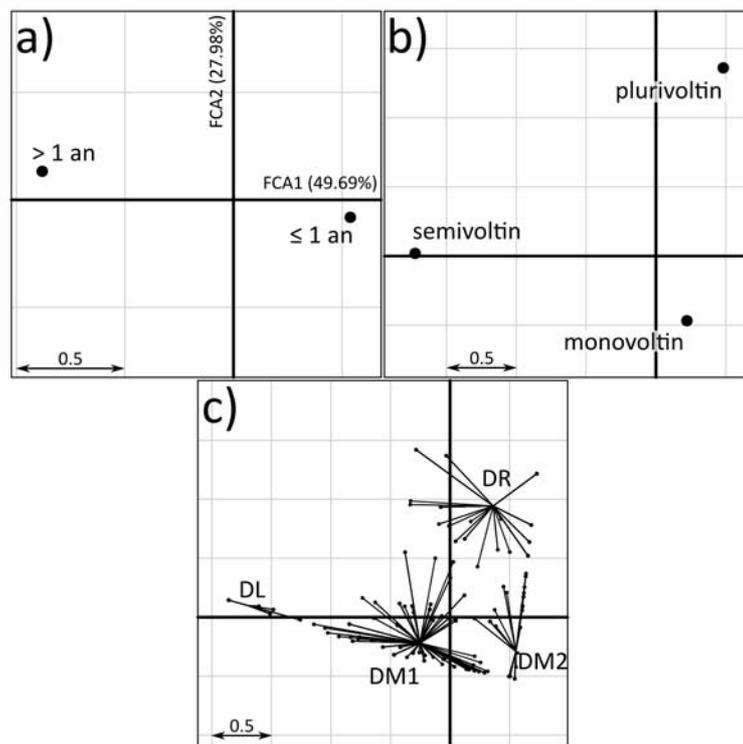
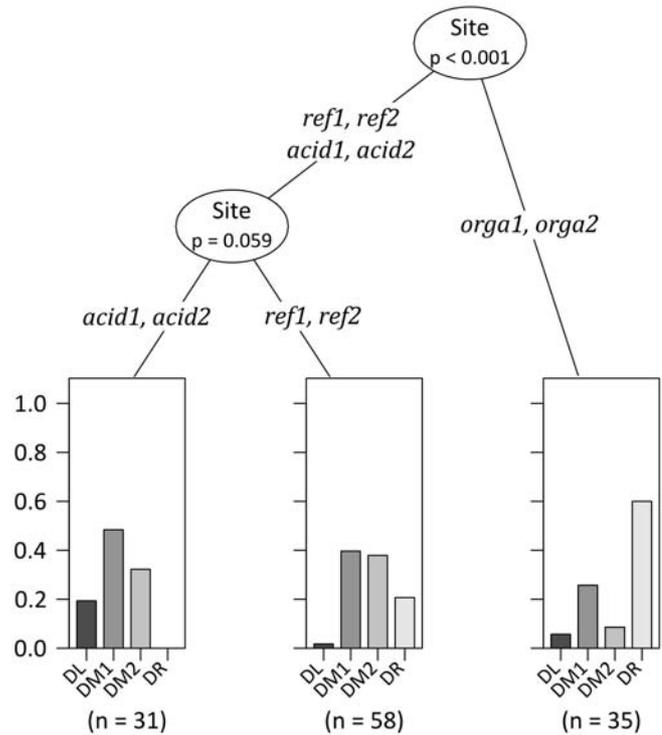


Figure 7-3. Caractérisation des quatre groupes de taxons avec des rythmes de développement différents : lent (DL), modéré (DM1 et DM2) et rapide (DR). Les positions des modalités des traits « durée du cycle de vie » (a) et « nombre de générations par an » (b) ainsi que la position des taxons appartenant aux groupes DL, DM1, DM2 et DR sont données sur le premier plan de l'analyse des correspondances sur codage flou (FCA) réalisée. Les pourcentages de variance expliquée par les deux premiers axes de l'analyse sont donnés en (a)

Tableau 7-II. Attribution des 124 individus utilisés pour l'analyse stœchiométrique aux 22 taxons et aux quatre groupes de développement potentiel (= groupes TDP).

Taxons	Groupes TDP			
	DL	DM1	DM2	DR
<i>Asellus</i>	0	0	0	3
<i>Baetis</i>	0	0	0	12
<i>Brachyptera</i>	0	0	5	0
<i>Cordulegaster</i>	7	0	0	0
<i>Ephemerella</i>	0	0	6	0
<i>Erpobdella</i>	0	3	0	0
<i>Gammarus</i>	0	0	0	6
<i>Hydropsyche</i>	0	0	8	0
<i>Isoptera</i>	0	3	0	0
<i>Leuctra</i>	0	9	0	0
<i>Nepa</i>	0	6	0	0
<i>Oligochaeta</i>	0	0	0	3
<i>Perlodes</i>	0	3	0	0
<i>Plectrocnemia</i>	0	3	0	0
<i>Potamophylax</i>	0	0	8	0
<i>Protonemura</i>	0	0	5	0
<i>Rhithrogena</i>	0	5	0	0
<i>Rhyacophila</i>	0	6	0	0
<i>Sericostoma</i>	0	9	0	0
<i>Sialis</i>	2	0	0	0
<i>Simuliini</i>	0	0	0	9
<i>Velia</i>	0	0	3	0



Les deux sites soumis à une contamination organique se distinguent très nettement des quatre autres sites avec une contribution très significativement supérieure des taxons appartenant au groupe DR ($\approx 60\%$) des taxons à développement rapide. La distinction entre les sites de référence et les sites acidifiés est moins nette ($p = 0.059$), les deux catégories de sites ayant une forte proportion de taxons à développement modéré ($\approx 80\%$). Toutefois, les sites de référence ont des communautés avec des taux de développement plus importants (DL $\approx 2\%$, DM1 $\approx 40\%$, DM2 $\approx 38\%$, DR $\approx 21\%$) que les communautés des sites acidifiés (DL $\approx 19\%$, DM1 $\approx 48\%$, DM2 $\approx 32\%$, DR = 0%).

7.4.3 – Traits stœchiométriques réalisés

7.4.3.1 – Test de la GRH

D'après les résultats obtenus par le modèle CIT (Fig. 7-5), seul le ratio N : P permet de discriminer significativement des taxons appartenant à des groupes TDP différents, les deux autres ratios n'ayant pas été retenus par l'analyse. La distinction entre les quatre groupes TDP n'est pas parfaite mais le ratio N : P permet de distinguer trois groupes de taxons : un groupe ayant un développement potentiel plutôt rapide, un groupe avec un développement modéré et un groupe avec un développement lent (Fig. 7-4). Plus le ratio N : P est bas, plus les taxons appartiennent à des groupes présentant une vitesse de développement rapide, validant ainsi la GRH (Elser *et al.* 1996) pour les invertébrés benthiques.

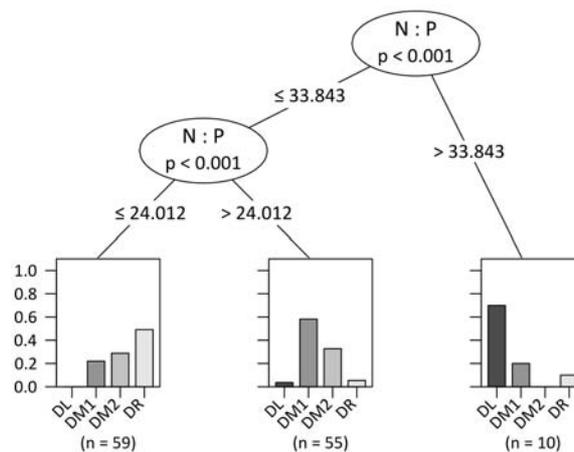


Figure 7-5. Répartition des taxons entre les quatre groupes de « taux de développement potentiel » en fonction de leur ratio élémentaire (cf. légende de la figure 7-3 pour plus de détails)

7.4.3.2 – Traits stœchiométriques réalisés : comparaison inter-sites d'étude

En utilisant le ratio N : P comme estimateur de la « vitesse de développement » des communautés benthiques, l'analyse CIT (Fig. 7-6a) montre que les communautés des sites soumis à une acidification auraient une vitesse de développement plus faible ($N : P = 28,24 \pm 5,17$) que les communautés des quatre autres sites d'étude ($N : P = 23,64 \pm 5,55$).

En utilisant le modèle CIT « $TDP = f(N : P)$ » présenté précédemment (Fig. 7-5), il est possible de prédire, pour chaque taxon, sa probabilité d'appartenir à l'un des quatre groupes TDP. La figure 7-6b représente les probabilités moyennes pour que les invertébrés provenant des communautés des sites acidifiés d'une part et des sites *ref1*, *ref2*, *orga1* et *orga2* d'autre part, appartiennent aux quatre groupes TDP. Ces résultats montrent que les communautés des sites acidifiés seraient dominées par des invertébrés à développement modéré-lent (groupe DM1). Au contraire, les communautés des quatre autres sites seraient caractérisées par des fréquences voisines de taxons à développement modéré à rapide (groupes DM1, DM2 et DR ; Fig. 7-6b).

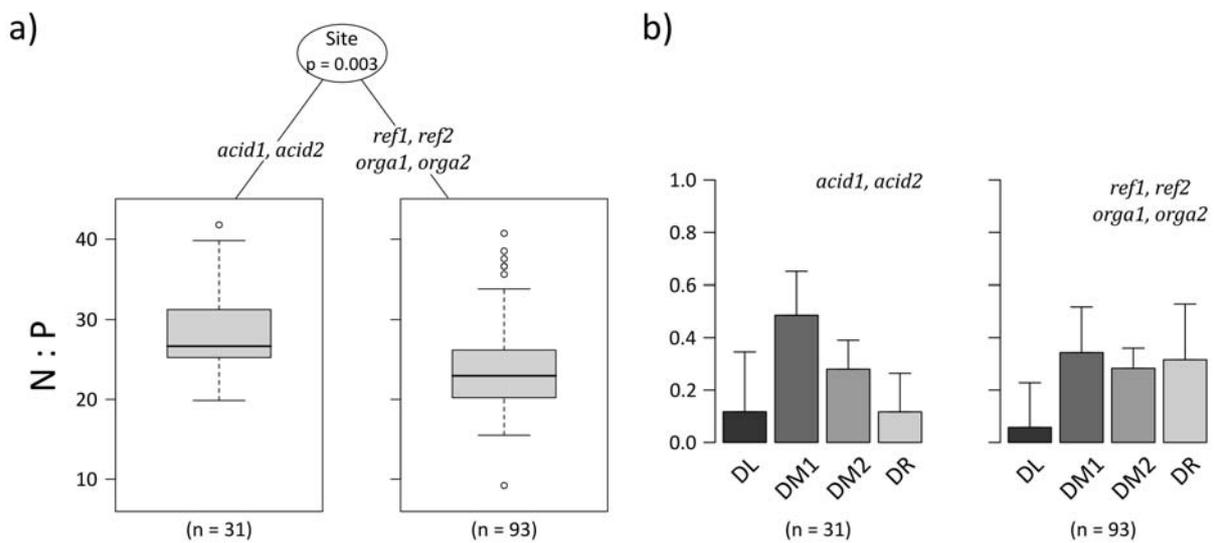


Figure 7-6. Développement des invertébrés benthiques estimée par les traits stœchiométriques réalisés en fonction du site d'étude. a) Distribution des valeurs de ratio N : P en fonction du site d'étude (cf. la légende de la Figure 7-2 pour plus de détails). b) Probabilité moyenne d'appartenance (+ 1 écart-type) des invertébrés à chacun des groupes TDP en fonction du site d'étude.

7.4.3.3 – Composition élémentaire des taxons

Un seul genre (*Cordulegaster*) a été échantillonné sur les trois types de site (*ref*, *acid* et *orga*) mais il ne présente pas de différences significatives de son ratio N : P entre les types de site (Fig. 7-7k). La plupart des taxons ne montrent pas de différences significatives dans leur composition élémentaire (N : P) entre sites de référence et sites impactés.

Un genre (*Brachyptera*; Fig. 7-7e) semble montrer des valeurs de ratio N : P plus élevées (ce qui correspondrait à un développement plus lent) dans les sites acidifiés même si la différence n'est pas significative du fait des faibles effectifs considérés ($n_{ref} = 3$, $n_{acid} = 2$; $p = 0.20$). Cette augmentation du ratio N : P (et donc la diminution de la vitesse de développement) en conditions acides n'a été démontrée significativement ($p < 0,05$) que pour les larves du Trichoptère *Potamophylax sp.* (Fig.7-7g).

Parmi les quatre taxons analysés à la fois dans les sites de référence et dans les sites soumis à une contamination organique, seules les larves du Trichoptère *Hydropsyche sp.* présentent un ratio N : P significativement plus faible (ce qui pourrait indiquer un développement plus rapide) en situation de contamination organique par rapport aux sites de référence (Fig. 7-7c)

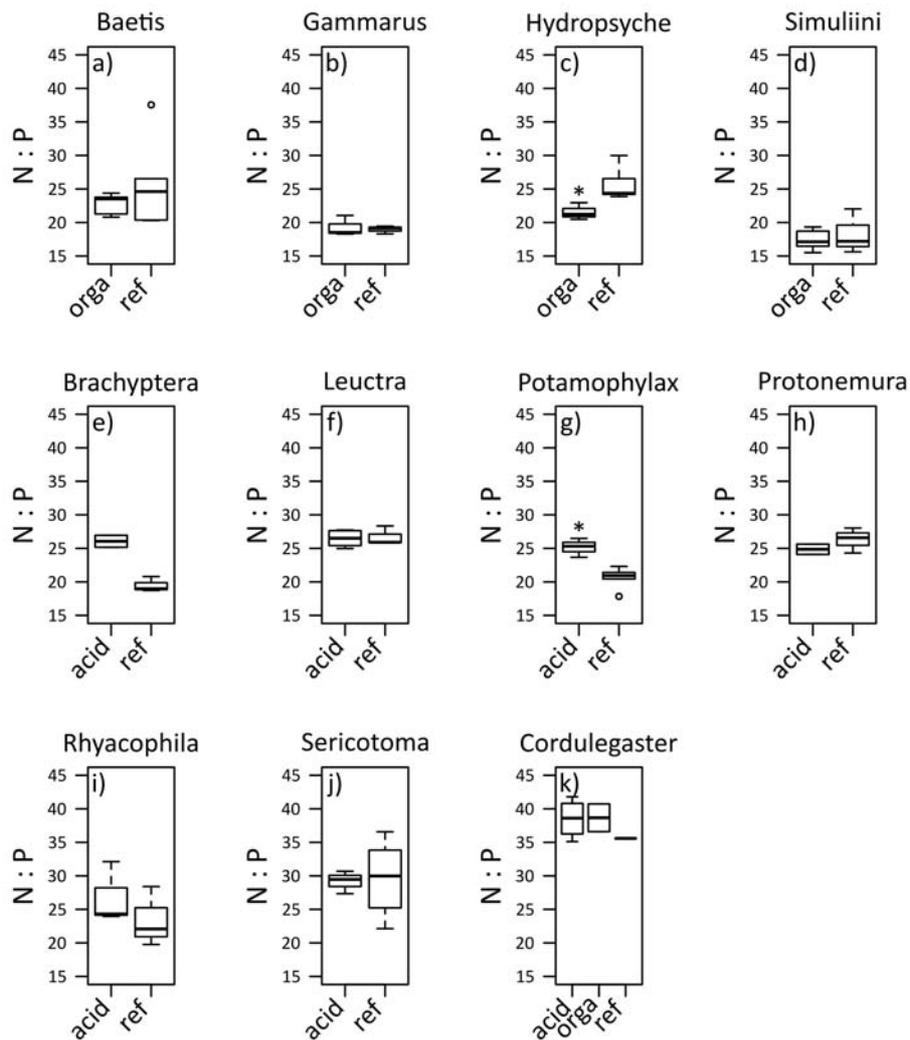


Figure 7-7. Distribution, pour onze taxons présents sur au moins deux types de site, des valeurs du ratio N : P en fonction des catégories des sites d'étude considérées : a-d) référence (ref) vs contamination organique (orga), e-j) référence vs acidification (acid) et k) référence vs contamination organique vs acidification. Les distributions des valeurs de ratio N : P dans les groupes de sites sont représentées sous la forme de boîtes (1er, 2ème et 3ème quartiles) à moustaches (valeurs extrêmes non aberrantes), les valeurs aberrantes sont représentées par des cercles blancs. Les astérisques représentent une déviation significative (test de Wilcoxon, $\alpha = 0.05$) des valeurs de N : P dans les sites soumis à pression par rapport aux sites de référence.

7.5 – Discussion

7.5.1 – Qualité élémentaire des ressources alimentaires non animales

Dans le chapitre précédent, nous avons observé, suite aux résultats d'une étude isotopique, que l'utilisation de certains types de nourriture semblait significativement modifiée en fonction du statut des sites d'étude et nous avons émis l'hypothèse que cette utilisation différentielle pouvait être, en partie, la conséquence d'une différence de qualité de ces ressources entre les différents sites.

Les résultats provenant de l'étude stœchiométrique réalisée sur les mêmes échantillons que l'étude isotopique indiquent que la qualité élémentaire (notamment en ce qui concerne le phosphore) de plusieurs types de nourriture (i.e. périlithon, FPOM et bryophytes) diminuait (i.e. une augmentation des ratios C : N : P) dans les sites acidifiés (cf. Fig. 7-2). Toutefois, les concentrations de ces nutriments dans l'eau sont similaires à celles trouvées dans les échantillons d'eau prélevés sur les sites de référence (cf. Tableau 2-VIII). Ce contraste entre concentration des nutriments dissous dans la colonne d'eau et concentration des nutriments présents dans les sources de nourriture pourrait s'expliquer par le fait que dans les sites de référence les flux de nutriments seraient effectivement plus importants que dans les sites acidifiés mais que l'absorption rapide de ces nutriments (e.g. par les algues ou les bactéries) dans les sites de référence masquerait l'intensité de ces flux dans la colonne d'eau lors de mesures ponctuelles comme celles réalisées *in situ* au cours de notre étude (Webster *et al.* 2009).

Ces résultats tendent donc à valider l'hypothèse que non seulement les taxons seraient soumis à un effet toxique lié à l'acidification (McCahon & Pascoe 1989 ; Felten & Guérold 2006) mais que certains groupes trophiques (e.g. les racleurs se nourrissant de périlithon ou les collecteurs-filtreurs se nourrissant de FPOM) seraient, en plus, pénalisés par une moindre qualité de leur ressource alimentaire (Groom & Hildrew 1989 ; Larrañaga *et al.* 2010). Cette « double peine » pourrait expliquer pourquoi ces groupes trophiques semblent si sensibles à l'acidification alors que d'autres groupes trophiques (e.g. les broyeurs) paraissent mieux résister (cf. Fig. 7 dans Guérold *et al.* 2000). En effet, si la qualité élémentaire des litières (une des sources de nourriture

majeure utilisée préférentiellement par les broyeurs) est la plus faible parmi les types de nourriture testés, nos résultats indiquent qu'elle ne semble pas être influencée par le statut des sites d'étude. Les taxons se nourrissant sur ce type de nourriture ne seraient donc pas, a priori, plus pénalisés (d'un point de vue alimentaire) dans les sites acidifiés que dans les sites ayant un pH proche de la neutralité. Il convient toutefois d'apporter une nuance importante à ceci. En effet, seul l'aspect « élémentaire » (i.e. la composition en nutriments) de la qualité de la ressource alimentaire a été pris en compte dans cette étude. D'autres aspects de la qualité alimentaire (e.g. les teneurs en vitamines, protéines ou lipides, en particulier en acides gras ; Sterner & Hessen 1994 ; Müller-Navarra 1995 ; Brett & Müller-Navarra 1997) peuvent avoir un effet important sur les consommateurs. Les litières sont connues pour constituer un apport alimentaire de faible qualité en tant que tel, mais leur conditionnement par des micro-organismes (e.g. bactéries et hyphomycètes) augmente leur appétence pour les macro-invertébrés broyeurs en augmentant, par exemple, les taux de protéines et de minéraux ainsi qu'en diminuant les taux de lignine/cellulose et de polyphénols (Cummins & Klug 1979), et en enrichissant ces litières en lipides (Cargill *et al.* 1985). Or, ces communautés microbiennes sont également significativement affectées par l'acidification (Groom & Hildrew 1989 ; Baudoin *et al.* 2008), ce qui peut avoir des effets non seulement sur les apports en nutriments (Cross *et al.* 2005) mais aussi sur les apports en protéines et en lipides aux invertébrés benthiques (Larrañaga *et al.* 2010). Nous ne pouvons donc pas écarter l'hypothèse d'une plus faible qualité du type de nourriture « litière » dans les sites acidifiés, mais nous supposons cependant que pour les taxons utilisant cette ressource, les contraintes sur la croissance et le développement résulteraient plus de la limitation en molécules organiques complexes (e.g. lipides ou protéines essentielles pour la synthèse de nouveaux tissus) que de la limitation en molécules azotées ou phosphorées élémentaires.

Les types de nourriture « périlithon », « FPOM » et « bryophytes » voient leur qualité élémentaire significativement augmenter (plus faibles ratios C : N : P) dans les sites soumis à une contamination organique (cf. Fig. 7-2). Or, exception faite des FPOM (dont non seulement la qualité élémentaire mais aussi la quantité augmente significativement dans les sites *orga1* et *orga2* ; cf. Tableau 2-VIII et Fig. 2-12), cette amélioration de la qualité élémentaire de ces sources de nourriture ne semble pas, pour autant, s'accompagner d'une augmentation de leur utilisation par les invertébrés (cf. Tableau 6-VIII). Au contraire, la communauté benthique du site *orga2* est

une de celles, avec la communauté benthique du site *acid2*, qui utilise le moins le périlithon et les bryophytes (i.e. 'macrophytes' dans le Tableau 6-VIII). L'amélioration de la qualité élémentaire d'un type de ressource alimentaire ne se traduit donc pas systématiquement par une augmentation de sa consommation par les macroinvertébrés benthiques (Pearson & Connolly 2000). De plus, comme pour les litières dans le paragraphe précédent, l'aspect « élémentaire » des sources de nourriture n'est que l'une des facettes de la qualité nutritive de celles-ci. En particulier, les lipides pourraient constituer un élément limitant pour les taxons utilisant ce type de nourriture. En effet, en cas d'excédent en carbone et de carence en phosphore la synthèse de lipides serait favorisée aussi bien chez les producteurs primaires (e.g. les algues : Spijkerman & Wacker 2011) que chez les consommateurs (Sterner & Hessen 1994). De plus, la plus faible utilisation du périlithon et des bryophytes dans les cas de contamination organique pourrait également résulter d'une plus faible accessibilité de ces ressources du fait du colmatage du substrat et des bryophytes par le dépôt de grandes quantités de FPOM sur les stations contaminées (e.g. pour la litière : Bunn 1988).

Il convient également de noter que l'estimation de la qualité élémentaire des sources de nourriture par les concentrations en nutriments (N ou P) ou par les ratios C : N : P, n'est pas une estimation absolue. En effet, l'estimation de la qualité d'une source de nourriture dépend de l'identité et des besoins en nutriments du taxon l'utilisant (Sterner & Hessen 1994 ; Cross *et al.* 2003). Plus la différence entre les besoins d'un taxon et la composition élémentaire de la source de nourriture est grande, plus la qualité de cette ressource alimentaire est médiocre pour ce taxon. Nous avons toutefois vu que, pour une majorité des taxons analysés, la composition élémentaire des invertébrés benthiques, et donc leurs besoins, étaient stables sur l'ensemble des différents sites d'étude (cf. Fig. 7-7), ce qui est conforme avec l'hypothèse d'homéostasie des consommateurs (Elser *et al.* 1996). Dans ce cas, des changements de composition élémentaire des sources de nourriture devraient se traduire automatiquement par des changements de leur qualité pour ces taxons. Afin de compenser une éventuelle baisse de la qualité d'une partie de leurs ressources nutritives, les taxons généralistes ont donc intérêt à modifier leur régime alimentaire, en augmentant par exemple la consommation de la ressource alimentaire « animale », s'ils sont capables de l'utiliser. En effet, ce type de nourriture est de meilleure qualité, car bien plus proche des exigences du consommateur à la fois en termes de nutriments que de

lipides ou de protéines (Sterner & Hessen 1994). Nos résultats semblent confirmer cette hypothèse puisque les plus fortes utilisations des ressources alimentaires d'origine animale déduites de l'étude isotopique sont observées dans les communautés provenant des sites les plus perturbés (cf. Tableau 6-VIII). Dans ces sites, la croissance et le développement des organismes seraient donc limités soit du fait de la faible disponibilité en nutriments (e.g. dans les sites acidifiés; cf. Fig. 7-2), soit du fait d'une potentielle carence en d'autres composés essentiels (e.g. acides gras dans les sites soumis à une contamination organique).

7.5.2 – Hypothèse de régulation de la vitesse de développement par les nutriments

7.5.2.1 – Homéostasie des taxons

Nous avons vu que parmi les taxons retrouvés dans au moins deux sites appartenant à des conditions de pression différentes (i.e. *ref vs. acid* ou *ref vs. orga*), une majorité semblait ne montrer aucune variation significative dans leur composition élémentaire (estimée par le ratio N : P) entre sites d'étude (cf. Fig. 7-7). Ces résultats semblent donc valider l'hypothèse selon laquelle les consommateurs assureraient une homéostasie relativement stricte (Sterner & Hessen 1994 ; Elser *et al.* 2000 ; Stelzer & Lamberti 2002 ; Sterner & Elser 2002), c'est à dire que ces organismes ont des mécanismes qui maintiennent un équilibre constant entre les concentrations des différents nutriments (C, N, P) en dépit d'éventuelles modifications des concentrations extérieures de ces mêmes nutriments.

Il convient tout de même de noter que certains taxons ont montré des différences significatives (e.g. *Potamophylax sp.* et *Hydropsyche sp.*) ou proches de la significativité (*Brachyptera sp.*) dans leurs ratios N : P suivant le site d'étude. Compte tenu du niveau taxonomique retenu (le genre), il est envisageable que ces différences de composition élémentaire traduisent la présence, sur les différents sites d'étude, d'individus de différentes espèces congénériques, dont les exigences en éléments nutritifs seraient notablement différentes.

Toutefois, on ne peut complètement écarter la possibilité que ces taxons dévient de l'homéostasie stricte. En effet, de nombreuses études ont montré que les consommateurs invertébrés pouvaient s'écarter de l'homéostasie stricte, qu'ils appartiennent au zooplancton (Elser & Urabe 1999 ; Acharya, Kyle & Elser 2004) ou au macro-zoobenthos (Bowman, Chambers & Schindler 2005 ; Veldboom & Haro 2011). En se basant sur une comparaison des communautés macrobenthiques dans des cours d'eau du Costa Rica présentant des teneurs naturellement très contrastées en phosphore, Small & Pringle (2010) concluent même que la déviation à l'homéostasie stricte serait le trait le plus fréquemment présent chez les consommateurs invertébrés. Après enrichissement expérimental d'un cours d'eau en nutriments, Cross *et al.* (2003) ont également observé un certain nombre de taxons réagissant à cet enrichissement en adaptant leurs composition élémentaire. Parmi ces taxons, ceux pour lesquels la déviation à l'homéostasie stricte était la plus importante appartenaient à l'ordre des Trichoptères. Il est intéressant de noter que parmi les taxons que nous avons étudiés, les seuls taxons présentant une déviation significative (ou proche de la significativité) à l'homéostasie appartiennent également à l'ordre des Trichoptères. La bonne concordance de nos résultats avec les résultats de Cross *et al.* (2003) (voir aussi Veldboom & Haro 2011) sur plusieurs espèces de Trichoptères nous incite à penser que les variations du ratio N : P observées chez ces Trichoptères pourraient être le résultat d'une déviation à une situation d'homéostasie stricte et qu'il serait intéressant d'étudier plus en détail les modifications de composition élémentaire, et les mécanismes correspondant, des espèces appartenant à ces genres de Trichoptères.

7.5.2.2 – Stœchiométrie et vitesse de développement dans les communautés benthiques

Parmi les travaux portant sur la stœchiométrie des invertébrés benthiques, un grand nombre s'est focalisé sur l'étude d'un seul taxon (Frost & Elser 2002 ; Back *et al.* 2008 ; Veldboom & Haro 2011) et relativement peu d'entre eux se sont intéressés, comme notre étude, aux assemblages faunistiques dans leur ensemble (mais voir également Cross *et al.* 2003 ; Small & Pringle 2010). D'après la littérature les différences de composition élémentaire inter-taxons seraient plus importantes que les différences de composition élémentaire intra-taxon (Evans-White *et al.* 2005). Les communautés d'invertébrés benthiques auraient donc la capacité de

s'adapter à une modification de la disponibilité en nutriments (enrichissement ou appauvrissement) par deux moyens : (i) les taxons adaptent leur composition élémentaire à la disponibilité en nutriments dans leur nourriture (Small & Pringle 2010 ; cf. paragraphe précédent) ou (ii) la composition des communautés benthiques change au profit de taxons ayant des exigences élémentaires plus adaptées à ce que les ressources alimentaires sont capables de fournir (Singer & Battin 2007). Or, nous avons observé une faible capacité des taxons à adapter leur composition élémentaires aux conditions environnementales, ce qui laisse penser que, dans nos sites d'étude, l'option (ii) serait le mécanisme majoritaire pour expliquer les différences observées de composition élémentaire des assemblages benthiques.

Ces deux stratégies auraient pour conséquence, selon les prédictions de la GRH, une modification des taux de croissance et des vitesses de développement observés au sein des assemblages benthiques. Chez les invertébrés benthiques, la GRH a souvent été testée en mesurant la taille ou la masse des individus sur des pas de temps variés, la composition élémentaire des taxons étant ainsi confrontée à leur taux de croissance observé (Frost & Elser 2002 ; Elser *et al.* 2005 ; Back *et al.* 2008 ; Veldboom & Haro 2011). La vitesse de développement potentielle des taxons n'a, à notre connaissance, pas encore été prise en compte dans les études stœchiométriques testant la GRH.

Dans ce travail, nous avons donc proposé d'utiliser les traits biologiques « durée du cycle de vie » et « voltinisme » pour réaliser une classification objective des taxons en fonction de leur vitesse de développement (lente, modérée ou rapide). La confrontation de la composition élémentaire des taxons à cette classification a permis la mise en évidence d'un ratio N : P qui discrimine efficacement les taxons présentant des vitesses de développement potentielles différentes. Ces résultats sont en accord avec plusieurs autres travaux qui ont démontré que la croissance des invertébrés benthiques serait plus limitée par la disponibilité du phosphore que par celle de l'azote (Frost & Elser 2002 ; Back *et al.* 2008), validant ainsi la GRH (Elser *et al.* 1996 ; Main *et al.* 1997). Les apports relatifs en azote et en phosphore par les sources de nourriture allochtones et autochtones seraient donc des déterminants majeurs des taux de croissance et des vitesses de développement des macro-invertébrés de la communauté benthique (Veldboom & Haro 2011).

7.5.2.3 – Effets des pressions anthropiques sur la stœchiométrie et le développement des macro-invertébrés

De manière générale, une croissance lente est considérée comme étant une réponse adaptative des organismes face à une carence en certains nutriments (Arendt 1997). Les résultats obtenus dans ce travail semblent valider cette hypothèse puisque les communautés d'invertébrés benthiques provenant des sites acidifiés présentent des vitesses de développement inférieures à celles observées dans les sites de référence, que le développement soit estimé par les traits bio-écologiques « durée du cycle de vie » et « voltinisme » (Figs. 7-3 & 7-4) ou par le ratio N : P (Fig. 7-6).

Si la réponse des communautés benthiques à une carence en nutriments est l'adoption d'un taux de croissance plus faible ou d'un développement plus lent, la réciproque serait, en cas de levée de la faible disponibilité en nutriments, que les invertébrés benthiques adoptent des stratégies d'histoire de vie caractérisées par des taux de croissance plus élevés (Frost & Elser 2002 ; Back *et al.* 2008 ; Veldboom & Haro 2011) et/ou des développements plus rapides. L'analyse des profils de traits biologiques montre que les assemblages d'invertébrés présents dans les sites soumis à une contamination organique [i.e. des sites présentant des concentrations en nutriments à la fois dans l'eau (cf. Tableau 2-VIII) et dans les sources de nourriture (cf. Fig. 7-2) plus élevées que les autres sites d'étude] présentent une vitesse moyenne de développement « potentielle » significativement supérieure à celles observées dans les deux autres catégories de sites d'étude (*ref* et *acid* ; cf. Fig. 7-4). L'analyse stœchiométrique ne permet pas, toutefois, de confirmer des vitesses de développement plus importantes dans les communautés prélevées dans les sites contaminés par de la matière organique par rapport à celles provenant des sites de référence. Cette différence entre les résultats obtenus par les deux approches suggère que même si les forts apports en nutriments favorisent la sélection de taxons à développement rapide dans les sites contaminés par les matières organiques, ces taxons n'ont, semble-t-il, pas pu se développer aussi rapidement qu'ils le pourraient. Ces résultats peuvent s'expliquer si les nutriments ne sont pas les seuls composés déterminant la qualité de la nourriture et donc limitant la croissance et le développement des invertébrés. Comme nous l'avons vu précédemment la synthèse des lipides peut être limitée dans des conditions de fort enrichissement en nutriments

(Sterner & Hessen 1994 ; Spijkerman & Wacker 2011). De faibles quantité et qualité des lipides présents dans les sources de nourriture peuvent devenir des facteurs limitant la croissance et le développement des invertébrés (Cargill *et al.* 1985 ; Brett & Müller-Navarra 1997 ; Klein Breteler *et al.* 1999) et ainsi contre-balancer l'effet positif des nutriments sur ces aspects de l'histoire de vie des invertébrés.

7.6 – Conclusion : Les ratios élémentaires : des traits fonctionnels

L'approche stœchiométrique a permis de mettre en évidence un changement de structure dans les communautés benthiques du fait de la sélection de taxons en fonction de l'adéquation entre leurs exigences élémentaires (C : N : P) et la disponibilité de ces éléments dans le milieu (cf. Figs 7-2 et 7-6). Nos résultats indiquent également que certains taxons semblent être capables d'ajuster leur composition élémentaire à celle de leur nourriture (cf. Figs 7-7c et g). Ces résultats confirment ceux obtenus dans d'autres études (e.g. Singer & Battin 2007) et renforcent l'idée qu'il est important de considérer, en complément d'hypothèses écotoxicologiques (i.e. toxicité du milieu) ou physiologiques (e.g. adaptation à des conditions de faibles concentrations en oxygène), des hypothèses basées sur les mécanismes stœchiométriques, pour expliquer les modifications de structure et la perte de biodiversité dans les communautés exposées à des pressions anthropiques (Singer & Battin 2007 ; Evans-White *et al.* 2009).

De manière globale (i.e. sur l'ensemble de nos six sites d'étude), la relation entre le ratio N : P des invertébrés et leur taux de développement potentiel a été confirmée. A notre connaissance, ce travail est l'un des premiers à valider les prédictions de la théorie GRH en se concentrant sur les vitesses de développement des communautés benthiques dans leur ensemble et non en considérant les taxons de manière individuelle (Frost & Elser 2002 ; Back *et al.* 2008 ; Veldboom & Haro 2011). Or, la validation de cette théorie ne semble être possible que si le phosphore est l'élément limitant la croissance des organismes (Elser *et al.* 2003 ; Acharya *et al.* 2004). Nos résultats semblent donc indiquer que, au moins dans les types de cours d'eau pris en compte dans cette étude, le développement des peuplements d'invertébrés benthiques est limité par les apports en phosphore et non en azote (Veldboom & Haro 2011). Il convient toutefois de

garder à l'esprit la possibilité d'une limitation de la croissance et du développement par d'autres composés (e.g. les lipides en général et les acides gras essentiels en particulier) dans le cas de rivières soumises à une contamination organique (i.e. à un fort enrichissement en nutriments).

La validation de la GRH chez les invertébrés benthiques nous permet également de coupler les notions de croissance et de développement à celle de transfert des nutriments (Singer & Battin 2007), nous offrant ainsi sous la forme des ratios élémentaires un ensemble de traits « fonctionnels » (McGill *et al.* 2006). En effet, ces traits permettent de lier directement certaines caractéristiques des taxons (e.g. taux de croissance et vitesse de développement) au fonctionnement (e.g. les flux et le recyclage des nutriments : Elser & Urabe 1999 ; Alves *et al.* 2010) du système qui les accueille (i.e. le cours d'eau) ou des systèmes contigus (e.g. via les émergences des insectes amphibiotiques).



***Chapitre VIII: Évaluation de l'utilisation
d'un trait moléculaire – le protéome – en
bio-indication***



Summary

Biological traits (e.g. size, respiration mode or reproduction strategy) can be considered as the endpoint of many molecular and biochemical processes. Among these processes, the expression of the proteins could be of critical importance in the study of realized biological traits. Indeed, if the genetic structure of an organism reflects its biological potentialities, the expression of this genetic material in proteins reflects the realized part of these potentialities.

Thus, proteomic (i.e. the study of the protein expression by an organism) could provide interesting information for the development of new ecological risk assessment techniques. In this work, we applied the Differential In Gel Electrophoresis (DIGE), a proteomic approach for studying the biological responses of two macroinvertebrate species with contrasted sensitivity levels (i.e. a sensitive species: *Dinocras cephalotes* and a tolerant species: *Odontocerum albicorne*) when exposed *in situ* to an acidification gradient.

Using appropriate statistical methods (random forests), we were able to measure the importance of all the candidate proteins in efficiently discriminating different exposure conditions (i.e. reference sites vs. impaired sites). We have found that the sensitive species exhibited a significantly higher proportion of contributive spots (45.21%) than the tolerant species (14.14%) suggesting that the proteomic approach could be a useful way for assessing species sensitivity.

Simultaneously considering the responses of the most important spots (i.e. the spots corresponding to the proteins with specific expression patterns under different exposure conditions) allows to efficiently identify the exposure conditions of individual organisms (correct classification: *D. cephalotes* = 100% and *O. albicorne* = 75%).

Finally, the identification of the proteins corresponding to *D. cephalotes* spots (with the most specific expression patterns) allowed to bring out clear information on pressure effects on this sensitive species, highlighting the role of a group of haemolymphatic proteins: the hexamerins.

8.1 – Introduction

Comme il a été vu dans les chapitres précédents, la bio-indication repose sur des variables biologiques afin d'estimer la qualité environnementale (Chapitre III ; Gerhardt 2000 ; Niemi & McDonald 2004 ; Mondy *et al.* 2012) et potentiellement de déterminer les causes de détérioration de cette qualité (Chapitre IV, Bonada *et al.* 2006 ; Statzner & Bêche 2010). Pour les systèmes d'eau douce, les macro-invertébrés représentent l'un des groupes les plus utilisés en bio-indication (Metcalf 1989 ; Rosenberg & Resh 1993 ; Bonada *et al.* 2006). L'étude des caractéristiques taxonomiques et structurelles des communautés est traditionnellement l'approche la plus souvent mise en place dans le suivi de la qualité des cours d'eau (Verneaux *et al.* 1982 ; Armitage *et al.* 1983 ; de Pauw & Vanhooren 1983 ; Wright *et al.* 1984 ; Metcalf 1989 ; AFNOR 1992). De plus, ce type d'approche a connu un nouvel essor depuis le début des années 2000 sous l'impulsion de la Directive Européenne Cadre sur l'Eau (DCE, European Council 2000) qui, par une volonté politique d'améliorer et d'harmoniser les méthodes européennes de bio-indication, a mené au développement et à la mise en application d'un grand nombre d'indices multimétriques dont les métriques constitutives sont des descripteurs de la composition et de la structure des communautés d'invertébrés (Böhmer *et al.* 2004a, 2004b ; Brabec *et al.* 2004 ; Buffagni *et al.* 2004 ; Dahl & Johnson 2004 ; Dahl, Johnson & Sandin 2004 ; Lorenz *et al.* 2004 ; Ofenböck *et al.* 2004 ; Pinto *et al.* 2004 ; Skoulikidis *et al.* 2004 ; Vlek *et al.* 2004 ; Gabriels *et al.* 2010).

Dans les chapitres précédents, il a été démontré que la prise en compte de l'utilisation des traits bio-écologiques potentiels et de démarches statistiques adaptées permettait (i) d'améliorer l'évaluation écologique des cours d'eau par rapport à l'utilisation exclusive de métriques « classiques » de composition et de structure taxonomique (Chapitre III ; Mondy *et al.* 2012) et (ii) de poser les bases d'un outil diagnostique permettant d'aider à l'identification des sources de pressions anthropiques (Chapitre IV) tout en minimisant la part des facteurs naturels non liés aux pressions dans les réponses biologiques étudiées.

La prise en compte des traits réalisés des taxons permettrait d'affiner ou de contraster les conclusions obtenues sur la base des traits potentiels (Jung *et al.* 2010). Toutefois, l'acquisition des données relatives à ces traits réalisés est souvent plus compliquée ou plus lourde à mettre en œuvre que l'acquisition des données relatives aux traits potentiels qui ne nécessite, une fois les bases de données constituées (ce qui représente un investissement considérable, Statzner & Bêche 2010), « que » l'échantillonnage et la détermination des communautés benthiques. La mesure de certains traits biologiques peut être relativement simple à mettre en place mais très coûteuse en temps. Par exemple un des moyens de mesurer les traits « taille maximale » ou « taux de croissance » nécessite la mise en place de mesures biométriques de l'ensemble des individus appartenant aux différents taxons échantillonnés à des pas de temps relativement courts afin de suivre l'évolution des populations. La mise en place d'approches alternatives permet d'estimer relativement rapidement certains traits biologiques. Par exemple une approche isotopique peut être utilisée pour reconstituer pour le régime alimentaire des invertébrés (Chapitre VI ; Füreder *et al.* 2003 ; Li & Dudgeon 2008 ; Bergfur *et al.* 2009) et une approche stœchiométrique semble une bonne piste pour appréhender le taux de croissance et la vitesse de développement des invertébrés (Chapitre VII ; Main *et al.* 1997 ; Veldboom & Haro 2011). Pour d'autres traits (e.g. la tolérance à certaines conditions environnementales : pH, eutrophisation, température, etc.), la mesure du trait réalisé nécessite la mise en place d'expériences d'exposition en laboratoire (e.g. Rowe *et al.* 1989) ou *in situ* (e.g. Felten & Guérol 2006). Il serait donc intéressant de disposer d'une batterie de mesures de l'état des individus/populations (i.e. d'estimations de traits réalisés) dont l'acquisition serait relativement rapide et dont les réponses permettraient d'étudier les effets de différentes pressions sur les invertébrés benthiques.

La protéomique est un domaine de recherche se développant fortement ces dernières années, et qui permet de mesurer simultanément un grand nombre de réponses moléculaires sur un même organisme (Liebler 2001). La comparaison des profils d'expressions protéiques entre une situation de contrôle et une situation stressante peut permettre de conduire à l'identification de patrons de réponse spécifiques à différents stress. L'identification des protéines impliquées dans ces réponses peut fournir par ailleurs des pistes sur les mécanismes moléculaires mis en œuvre (Nesatyy & Suter 2007).

Cette utilisation de la protéomique se rapproche, dans sa démarche, des approches « traits bio-écologiques potentiels » (i.e. biotraits, Chapitre IV) et traits « réalisés » (Chapitres VI et VII). L'application de procédures statistiques similaires à celles décrites précédemment pourrait donc permettre la mise au point d'indicateurs « multi-métriques » basés sur les profils protéomiques. Cette similarité entre les approches « traits » et protéomique est renforcée par la proximité conceptuelle et mécanistique qui peut exister entre elles.

Proximité conceptuelle tout d'abord car les biotraits constituent un ensemble de variables décrivant différents aspects de l'histoire de vie et des habitats utilisés par les espèces de macro-invertébrés (cf. chapitre II), chaque trait étant décrit par plusieurs catégories (ou modalités). De la même manière, le protéome peut être vu comme un ensemble de variables, chaque variable contribuant à la description d'une fonction particulière au sein de l'organisme (e.g. métabolisme énergétique, nutrition, reproduction, défense immunitaire). Chaque variable, ou trait, peut être décrite par plusieurs « modalités » (i.e. les protéines) décrivant les différents mécanismes ou processus biochimiques permettant de remplir la fonction décrite par la variable. Proximité mécanistique ensuite, car la mise en place des différentes variantes de traits réalisés entre des populations d'une même espèce est la conséquence de l'expression différentielle de protéines entre ces populations, mécanismes constituant l'un des sujets d'étude centraux en protéomique.

Ce chapitre a donc pour objectif de faire une première évaluation de la possibilité d'étendre les techniques de bio-indication que nous avons développées pour les traits bio-écologiques à ce nouvel ensemble de traits « moléculaires », le protéome. Cette évaluation a été réalisée en utilisant deux espèces ayant des niveaux différents de tolérance (une espèce sensible : *Dinocras cephalotes* et une espèce plus tolérante : *Odontocerum albicorne*) à une pression anthropique isolée : l'acidification.

8.2 – Matériel & Méthodes

8.2.1 – Principe de la méthode

Cette partie donne quelques éléments de base pour la compréhension des techniques d'électrophorèse bi-dimensionnelle et de spectrométrie de masse en tandem utilisées pour profiler et identifier les protéines. Pour plus de détails, le lecteur peut se reporter à Liebler (2001) pour une introduction à la protéomique et une description des techniques d'analyse quantitative et de spectrométrie de masse.

8.2.1.1 – Analyse quantitative des protéines

La protéomique en tant que discipline a pour objectif la caractérisation des réponses protéiques d'un système biologique dans son ensemble (e.g. le protéome d'une cellule ou d'un individu). Dans le cas d'analyses en électrophorèse bi-dimensionnelle, les différentes protéines d'un extrait sont individualisées en deux étapes de migration électrophorétique : tout d'abord, selon leur point isoélectrique (pI, i.e. le pH auquel les protéines sont globalement neutres) et ensuite en fonction de leur masse. Ainsi, les protéines sont visualisées comme des spots (i.e. des 'taches' ayant des coordonnées fixées sur un gel d'électrophorèse). Chaque spot est caractérisé par (i) une surface et (ii) une intensité, mesurée par absorbance. Le produit de ces deux caractéristiques est appelé le 'volume' du spot et est utilisé comme un estimateur du niveau d'expression de la protéine correspondante.

Dans les méthodes 'classiques' d'électrophorèse bi-dimensionnelle (i.e. 2D-SDS-PAGE), les protéines sont marquées par un colorant qui permet de révéler leur présence sur le gel d'électrophorèse. Toutefois, malgré les progrès réalisés depuis quelques années (notamment en automatisant au maximum les procédures), les conditions de migration ne sont jamais totalement identiques d'un gel à l'autre. Aussi, la comparaison de protéomes venant d'échantillons différents, c'est à dire de plusieurs gels, peut rapidement se révéler problématique.

En effet comment comparer le niveau d'expression d'une protéine provenant de n échantillons si le spot correspondant à cette protéine, du fait de conditions de migration différentes, ne se trouve pas exactement aux mêmes coordonnées sur les n gels ?

La méthode d'électrophorèse bi-dimensionnelle choisie pour réaliser l'analyse quantitative des protéines dans cette étude est la méthode dite DIGE (« Differential In Gel Electrophoresis », cf. Fig. 8-1 et Lilley & Friedman 2004). En DIGE, trois marqueurs fluorescents différents sont utilisés, les cyanines Cy2 (fluorescente à 488 nm), Cy3 (fluorescente à 532 nm) et Cy5 (fluorescente à 633 nm). Étant donné que les trois marqueurs sont fluorescents à des longueurs d'onde différentes, il est possible de faire migrer simultanément trois échantillons sur un même gel et de révéler les protéomes de chacun des échantillons individuellement en utilisant la longueur d'onde adéquate. Cette particularité est mise à profit pour améliorer la comparaison des échantillons. En effet, pour un nombre d'échantillons supérieur à trois, il convient de faire plusieurs gels et il faut donc s'assurer de la comparabilité des différents gels. Pour cela on réalise un mélange des n échantillons, en quantité égale de protéines. Ce mélange constitue un « standard interne » qui sera marqué par la cyanine Cy2 et déposé sur chacun des gels, la moitié des échantillons est ensuite marqué avec Cy3 et l'autre moitié avec Cy5. Ainsi, pour n échantillons on se retrouve avec $n/2$ gels d'électrophorèse, sur chacun desquels ont migré un échantillon marqué avec Cy3, un échantillon marqué avec Cy5 et le standard interne marqué avec Cy2.

La présence de ce standard interne sur l'ensemble des gels permet (i) d'aligner les gels et (ii) de normaliser le volume des spots des échantillons par rapport aux volumes des spots correspondants sur le standard interne, permettant ainsi la comparaison d'échantillons ayant migré sur des gels différents.

8.2.1.2 – Identification des protéines

Une fois les profils protéomiques réalisés et analysés statistiquement, il est possible, par spectrométrie de masse en tandem, d'identifier les protéines dont l'expression varie entre les échantillons (dans cette étude, en fonction du gradient d'acidification).

La spectrométrie de masse repose sur le fait que des molécules peuvent être discriminées en fonction de leur ratio m/z (i.e. ratio masse/charge). Ainsi en mesurant avec précision le ratio m/z d'une molécule et en comparant cette mesure avec une base de données, on est théoriquement en mesure d'identifier cette molécule.

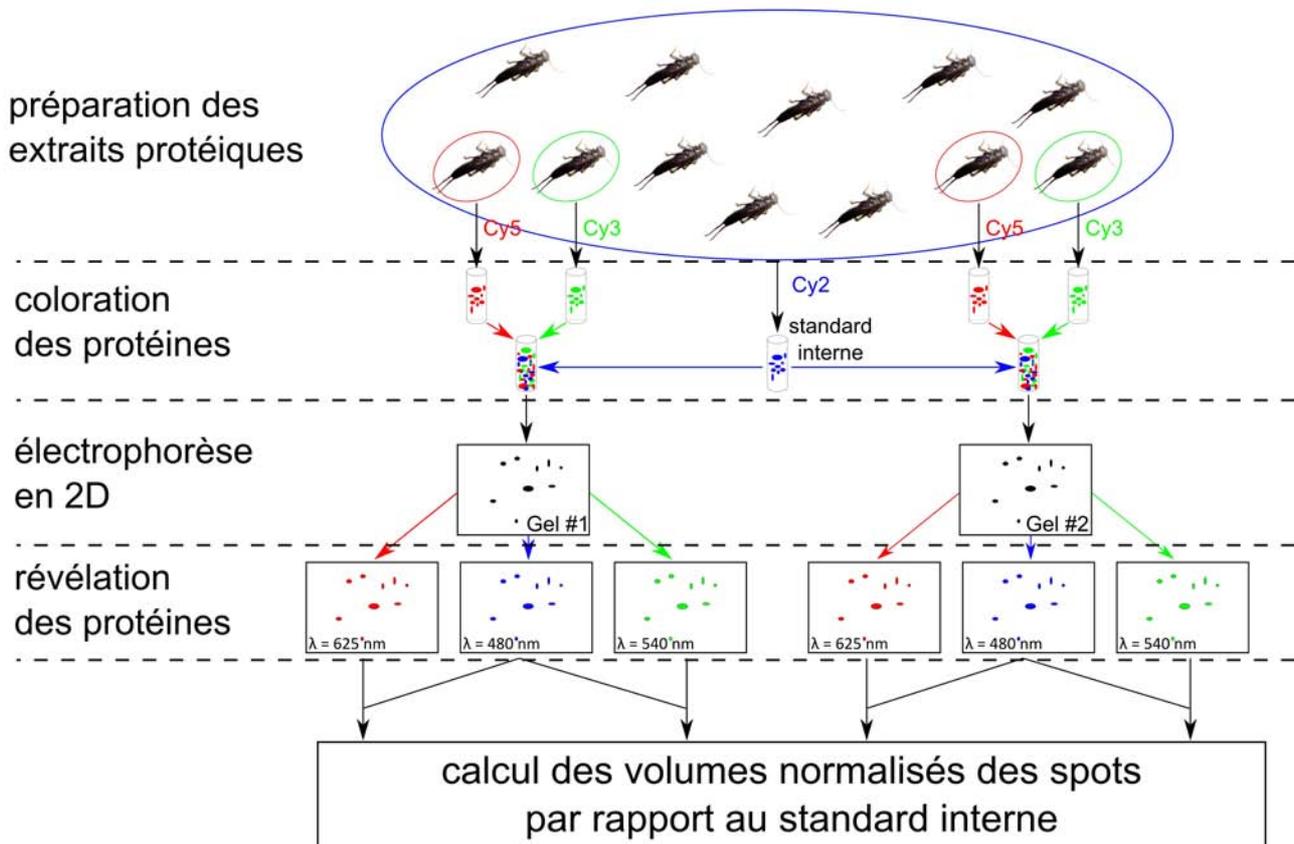


Figure 8-1. Méthode d'électrophorèse bi-dimensionnelle DIGE permettant la comparaison d'échantillons ayant migré sur plusieurs gels d'électrophorèse au moyen des volumes normalisés des spots. Le principe est ici illustré pour deux gels. Les colorants fluorescents utilisés sont les cyanines Cy2, Cy3 et Cy5. Voir le texte pour plus de détails.

Dans une analyse protéomique, même si les spectromètres de masse sont théoriquement capables de mesurer la masse des protéines entières, cette option n'est pas utilisée. En effet, les spectromètres de masse utilisés sont plus adaptés à la mesure de la masse de peptides, plus petits. Il est donc nécessaire de procéder à une digestion enzymatique des protéines, généralement avec de la trypsine.

Toutefois, la seule estimation de la masse d'un peptide peut amener à un certain niveau d'incertitude dans son identification. En effet, des peptides de masses voisines peuvent présenter des séquences (i.e. des successions d'acides aminés) différentes et donc correspondre à des protéines différentes. Le nombre de peptides pouvant correspondre à un ratio m/z donné peut donc être important compte tenu du grand nombre de combinaisons d'acides aminés possibles. Ce nombre est d'ailleurs d'autant plus grand que l'erreur dans l'estimation de la masse du peptide est importante. Le séquençage du peptide permettrait de limiter ce risque d'erreur en cherchant dans la base de données, non plus la masse du peptide mais la succession d'acides aminés qui le caractérise.

Un spectromètre de masse (MS) peut être schématiquement décomposé en trois éléments principaux : (i) une source d'ionisation qui produit des ions à partir des échantillons, (ii) l'analyseur de masse, qui filtre les ions précédemment formés en fonction de leur ratio masse/charge (m/z) et (iii) le détecteur qui détecte et enregistre les ions produits. Un spectromètre de masse en tandem (MS-MS) est également composé d'une source d'ionisation et d'un analyseur de masse mais possède en plus une chambre de collision et un deuxième analyseur de masse placés avant le détecteur (Fig. 8-2).

L'analyse d'un spot par MS-MS se fait en deux étapes : un scan complet puis une série de scans après fragmentation. Le scan complet correspond au mode de fonctionnement d'un spectromètre de masse simple, c'est à dire que les réglages de l'analyseur de masse sont progressivement modifiés afin de balayer toute la gamme des ratio m/z et un spectre MS est alors produit. Ce spectre MS attribue à chaque ratio m/z une barre dont la hauteur est proportionnelle à l'intensité du peptide correspondant dans l'échantillon (Fig. 8-2).

Dans un deuxième temps, on sélectionne le peptide le plus important (i.e. celui avec la plus forte intensité sur le spectre MS = peptide « père ») et l'on règle le premier analyseur de masse pour qu'il ne laisse passer que ce peptide.

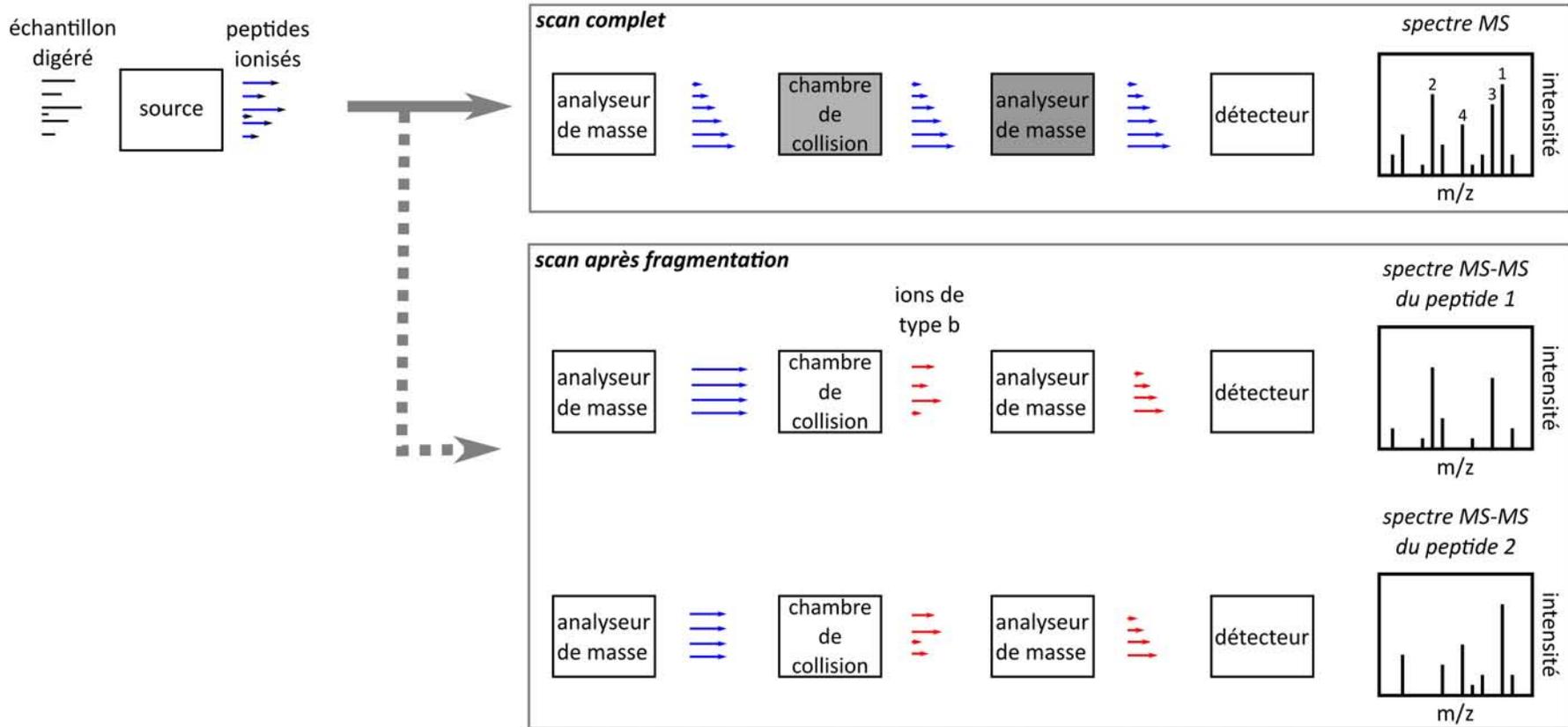


Figure 8-2. Schéma simplifié de fonctionnement d'un spectromètre de masse en tandem pendant une phase de scan complet et une phase de scans après fragmentation. Les différents composants du spectromètre de masse (boîtes rectangulaires) sont représentés avec un fond blanc lorsqu'ils sont actifs et un fond gris lorsqu'ils sont inactifs. Pour simplifier la représentation et la compréhension, seuls les ions de type b (et pas ceux de type y) sont représentés comme produits de la fragmentation. Voir texte pour plus de précision.

Le peptide père entre alors dans la chambre de collision où il entre en collision avec un gaz neutre, ce qui entraîne la rupture d'une liaison peptidique entre deux résidus aminés et la formation de deux peptides plus petits (un ion de type b et un ion de type y). Comme de nombreux exemplaires du peptide père sont présents dans la chambre de collision, il est statistiquement vraisemblable que l'on retrouve, comme produits de la collision, une communauté d'ions de type b (et une communauté d'ions de type y) comprenant toutes les tailles de fragment possibles, i.e. résultant de la fragmentation du peptide père au niveau des différentes liaisons peptidiques. La masse de ces ions de type b est ensuite mesurée par le deuxième analyseur de masse et un spectre MS-MS est obtenu (Fig. 8-2), cette opération est répétée pour chaque peptide père sélectionné d'après le spectre MS.

C'est à partir du spectre MS-MS que la séquence du peptide correspondant peut être déduite. En effet, la différence de masse entre deux ions de type b successifs sur ce spectre MS-MS correspond à la masse d'un résidu d'acide aminé isolé. Or chacun de ces résidus possède une masse propre, il est donc possible de faire correspondre à chaque différence de masse entre ions de type b successifs un acide aminé et donc de reconstituer la séquence du peptide.

En pratique, l'identification du peptide se fait soit de manière manuelle (séquençage *de novo*) en déduisant la séquence d'acides aminés à partir du spectre MS-MS, soit de manière automatisée. La manière automatisée consiste non pas à déduire la séquence, acide aminé par acide aminé, mais à comparer le spectre MS-MS obtenu pour un peptide à des spectres MS-MS théoriques. Ces spectres théoriques sont obtenus en procédant, de manière logicielle, à la digestion des protéines présentes dans la base de données et en construisant ainsi les spectres MS-MS de chacun des peptides obtenus. Le peptide analysé se voit alors attribué un score pour chaque peptide présent dans la base de données, score d'autant plus grand que les spectres MS-MS observés et théoriques sont similaires.

8.2.2 – Espèces modèles

Dans cette étude, deux espèces modèles ont été sélectionnées : le Plécoptère *Dinocras cephalotes* et le Trichoptère *Odontocerum albicorne*. Ces deux espèces ont été choisies car (i) elles présentent des niveaux de sensibilité *a priori* différents à l'acidification et (ii) les larves étaient de taille suffisamment importante au moment de l'échantillonnage pour permettre de doser les protéines des individus *in toto*.

8.2.2.1 – *Dinocras cephalotes*

Dinocras cephalotes (Fig. 8-3) est un Plécoptère de grande taille (35 mm pour les derniers stades larvaires) appartenant à la famille des Perlidae. C'est une espèce à cycle de vie long (en moyenne 3 ans), oligosaprobe et dont le régime alimentaire des larves est majoritairement prédateur mais elles peuvent accessoirement se nourrir d'algues ou de débris végétaux (Hynes 1976).



Figure 8-3. *Dinocras cephalotes*
(Photographie L. Iversen,
<http://www.flickr.com/photos/liversen/4614160239/in/photostream>)

Alors que l'ordre des Plécoptères (e.g. les familles Nemouridae, Leuctridae) est généralement considéré comme étant globalement acido-tolérant, les Perlidae et *D. cephalotes* en particulier, sont reconnus comme étant des taxons sensibles à l'acidification (Braukmann 2001 ; Felten & Guérold 2006).

8.2.2.2 – *Odontocerum albicorne*

Odontocerum albicorne (Fig. 8-4) est le seul représentant de la famille des Odontoceridae. Il s'agit d'une espèce de Trichoptère de taille moyenne (18 mm pour les derniers stades larvaires) dont le cycle de vie est de type monovoltin (Tachet *et al.* 2010). L'espèce est oligosaprobe et a un régime alimentaire mixte mélangeant à part égale des proies animales et des végétaux.



Figure 8-4. *Odontocerum albicorne*
(Photographie © Biopix: JC Schou)

Cette espèce est considérée comme étant plutôt acido-tolérante (Guérold *et al.* 1995a ; Braukmann 2001).

8.2.3 – Terrain

Les organismes ont été prélevés avec un filet Surber dans le cours d'eau de référence de la Plaine puis laissés à stabuler dans des glacières oxygénées pendant une nuit.

Des cages constituées de tubes cylindriques en PVC de 80 mm de diamètre ont été réalisées (Fig. 8-5). Afin de permettre aux organismes de se nourrir pendant le temps d'exposition, les extrémités des cages ont été refermées avec du grillage plastique, dont la maille (2 mm) laisse passer des particules alimentaires ainsi que des proies potentielles mais empêche *D. cephalotes* et *O. albicorne* de s'échapper. Deux cages ont été posées par taxon sur chacun des sites décrivant le gradient d'acidification (*ref1*, *acid1* et *acid2*), avec trois ou quatre individus dans chacune. Afin de limiter le cannibalisme, les cages ont été pourvues de refuges sous la forme de galets de diamètre compris entre 20 et 70 mm.

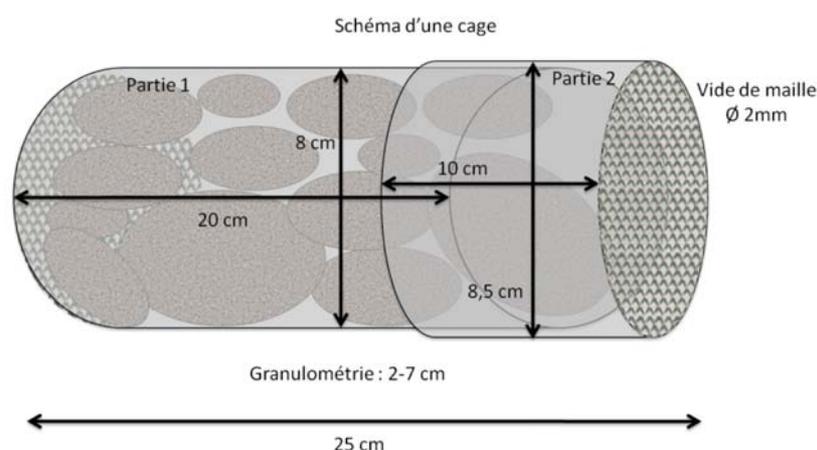


Figure 8-5. Schéma des cages utilisées pour l'exposition in situ

Les cages ont été laissées quatre semaines avant d'être récupérées en février 2010. Par site d'étude, quatre individus (choisis aléatoirement parmi les individus exposés, encore vivants à la fin de l'expérience) ont été récupérés, disséqués afin de retirer rapidement le tractus digestif pour éviter que les enzymes digestives (i.e. protéases) ne dégradent les protéines et ne perturbent le profil protéomique recherché. Les organismes ont ensuite été congelés immédiatement dans l'azote liquide avant d'être stockés à -80°C de retour au laboratoire.

Les 24 échantillons (3 sites d'études x 2 espèces x 4 réplicats) ont ensuite été envoyés pour préparation, analyse et identification à la plateforme de protéomique de l'Institut Fédératif de Recherches Multidisciplinaires sur les Peptides (IFRMP 23, UMR 6270 CNRS, Facultés des Sciences de Rouen ; Mont-Saint-Aignan).

8.2.4 – Préparation des échantillons

Les larves, congelées à -80°C , ont été broyées entières dans l'azote liquide en utilisant un mortier et un pilon. Les tissus congelés ont été dissous dans 1 ml de tampon de lyse (urée 7 M, thiourée 2 M, tampon TRIS 25 mM, CHAPS 4% poids/volume). Les échantillons ont subi deux cycles de congélation/décongélation puis ont été passés aux ultrasons pendant 5 cycles de 20 secondes marche/60 secondes arrêt (Vibracell 500 W, Sonics) dans un bain d'eau glacée.

Les débris cellulaires ont ensuite été retirés par centrifugation (12 000 g pendant 30 minutes à 6°C) et le surnageant récupéré.

La concentration en protéines totales a été mesurée par un test de Bradford (Bio-Rad). Pour résumer, l'absorbance de solutions standards d'albumine de sérum bovin (BSA, Sigma) – de 0 à 0,6 mg/ml – a été mesurée à 595 nm avec un spectro-photomètre (Beckman), une courbe d'étalonnage absorbance vs [BSA] est ensuite réalisée. La concentration en protéines totales de chaque échantillon a ensuite été déterminée en comparant son absorbance avec la courbe d'étalonnage obtenue avec la BSA.

8.2.5 – DIGE

Cinquante microgrammes de protéines ont été marqués pour chaque échantillon avec les cyanines fluorescentes. Douze échantillons ont été marqués par la cyanine fluorescente Cy3 et les douze autres par Cy5 (cf. Tableau 8-1). Un « standard interne » est préparé par taxon en mélangeant 50 microgrammes de protéines de chacun des 12 échantillons. Ce standard est marqué avec la cyanine Cy2 (cf. Fig. 8-1).

Les couples d'échantillons marqués séparément par Cy3 ou Cy5 et destinés à migrer sur le même gel sont ensuite mélangés avec le standard interne correspondant (50 µg Cy2 + 50 µg Cy3 + 50 µg Cy5). Ces 150 µg de préparation de protéines sont ensuite repris dans un tampon de réhydratation [urée 7M, thiourée 2M, CHAPS (4% w/v), DTT (4% w/v), IPG buffer pH 3-10 NL (3.5% v/v) (Amersham), 1µl bleu de Coomassie] pour un volume final de 340 µl.

Ces préparations sont alors déposées sur des bandelettes (IPG Immobiline Dry strips, 18cm, non-linear, pH 3-10 ; BioRad) afin de les imprégner une nuit durant. La première dimension de la migration se fait sur un appareil d'électrophorèse horizontal (Multiphor II, Amersham Pharmacia Biotech) en appliquant au cours de 4 périodes successives de 1 heure un courant électrique de tension croissante (150 V, 350 V, 750 V puis 1,5 kV ; 1 mA), pour terminer une tension de 3,5 kV (1 mA) est appliquée pendant 26 heures.

Tableau 8-I. Distribution et marquage des 24 échantillons (3 sites d'étude x 2 espèces x 4 réplicats) sur les 12 gels d'électrophorèse bi-dimensionnelle

Échantillon	Espèce	Site	Gel	Cyanine
D1	<i>Dinocras cephalotes</i>	ref1	gel3	cy5
D2	<i>Dinocras cephalotes</i>	ref1	gel4	cy5
D3	<i>Dinocras cephalotes</i>	ref1	gel5	cy3
D4	<i>Dinocras cephalotes</i>	ref1	gel6	cy5
D5	<i>Dinocras cephalotes</i>	acid1	gel1	cy3
D6	<i>Dinocras cephalotes</i>	acid1	gel2	cy3
D7	<i>Dinocras cephalotes</i>	acid1	gel4	cy3
D8	<i>Dinocras cephalotes</i>	acid1	gel5	cy5
D9	<i>Dinocras cephalotes</i>	acid2	gel1	cy5
D10	<i>Dinocras cephalotes</i>	acid2	gel2	cy5
D11	<i>Dinocras cephalotes</i>	acid2	gel3	cy3
D12	<i>Dinocras cephalotes</i>	acid2	gel6	cy3
O1	<i>Odontocerum albicorne</i>	ref1	gel7	cy3
O2	<i>Odontocerum albicorne</i>	ref1	gel8	cy3
O3	<i>Odontocerum albicorne</i>	ref1	gel10	cy5
O4	<i>Odontocerum albicorne</i>	ref1	gel11	cy5
O5	<i>Odontocerum albicorne</i>	acid1	gel8	cy5
O6	<i>Odontocerum albicorne</i>	acid1	gel9	cy3
O7	<i>Odontocerum albicorne</i>	acid1	gel9	cy5
O8	<i>Odontocerum albicorne</i>	acid1	gel10	cy3
O9	<i>Odontocerum albicorne</i>	acid2	gel7	cy5
O10	<i>Odontocerum albicorne</i>	acid2	gel11	cy3
O11	<i>Odontocerum albicorne</i>	acid2	gel12	cy3
O12	<i>Odontocerum albicorne</i>	acid2	gel12	cy5

La seconde dimension de la migration est réalisée sur un gel SDS-PAGE [12 % (poids/volume) de polyacrylamide, largeur 20 cm, longueur 20 cm, épaisseur 1 cm) dans des cuves ProteanII-XL (BioRad) sous 40 mA.

8.2.6 – Analyse d'image

Les douze gels sont ensuite scannés (ProXPRESS, Perkin Elmer) en mode d'illumination par la tranche à différentes longueurs d'onde permettant ainsi de révéler indépendamment chacune des trois cyanines fluorescentes (Cy2 : 480 nm ; Cy3 : 540 nm et Cy5 : 625 nm). Les images des gels ont ensuite été exportées au format TIFF et analysées au moyen du logiciel Progenesis SameSpots (Nonlinear Dynamics). Ce logiciel permet (i) de détecter les spots, (ii) d'aligner les gels en se basant sur les spots correspondant au standard interne et (iii) de calculer le volume de chaque spot ainsi que de le normaliser par rapport à son volume dans le standard interne, ceci afin de permettre les comparaisons inter-gels, et donc inter-échantillons.

Une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée sur les volumes normalisés des spots détectés en DIGE pour chacune des deux espèces exposées. Afin de quantifier et de tester la part de la variabilité protéomique totale pouvant être expliquée par les conditions d'exposition (estimées par l'identité des sites d'exposition : *ref1*, *acid1* et *acid2*), une analyse inter-sites suivie d'un test de permutation de Monte-Carlo (9999 permutations) ont été réalisés pour chacune des deux ACP correspondant aux deux espèces modèles.

8.2.7 – Sélection des spots d'intérêt

Les volumes normalisés des spots identifiés en DIGE sont ensuite utilisés pour effectuer une sélection des spots potentiellement intéressants pour (i) intégrer un outil de diagnostic écologique et (ii) être analysés par spectrométrie de masse afin d'identifier les protéines correspondantes.

Dans les études protéomiques, la sélection des spots dits d'intérêt se fait classiquement au moyen d'analyses statistiques intégrées aux logiciels d'analyse d'image utilisés (e.g. Progenesis SameSpots). Ces analyses, basées sur des analyses de variance (ANOVA), testent pour chaque spot s'il existe une différence significative d'expression (i.e. de volume normalisé) entre les différentes conditions d'exposition. Cette méthode est plutôt « protéine-centrée », c'est à dire que l'on cherche à savoir si une protéine voit son niveau d'expression significativement modifié par les conditions d'exposition.

Dans cette étude, qui a une finalité de bio-indication, l'approche est plutôt « site-centré », c'est à dire que l'on cherche à mettre en évidence quelle combinaison de protéines permet de distinguer le plus efficacement possible les différentes conditions d'exposition. Une stratégie alternative de sélection des spots, basée sur une méthode de classification, a donc également été utilisée.

8.2.7.1 – Principe

Un problème qui se pose en classification avec les données issues d'études protéomiques, comme d'ailleurs pour les données issues d'autres études « -omiques » (génomique, transcriptomique) provient de ce que l'on appelle la « malédiction des dimensions » (*dimensionality curse*, Bureau *et al.* 2005) ou le problème « faible n, grand p » (*small n, large p problem*, Strobl *et al.* 2007). Ce problème traduit le fait que dans ce type d'étude on obtient très souvent un très grand nombre (plusieurs centaines, voire milliers) de variables explicatives (e.g. gènes, protéines) qui vont être utilisées pour prédire l'état des organismes/cellules (e.g. cellules cancéreuses vs. cellules saines ou organismes exposés à des pressions ou non). Or, ces centaines de variables prédictives (e.g. spots) ne sont disponibles que pour un nombre limité d'individus/échantillons. Ce grand déséquilibre entre nombre d'échantillons et nombre de spots rend l'étape de sélection des variables dans les modèles de classification classiques (e.g. régressions logistiques) d'autant plus instable que ce déséquilibre est important (Bureau *et al.* 2005).

Pour pallier ce problème, des méthodes statistiques particulières comme les forêts d'arbres de classification (*random forest*: RF_{CART} , Breiman 2001) ont été développées. Cette méthode repose sur la construction de nombreux arbres de régression et de classification (*classification and regression trees*, CART). Pour chaque nœud de l'arbre, un sous-ensemble aléatoire des spots est utilisé permettant ainsi de passer outre le problème « faible n, grand p ». Les individus non utilisés pour chaque arbre sont dits « *out of the bag* » et n'ont donc pas servi à la construction de l'arbre.

Le faible nombre d'échantillons intégrés dans les analyses de type « -omique » (du fait du coût encore élevé de telles analyses) rend la validation des modèles de classification par un jeu de

données indépendant (jeu de données « test ») difficile. Toutefois, les forêts d'arbres de classification disposent d'une méthode de validation interne. Les individus *out of the bag*, non utilisés pour la construction des arbres, sont utilisés pour estimer les erreurs de prédiction. Les profils protéomiques de ces individus sont utilisés pour prédire avec l'arbre de classification dans quel site d'étude ils sont susceptibles d'avoir été exposés. Au niveau de la forêt dans son ensemble, chaque arbre pour lequel un individu donné était « *out of the bag* », dispose donc d'un vote sur l'attribution de cet individu à un site d'exposition. Pour chaque individu, l'attribution finale (i.e. au niveau de la forêt complète) est réalisée à la majorité relative des votes des arbres individuels.

Un point important dans l'utilisation de la méthode RF_{CART} pour la sélection de spots d'intérêt est la possibilité de fournir pour chacun des spots, une mesure de son importance dans l'efficacité du modèle. L'importance d'un spot donné est mesurée au niveau de chaque arbre comme étant l'augmentation des erreurs de prédiction (ou *increase in error rate*, IncErr) survenant après avoir permuté aléatoirement les valeurs de volumes normalisés de ce spot entre les différents individus tout en ne touchant pas aux autres spots. Les spots d'intérêt, i.e. particulièrement intéressants pour prédire les conditions d'exposition à partir des profils protéomiques, sont donc ceux qui ont les plus fortes importances dans les modèles RF_{CART} .

Les prédictions, le taux d'erreurs de prédiction et l'importance des spots sont estimés au niveau de la forêt en faisant la moyenne des prédictions, des taux d'erreurs et des mesures d'importance des spots, respectivement, sur l'ensemble des arbres de la forêt.

8.2.7.2 – Application

Un modèle de classification de type RF_{CART} a été construit par espèce modèle (*Dinocras cephalotes* et *Odontocерum albicorne*). Pour chaque espèce, le modèle de classification tente de prédire de quel site d'exposition (i.e. *ref1*, *acid1* ou *acid2*) provenaient les individus (4 individus par site soit un total de $N = 12$ observations par modèle) à partir de leurs profils d'expression protéomique (i.e. les volumes normalisés de chacun des spots détectés en DIGE). Chacun des 9999 arbres de ces forêts est construit à partir de 63,2% des individus disponibles ($n = N \times 0,632 \approx 8$) et pour chaque nœud de chaque arbre la sélection de la variable explicative s'est faite à partir d'un sous-ensemble aléatoire ($p = 5$) parmi l'ensemble des spots pour lesquels le volume normalisé a été mesuré. Pour chacun des modèles, correspondant à une espèce donnée, l'importance des spots détectés en DIGE a été mesurée avec le paramètre IncErr .

Une analyse de classification ascendante (distance euclidienne et critère d'agrégation de Ward) a ensuite été réalisée sur ces mesures d'importance afin de définir des groupes de spots présentant des importances contrastées. Deux sélections de spots d'intérêt ont été réalisées : la première, dite restreinte (sélection RF1), n'utilise que les spots appartenant au groupe avec la plus forte importance alors que la seconde, dite étendue (sélection RF2), utilise les spots appartenant aux deux groupes ayant les plus fortes importances

8.2.8 – Diagnostic écologique

L'étape de diagnostic écologique est réalisée en suivant une approche similaire à celle utilisée pour sélectionner les spots d'intérêt et celle utilisée pour l'outil de diagnostic basé sur les traits bio-écologiques dans le chapitre IV. Une forêt d'arbres de classification (9999 arbres, $N = 12$, $n = 0,632 \times N$, $p = 5$) a été construite pour chaque taxon en utilisant comme variables prédictives les volumes normalisés des spots appartenant aux sélections RF1 ou RF2. Vu le faible nombre de données ($N = 12$ pour chaque taxon), le jeu de données initial n'a pas été découpé en un jeu de données d'apprentissage et un jeu de données test comme au chapitre IV. La qualité des modèles prédictifs à la base du diagnostic écologique a donc été estimée en calculant le taux d'erreurs de prédictions à partir des individus « *out of the bag* » pour chaque arbre individuel (cf. §8.2.7.1).

8.2.9 – Identification des protéines correspondant aux spots d'intérêt

8.2.9.1 – Spectrométrie de masse

La quantité de protéines utilisée pour réaliser un gel de DIGE est insuffisante pour pouvoir entreprendre une identification en spectrométrie de masse en tandem. Avant de réaliser l'identification, il convient donc de réaliser un nouveau gel dit préparatif où une plus grande quantité de protéines est déposée (600 µg). Ce gel ainsi que les conditions de migration sont strictement identiques à ceux utilisés en DIGE, les seules différences se trouvant dans la quantité de protéine déposée et la coloration utilisée (bleu de Coomassie à la place des cyanines fluorescentes).

Les spots sont excisés du gel de polyacrylamide, lavés puis séchés (centrifugeuse SpeedVac). Les spots sont ensuite soumis à une digestion *in-gel* avec de la trypsine en utilisant un automate (MultiPROBE II, PerkinElmer Sciex). Après lavage [tampon carbonate, CH₃CN (acétonitrile) 50 :50] puis déshydratation du gel par CH₃CN seul, les peptides sont extraits en trois étapes avec une solution H₂O/CH₃CN/TFA (acide trifluoroacétique) (50 :49 :1). Pour pouvoir être analysés en spectrométrie de masse, ces peptides sont remis en suspension dans 12 µL de solution aqueuse (0,1 % d'acide formique et 3 % d'acétonitrile) puis analysés avec un spectromètre de masse en tandem de type ESI-Q-TOF (Agilent 1200 Series HPLC-Chip/MS Interface couplée avec un spectromètre Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF). Un scan complet a d'abord été réalisé (gamme de m/z testé : 60-3000), suivi de cinq scans après fragmentation pour les cinq peptides identifiés comme les plus abondants sur le spectre MS-MS. La source opère en mode de détection d'ions positifs à un potentiel de 1800V.

8.2.9.2 – Recherche dans les bases de données

Les spectres MS-MS générés ont été visualisés avec le logiciel Mass Hunter (Version B.02.00, Agilent) et l'identification des peptides correspondants réalisée en soumettant ces profils MS-MS au moteur de recherche Mascot en utilisant les critères de recherche suivants :

- la base de données utilisée est NCBI nr 20110129,
- les groupes taxonomiques considérés : métazoaires,
- la protéase utilisée est la trypsine, pour laquelle on autorise un clivage manqué,
- les modifications autorisées sur la chaîne polypeptidique sont la carbamidométhylation des cystéines et l'oxydation des méthionines,
- tolérance sur la taille des fragments peptidiques: +/- 0,6 Da,
- type d'instrument : ESI-Q-TOF

Une étape complémentaire d'identification des peptides a été réalisée en interprétant les spectres MS-MS (logiciel PEAKS, Bioinformatics Solutions) afin de séquencer *de novo* le peptide. Ensuite, les séquences obtenues sont soumises au moteur de recherche MSBlast (<http://genetics.bwh.harvard.edu/msblast/>) en utilisant les mêmes paramètres de recherche que précédemment.

Une identification est considérée comme valide quand les deux approches, MASCOT (profils MS-MS) et BLAST (séquençage *de novo*) concordent.

8.3 – Résultats

8.3.1 – DIGE

Le nombre de spots détectés et quantifiés est variable entre les deux espèces exposées. Pour *D. cephalotes*, 595 spots ont été détectés (cf. Fig. 8-6) alors que pour *O. albicorne* ce nombre chute à 290 (cf. Fig. 8-7).

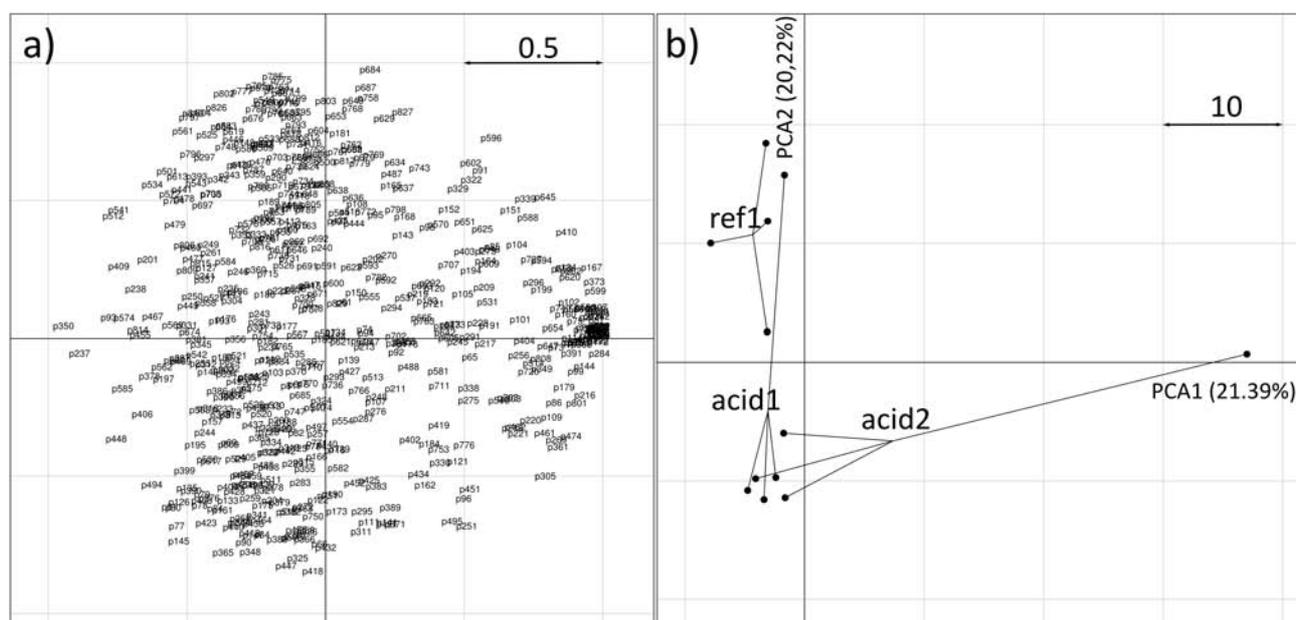


Figure 8-6. Profils d'expressions protéomiques des individus de *Dinocras cephalotes* exposés sur les trois sites d'étude *ref1*, *acid1* et *acid2*. Premier plan factoriel d'une ACP réalisée sur les profils protéomiques (12 individus x 595 spots), les pourcentages de variance expliquée par chacune des composantes principales sont indiqués. a) Position des spots détectés en DIGE, b) position des individus (points noirs) et des sites d'exposition (étoiles).

L'analyse inter-sites montre qu'environ 24,98% de la variabilité protéomique totale est significativement ($p = 0,0148$) expliquée par l'effet « site d'exposition » pour l'espèce *D. cephalotes* (cf. Fig. 8-6). La même analyse réalisée sur les profils d'expression protéomique d'*O. albicorne* (cf. Fig. 8-7) montre que l'effet site ne permet pas d'expliquer significativement la variabilité protéomique ($p = 0,4486$). De plus, on observe que le gradient d'acidification est restitué par les profils protéomiques des individus de *D. cephalotes* mais pas par les profils protéomiques des individus d'*O. albicorne*.

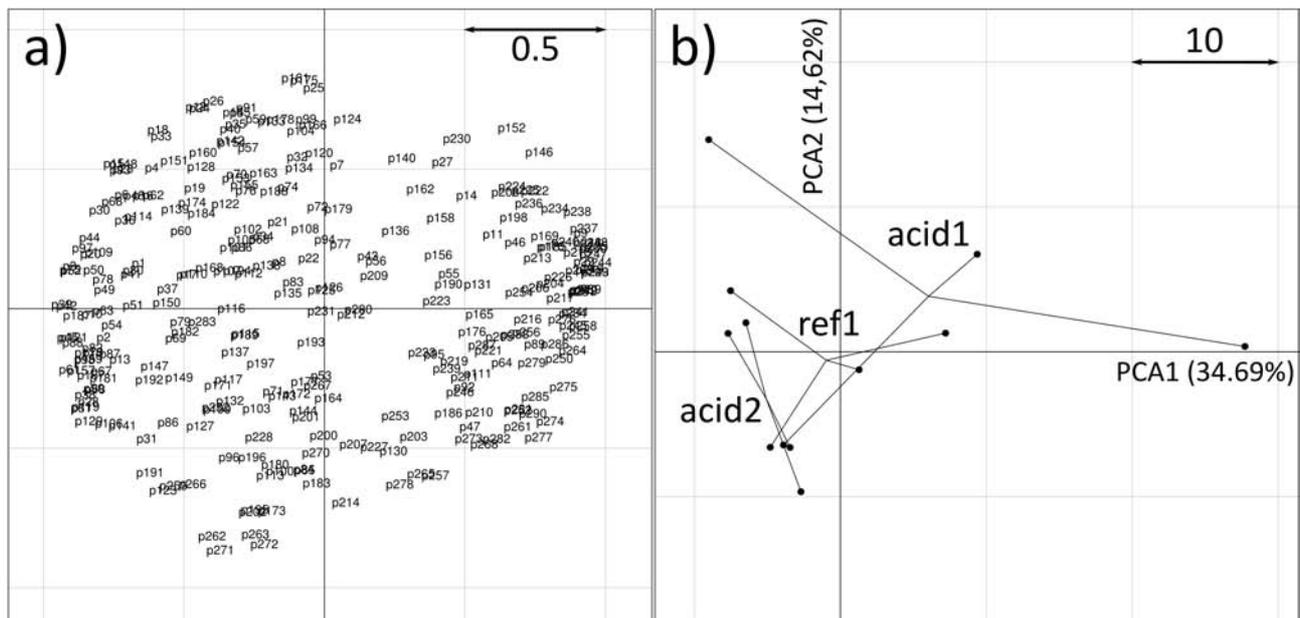


Figure 8-7. Profils d'expressions protéomiques des individus d'*Odontoceram albicorne* exposés sur les trois sites d'étude *ref1*, *acid1* et *acid2*. Premier plan factoriel d'une ACP réalisée sur les profils protéomiques (12 individus x 290 spots), les pourcentages de variance expliquée par chacune des composantes principales sont indiqués. a) Position des spots détectés en DIGE, b) position des individus (points noirs) et des sites d'exposition (étoiles).

8.3.2 – Sélection des spots d'intérêt

8.3.2.1 – *Dinocras cephalotes*

Chacun des douze individus de *D. cephalotes*, au cours de la construction de la forêt, s'est retrouvé être « *out of the bag* » en moyenne dans 3519,42 arbres de classification individuels (+/- 59,81) et s'est donc vu attribué autant de fois un site d'exposition. En se basant sur la répartition de l'ensemble des votes des arbres individuels, chaque individu s'est vu attribué au niveau de la forêt entière, un site d'exposition. La confrontation entre les sites attribués par le modèle et les sites d'exposition réels a permis d'établir la matrice de confusion présentée dans le Tableau 8-II. Il apparaît alors que la forêt d'arbres de classification réalisée présente de faibles performances. En effet, le taux d'erreur moyen est de 50%.

Toutefois, on peut remarquer que ce modèle permet de discriminer avec une bonne efficacité le site de référence des sites acidifiés (taux d'erreur de 25%) mais que le gradient d'acidification n'est pas retrouvé, les individus exposés dans le site *acid2* étant particulièrement mal classés (taux d'erreur de 75%).

*Tableau 8-II. Performances de la forêt d'arbres de classification réalisée à partir des volumes normalisés de 595 spots pour les douze individus de *Dinocras cephalotes* exposés à différentes conditions d'acidification. La matrice de confusion est créée à partir des individus « out of the bag ».*

<i>Obs. \ Pred.</i>	<i>ref1</i>	<i>acid1</i>	<i>acid2</i>	<i>Taux d'erreur</i>
<i>ref1</i>	3	0	1	0,25
<i>acid1</i>	1	2	1	0,50
<i>acid2</i>	1	2	1	0,75

Lorsque l'on regarde la classification des spots en fonction de leur importance dans le modèle (Fig. 8-8), on remarque qu'une majorité des spots (326 soit 54,79%) ont globalement une importance négative (groupe 1), c'est à dire que leur intégration dans le modèle prédictif dessert ses performances. Les 269 spots restant ont globalement une importance positive, c'est à dire que leur intégration dans le modèle améliorerait ses performances. Toutefois, tous ces spots ne sont pas équivalents, on peut distinguer 3 groupes (2, 3 et 4) présentant des niveaux d'importance croissants. La sélection restreinte (RF1) comporte donc 14 spots (groupe 4) et la sélection étendue (RF2) 113 spots (groupes 3 et 4).

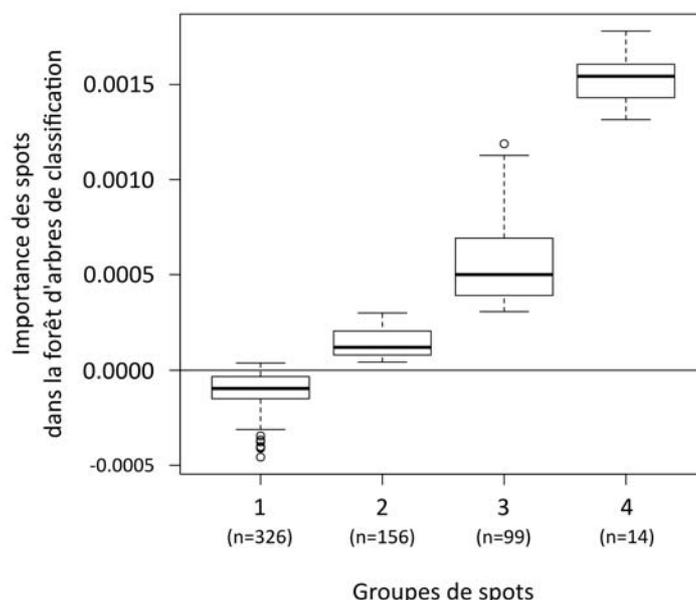


Figure 8-8. Importance des spots dans la forêt d'arbres de classification correspondant à l'espèce *Dinocras cephalotes*. La distribution des valeurs d'importance des spots au sein de chaque groupe est représentée par des boîtes (premier quartile, médiane, troisième quartile) à moustaches. Les cercles représentent les spots ayant des valeurs d'importance extrêmes par rapport à leur groupe. Le nombre de spots par groupe (n) est indiqué.

8.3.2.2 – *Odontocерum albicorne*

Chacun des individus d'*O. albicorne* s'est retrouvé être « out of the bag » en moyenne dans 3507,33 arbres de classification individuels (+/- 38,99). D'après la matrice de confusion obtenue (Tableau 8-III), il est observé que la forêt d'arbres de classification construite d'après les profils protéomiques d'*O. albicorne* a des performances nulles, avec en moyenne un taux d'erreur de 91,67%. Quatre groupes de spots avec des importances différentes peuvent être distingués (Fig. 8-9). Une majorité de spots (188 soit 64,83%) appartiennent à des groupes ayant une importance globalement négative (groupes 1 et 2), pénalisant donc le modèle prédictif. Les spots restant sont divisés en trois groupes dont un avec une importance très faible, non différente de 0 (groupe 3). La sélection RF1 comprend donc 8 spots (groupe 5) et la sélection RF2 41 spots (groupes 4 et 5).

Tableau 8-III. Performances de la forêt d'arbres de classification réalisée à partir des volumes normalisés de 290 spots pour les douze individus d'*Odontocercus albicorne* exposés à différentes conditions d'acidification. La matrice de confusion est créée à partir des individus « out of the bag ».

Obs. \ Pred.	ref1	acid1	acid2	Taux d'erreur
ref1	0	2	2	1,00
acid1	1	1	2	0,75
acid2	4	0	0	1,00

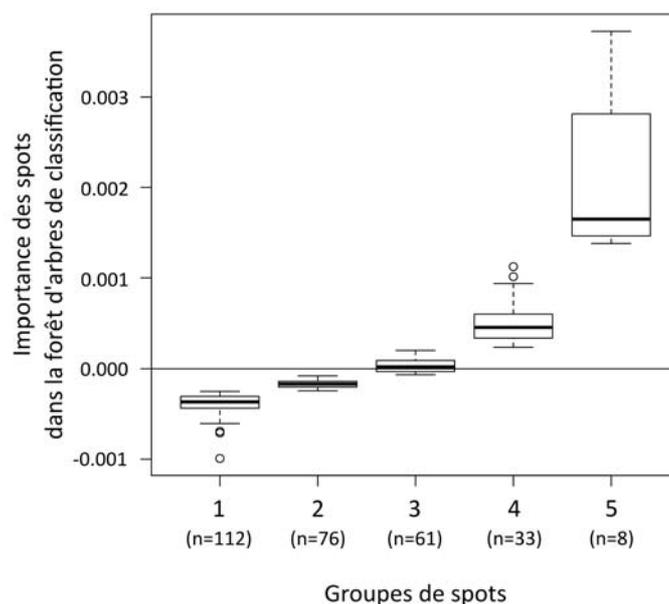


Figure 8-9. Importance des spots dans la forêt d'arbres de classification correspondant à l'espèce *Odontocercus albicorne*. La distribution des valeurs d'importance des spots au sein de chaque groupe est représentée par des boîtes (premier quartile, médiane, troisième quartile) à moustaches. Les cercles représentent les spots ayant des valeurs d'importance extrêmes par rapport à leur groupe. Le nombre de spots par groupe (n) est indiqué.

8.3.3 – Diagnostic écologique

8.3.3.1 – *Dinocras cephalotes*

La forêt d'arbres de classification construite à partir des profils protéiques des 12 individus pour la sélection RF2 (113 spots) est bien plus efficace que celle construite à partir de l'ensemble des 595 spots (Tableau 8-IV), ramenant le taux d'erreur moyen à 16,67%. Ce taux d'erreur vient du mauvais classement de deux des quatre individus exposés dans le site ayant un niveau d'acidification intermédiaire, *acid1*, un de ces individus étant classé dans le site *ref1* et l'autre dans le site *acid2*. Le fait de ne construire le modèle de forêt d'arbres de classification qu'à partir de la sélection RF1 (14 spots) permet d'améliorer encore l'efficacité de classement du modèle (Tableau 8-V), puisque le taux d'erreur tombe alors à 0%, le bon site d'exposition étant attribué pour chacun des douze individus.

Tableau 8-IV. Performances du modèle de classification *Dinocras_RF2*. La matrice de confusion est créée à partir des individus « out of the bag ».

<i>Obs. \ Pred.</i>	<i>ref1</i>	<i>acid1</i>	<i>acid2</i>	Taux d'erreur
<i>ref1</i>	4	0	0	0.0
<i>acid1</i>	1	2	1	0.5
<i>acid2</i>	0	0	4	0.0

Tableau 8-V. Performances du modèle de classification *Dinocras_RF1*. La matrice de confusion est créée à partir des individus « out of the bag ».

<i>Obs. \ Pred.</i>	<i>ref1</i>	<i>acid1</i>	<i>acid2</i>	Taux d'erreur
<i>ref1</i>	4	0	0	0.0
<i>acid1</i>	0	4	0	0.0
<i>acid2</i>	0	0	4	0.0

8.3.3.2 – *Odontocерum albicorne*

Pour la deuxième espèce modèle, la construction d'un modèle de forêt d'arbres de classification sur la sélection RF2 de spots permet également d'améliorer très significativement les performances du modèle par rapport au modèle « complet ». Le taux d'erreur passe ainsi de 91,67% (290 spots, Tableau 8-III) à 41,67% (41 spots, Tableau 8-VI), ce qui, toutefois, reste encore élevé.

Parmi les quatre individus exposés dans le site *acid1*, un individu a été classé dans le site *ref1* et un autre dans le site *acid2*, rappelant ce qui a été déjà observé avec le modèle RF2 pour *D. cephalotes*. Le fait de ne considérer que la sélection RF1 de spots améliore encore légèrement les performances du modèle, abaissant le taux d'erreur à 25% (Tableau 8-VII).

Tableau 8-VI. Performances du modèle de classification *Odontocерum_RF2*. La matrice de confusion est créée à partir des individus « out of the bag ».

Obs. \ Pred.	<i>ref1</i>	<i>acid1</i>	<i>acid2</i>	Taux d'erreur
<i>ref1</i>	2	0	2	0,50
<i>acid1</i>	1	2	1	0,50
<i>acid2</i>	1	0	3	0,25

Tableau 8-VII. Performances du modèle de classification *Odontocерum_RF1*. La matrice de confusion est créée à partir des individus « out of the bag ».

Obs. \ Pred.	<i>ref1</i>	<i>acid1</i>	<i>acid2</i>	Taux d'erreur
<i>ref1</i>	3	0	1	0,25
<i>acid1</i>	0	3	1	0,25
<i>acid2</i>	1	0	3	0,25

Tableau 8-VIII. Résultats de l'identification des protéines par spectrométrie de masse en tandem. Les identifications validées par les deux approches (MASCOT et BLAST) apparaissent en gras.

Spot	MASCOT		BLAST	
	Protéine	Espèce	Protéine	Espèce
p165	Identification non valide		Identification non valide	
p290	Identification non valide		Amino-terminal enhancer of split	<i>Mus musculus</i> (Chordata Mammalia)
p333	Actine	<i>Sitobion avenae</i> (Insecta Hemiptera)	Actine	<i>Drosophila melanogaster</i> (Insecta Diptera)
p357	Arginine kinase	<i>Calosoma scrutator</i> (Insecta Coleoptera)	Arginine kinase	<i>Schistoceca americana</i> (Insecta Orthoptera)
	Protéasome 35kD	<i>Drosophila melanogaster</i> (Insecta Diptera)		
p441	Arginine kinase	<i>Periplaneta americana</i> (Insecta Dictyoptera)	Arginine kinase	<i>Drosophila melanogaster</i> (Insecta Diptera)
p444	Troponine (isoforme 1)	<i>Lethocerus indicus</i> (Insecta Hemiptera)	Troponine (T)	<i>Periplaneta americana</i> (Insecta Dictyoptera)
p451	Hexamérine	<i>Perla marginata</i> (Insecta Plecoptera)	Hexamérine	<i>Blaberus discoidalis</i> (Insecta Dictyoptera)
p474	Hexamérine	<i>Perla marginata</i> (Insecta Plecoptera)	Hexamérine	<i>Maducta sexta</i> (Insecta Lepidoptera)
			Arylphorin (subunit beta)	<i>Blaberus discoidalis</i> (Insecta Dictyoptera)
			Sex-specific storage protein	<i>Maducta sexta</i> (Insecta Lepidoptera)
			Hemocyanin	<i>Maducta sexta</i> (Insecta Lepidoptera)
p495	Hexamérine	<i>Perla marginata</i> (Insecta Plecoptera)	Hexamérine	<i>Androctonus australis</i> (Chelicerata)
			Arylphorin (subunit beta)	<i>Blaberus discoidalis</i> (Insecta Dictyoptera)
p485	Identification non valide		Identification non valide	<i>Maducta sexta</i> (Insecta Lepidoptera)
p613	Paramyosine (forme longue)	<i>Camponotus floridanus</i> (Insecta Hymenoptera)	Paramyosine (forme longue)	<i>Drosophila melanogaster</i> (Insecta Diptera)
p735	Identification non valide		Eppine	<i>Mus musculus</i> (Chordata Mammalia)
p808	Myosine (chaîne légère)	<i>Bombyx mori</i> (Insecta Lepidoptera)	Myosine (chaîne légère)	<i>Drosophila melanogaster</i> (Insecta Diptera)
			Myosine (chaîne légère)	<i>Drosophila virilis</i> (Insecta Diptera)

8.3.4 – Protéines identifiées

L'identification des protéines n'a pour le moment été réalisée que pour l'espèce modèle *Dinocras cephalotes*, qui au vu des modèles des analyses précédentes semblait la plus prometteuse. En croisant la sélection RF2 avec une sélection de spots réalisée à l'aide des outils statistiques intégrés au logiciel Progenesis Samespots (travail réalisé par M. Parant, B. Naudin & T. Jouenne), une sélection de 21 spots a été retenue pour identification par spectrométrie de masse (Fig. 8-10).

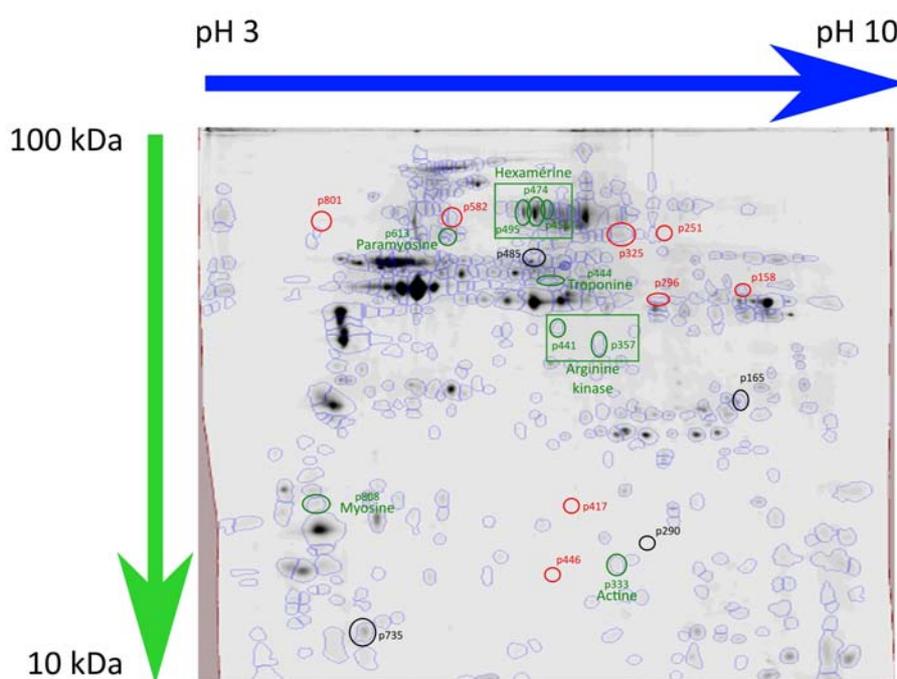


Figure 8-10. Spots sélectionnés pour identification en spectrométrie de masse en tandem. Les flèches indiquent les sens de migration au cours des deux étapes de séparation des protéines: en fonction de leur point isoélectrique (bleu) et en fonction de leur masse (vert). Les ellipses rouges, noires et vertes correspondent respectivement aux spots non analysés car non repérables, analysés mais sans identification validée et analysés avec une identification validée.

Sur ces 21 spots, huit n'ont pas pu être repérés sur le gel préparatif et n'ont donc pas pu être analysés, quatre n'ont pas donné d'identification valide et enfin neuf ont été identifiés et validés (Fig. 8-10, Tableau 8-VIII). Un des spots avec une identification validée correspond à l'actine, deux à l'arginine kinase (AK), un à la troponine, trois à l'hexamérine, un à la paramyosine et un à la myosine (Tableau 8-VIII). Pour chacune de ces protéines, la relation entre le niveau d'expression (estimé par le volume normalisé) et le gradient d'acidification a été étudiée (Figs 8-11 & 8-12).

Les trois spots correspondant à l'hexamérine suivent les mêmes tendances d'expression le long du gradient d'acidification (Fig. 8-11a), l'expression de cette protéine augmentant graduellement avec le gradient d'acidification.

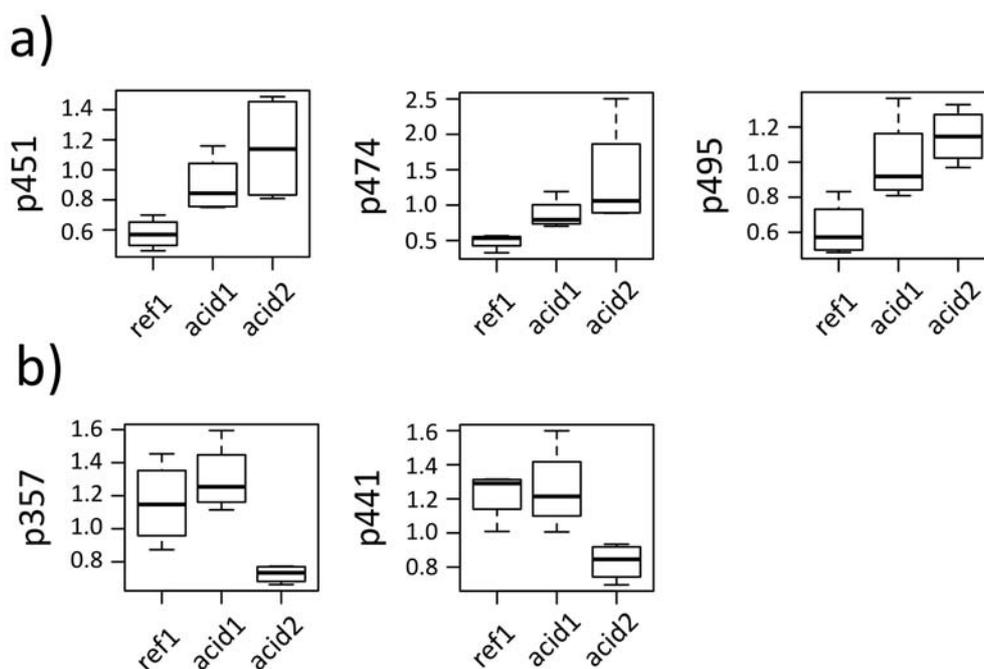


Figure 8-11. Évolution de l'expression des protéines (a : hexamérine et b : arginine kinase) le long du gradient d'acidification. Les sites d'exposition sont en abscisse et le volume normalisé des spots en ordonnée. La distribution des volumes normalisés des spots pour chaque site d'exposition est représentée par des boîtes (premier quartile, médiane, troisième quartile) à moustaches (minimum, maximum).

Les deux spots correspondant à l'arginine kinase suivent également des tendances d'expression similaires le long du gradient d'acidification (Fig. 8-11b), l'expression de cette protéine se maintenant dans des conditions de faible acidification (*acid1*) puis chutant brutalement lorsque les conditions d'acidification deviennent plus sévères (*acid2*).

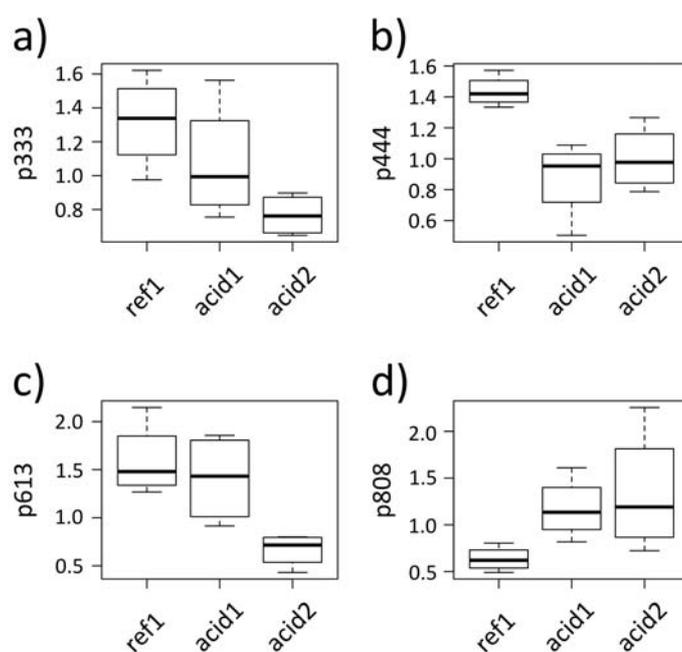


Figure 8-12. Évolution de l'expression des protéines (a : actine, b : troponine, c : paramyosine et d : myosine) le long du gradient d'acidification. Les sites d'exposition sont en abscisse et le volume normalisé des spots en ordonnée. La distribution des volumes normalisés des spots pour chaque site d'exposition est représentée par des boîtes (premier quartile, médiane, troisième quartile) à moustaches (minimum, maximum).

Les quatre dernières protéines identifiées sont impliquées dans le fonctionnement des muscles. Trois d'entre elles voient leur expression diminuer avec l'acidification, même si cette baisse apparaît pour des niveaux différents d'acidification : graduellement pour l'actine (Fig. 8-12a), dès un faible niveau d'acidification pour la troponine (Fig. 8-12b) et seulement à partir d'une forte acidification pour la paramyosine (Fig. 8-12c). Au contraire la myosine semble voir son niveau d'expression augmenter avec le gradient d'acidification (Fig. 8-12d).

8.4 – Discussion

Sur la vingtaine de spots sélectionnés pour une identification en spectrométrie de masse en se basant sur les résultats obtenus avec les gels de la DIGE, huit (38%) n'ont pas pu être repérés sur le gel préparatif. Les colorants utilisés pour révéler les spots dans les deux types de gel diffèrent quand à leur sensibilité, c'est à dire la quantité minimale de protéine nécessaire pour qu'un spot soit repéré avec le colorant. Les colorants fluorescents utilisés en DIGE, les cyanines, sont plus sensibles que le bleu de Coomassie utilisé dans le gel préparatif (Liebler 2001 ; Lilley & Friedman 2004). Il est couramment admis que des protéines non visibles avec une coloration au bleu de Coomassie sont présentes en quantité trop faible pour permettre une identification en spectrométrie de masse. Ainsi, vu la forte sensibilité des cyanines, il est possible que certaines protéines visibles en DIGE soient présentes en très faibles quantités et ne puissent être prélevées et analysées sur le gel préparatif.

8.4.1 – Réponses protéomiques au stress acide

Les deux espèces modèles étudiées dans ce travail ont montré des réponses protéomiques différentes le long du gradient d'acidification. L'espèce *O. albicorne* est considérée comme acido-tolérante (Guérold *et al.* 1995a ; Braukmann 2001). Sa niche écologique et physiologique devrait donc recouvrir les conditions d'acidification retrouvées dans les sites d'exposition *acid1* et *acid2*, ce qui semble être confirmé par les analyses protéomiques réalisées. En effet, l'influence des conditions d'exposition sur la variabilité protéomique totale des individus de cette espèce n'a pas pu être significativement démontrée (Fig. 8-7). De même le nombre de spots visibles en DIGE et appartenant à des groupes de spots présentant une importance positive dans les modèles RF est relativement faible (41 spots soit 14% des 290 spots, cf. Fig. 8-9). Ceci laisse supposer que les conditions d'exposition n'entraînent pas de bouleversement profond du fonctionnement biochimique des organismes, changements qui pourraient résulter soit de la mise en place de mécanismes de défense contre le stress acide soit des conséquences directes de ce stress sur le métabolisme des individus.

Au contraire, l'espèce *Dinocras cephalotes* est considérée comme étant plutôt acido-sensible (Braukmann 2001 ; Felten & Guérold 2006) et ne se retrouve jamais naturellement, dans le secteur d'étude, dans des cours d'eau acidifiés (Tixier & Guérold 2005). La niche écologique et physiologique de cette espèce ne semblant pas recouvrir les conditions d'exposition, on pouvait donc penser que les organismes exposés montreraient des réponses significatives à cette exposition, ce qui a été confirmé par les analyses réalisées. En effet, une part significative (25%) de la variabilité protéomique totale observée chez les individus exposés peut être imputée aux conditions d'exposition (Fig. 8-6). De plus, il apparaît aussi qu'un grand nombre de spots identifiés en DIGE présentait une importance positive dans les modèles de classification de type RF (269 spots soit 45% des 595 spots, cf. Fig. 8-8). Ces spots présentaient donc des réponses différentielles marquées entre les différents sites d'exposition.

Il faut toutefois être prudent sur les conclusions quant à la faible réponse chez *O. albicorne*. En effet, les techniques d'électrophorèse en deux dimensions semblent mieux adaptées à la détection de protéines exprimées en relativement grande quantité (Liebler 2001). Il est donc probable, malgré le grand nombre de réponses déjà prises en compte, qu'une partie importante des réponses protéomiques ne puissent être détectées avec cette analyse. Ces réponses « invisibles » en DIGE peuvent être (i) des modifications de l'activité et non de l'expression des protéines, (ii) des modifications de l'expression de protéines présentes en faible quantité dans l'organisme mais ayant des fonctions importantes ou (iii) des changements d'expression (et/ou d'activité) de certaines protéines trans-membranaires difficilement solubles (malgré l'utilisation de détergents, e.g. CHAPS) et donc difficilement analysables en électrophorèse 2D. Certaines de ces protéines trans-membranaires (comme les canaux ioniques) pourraient en effet jouer un rôle important dans les mécanismes de défense contre un stress acide, puisque les perturbations de la régulation osmotique sont l'un des principaux problèmes posés par l'acidification (Felten & Guérold 2006).

L'analyse en spectrométrie de masse « en tandem » a permis d'identifier les protéines correspondant à neuf spots présentant une expression différentielle en fonction des sites d'exposition chez *D. cephalotes*. Ces protéines peuvent être classées en deux grands groupes : des protéines impliquées dans les fonctions de stockage – d'acides aminés (hexamérine) ou énergétique (arginine kinase) – et des protéines impliquées dans les fonctions musculaires (actine, myosine, paramyosine et troponine).

Après quatre semaines d'exposition en milieu acidifié, trois protéines musculaires (troponine, actine et paramyosine) se trouvent réprimées (au moins dans le site *acid2*). Ces résultats sont en accord avec les résultats de Favrel (1998) qui, lors d'expositions à des conditions acides similaires à celles observées dans le site *acid2* (pH 4,6 ; conductivité 22 $\mu\text{S}/\text{cm}$), a observé une plus faible vitalité et mobilité des larves de *D. cephalotes* exposées par rapport aux individus témoins et cette diminution semblait d'autant plus marquée que l'exposition était longue.

Deux des spots pour lesquels une identification a été possible correspondraient à une enzyme : l'arginine kinase (AK). Cette enzyme est présente chez un grand nombre d'invertébrés, spécialement dans les muscles, où elle joue un rôle important dans le métabolisme énergétique, rôle analogue à la créatine kinase des vertébrés (Blethen & Kaplan 1968).

L'adénosine triphosphate (ATP) est la molécule qui fournit l'énergie nécessaire pour les réactions chimiques du métabolisme cellulaire. Cette énergie est obtenue en hydrolysant une liaison à haut niveau énergétique (liaison anhydride phosphorique) libérant ainsi, outre de l'énergie, un groupe phosphoryle et une molécule d'adénosine diphosphate (ADP). L'ATP est donc une molécule fournissant de l'énergie mais elle ne peut être stockée et doit donc pouvoir être continuellement synthétisée à partir de l'ADP pour répondre aux besoins de l'organisme.

La réaction catalysée par l'AK est le transfert réversible d'un groupe phosphoryle d'une molécule d'adénosine triphosphate (ATP) à un acide aminé (l'arginine) produisant une molécule d'adénosine diphosphate (ADP) et un phosphagène, la phosphoarginine :



La phosphoarginine constitue donc un stock énergétique qui, en cas d'effort musculaire, permet, grâce à l'AK, de rapidement renouveler le stock d'ATP en attendant que la glycolyse ne prenne le relais (Newsholme *et al.* 1978 ; Brown & Grossman 2004). En effet, la glycolyse régénère l'ATP à partir d'ADP, de phosphore inorganique et de l'énergie libérée par le métabolisme du glucose mais est composée d'une dizaine d'étapes rendant le renouvellement de l'ATP plus lent qu'avec l'AK.

De récentes études protéomiques ont par ailleurs démontré que l'arginine kinase semblait être un bon indicateur d'un état de stress en général, puisque son expression est également significativement modifiée lorsque les organismes sont exposés à des conditions d'hypoxie (sur-expression : Abe, Hirai & Okada 2007 ; ou sous-expression : Jiang *et al.* 2009), à des contaminations aux métaux (sous-expression : Zhou *et al.* 2010) ou aux PCB (sous-expression : Leroy *et al.* 2010) et même à du parasitisme (sur-expression : Kang *et al.* 2011).

La sous-expression de protéines musculaires et d'une enzyme responsable de l'approvisionnement des cellules en énergie semble suggérer une perturbation importante de la fonction musculaire et de la motricité des organismes, ce qui peut entraîner une baisse de la prise alimentaire (Favrel 1998) et de la respiration. En effet, les Perlidae ont un comportement respiratoire particulier, les individus s'accrochent au substrat et font des « pompes » (Genkai-Kato *et al.* 2000). Ce comportement a pour conséquence d'améliorer l'efficacité respiratoire des branchies coxales qui apportent plus de 70% de l'oxygène absorbé par l'organisme (Kapoor 1974). Une baisse de la motricité chez ces organismes se traduirait donc par une diminution de l'absorption d'énergie (nourriture et oxygène) limitant ainsi les mécanismes de défense pouvant être mis en place.

Les trois derniers spots pour lesquels une identification a été obtenue correspondent à des hexamérines. Ces protéines constituent une grande famille de protéines hémolympatiques présente chez tous les insectes (Hagner-Holler *et al.* 2007). De nombreuses fonctions ont été proposées pour ces protéines (e.g. le transport d'hormones, la réponse immunitaire ; Burmester 1999) toutefois la fonction principale, et la plus primitive, de cette famille de protéines semble être le stockage d'acides aminés (Burmester 1999). Ces protéines serviraient donc de stock

d'acides aminés qui seraient utilisés par les organismes dans les épisodes de mue (Terwilliger 1999), de jeûne ou de diapause (Hahn & Denlinger 2007). Au cours de ces périodes, les hexamérines peuvent soit (i) être hydrolysées pour que les acides aminés les constituant servent à la synthèse de nouveaux tissus, soit (ii) être utilisées intactes en étant incorporées dans la nouvelle cuticule (Telfer & Kunkel 1991). Les Plécoptères constituent un des ordres d'insectes les plus anciens (Resh & Solem 1996). Ce caractère « primitif » est également retrouvé lorsque l'on compare les séquences des hexamérines de différents ordres d'insectes entre elles et avec les séquences des hémocyanines (i.e. des protéines respiratoires dont dériveraient les hexamérines ; Beintema *et al.* 1994) d'insectes et de crustacés (Hagner-Holler *et al.* 2007). Il semble donc probable que les hexamérines des Plécoptères aient pour fonction principale le stockage d'acides aminés (Hagner-Holler *et al.* 2007). Les résultats de cette étude protéomique montrent bien que l'expression de ces protéines augmente avec le gradient d'acidification (Fig. 8-11a). Deux hypothèses non exclusives peuvent alors être posées sur les mécanismes de défense contre les effets de l'acidification mis en place par les organismes et dans lesquels les hexamérines joueraient un rôle: (i) une accélération du rythme de mue et (ii) une augmentation de la consistance de l'hémolymphe.

En condition acide, la forte concentration en protons entraîne une fuite importante des ions sodium (Na^+) depuis l'hémolymphe vers le milieu extérieur. Ce phénomène a déjà été observé chez de nombreux organismes, par exemple des poissons (Fromm 1980), des crustacés (Morgan & McMahon 1982 ; Felten & Guérold 2006) et des insectes (e.g. Rowe *et al.* 1989) dont *D. cephalotes* (Favrel 1998 ; Felten & Guérold 2006). Ce dérèglement du contrôle osmotique peut provoquer la mort de l'individu. Des structures spécialisées dans l'absorption des ions existent afin de compenser les pertes d'ions vers le milieu extérieur. Chez les Plécoptères ce sont des cellules à chlorure (Komnick 1977). Au sein de la famille des Perlidae, ces structures seraient de type « coniforme » (Fig. 8-13). Cette structure d'absorption est composée de deux parties : une partie basale (Fig. 8-13b) située sous la cuticule et une partie apicale (Fig. 8-13c) qui passe au travers de la cuticule et qui, protégée par une plaque poreuse de cuticule (Fig. 8-13d), est en contact avec le milieu extérieur où les ions sont prélevés (Komnick 1977).

Lorsque des Perlidae sont exposés à un milieu acidifié (faible pH, faible minéralisation et forte concentration en aluminium), l'aluminium se dépose visiblement sur les sites d'absorption des cellules à chlorure (i.e. la plaque poreuse) pouvant ainsi provoquer une perte d'efficacité des mécanismes d'osmorégulation (Guérolde *et al.* 1995b). L'augmentation de la synthèse d'hexamérine le long du gradient d'acidification pourrait donc traduire une accélération du rythme de mue qui permettrait de se débarrasser des dépôts d'aluminium sur la cuticule et les plaques poreuses et ainsi limiter la perturbation de la fonction d'osmorégulation. Ce mécanisme a déjà pu être observé, par exemple, chez l'éphémère *Leptophlebia cupida* (Rowe *et al.* 1989). Il conviendrait donc de vérifier si cette accélération du rythme de mue en milieu acidifié se confirme également sur les Plécoptères en général et chez *D. cephalotes* en particulier.

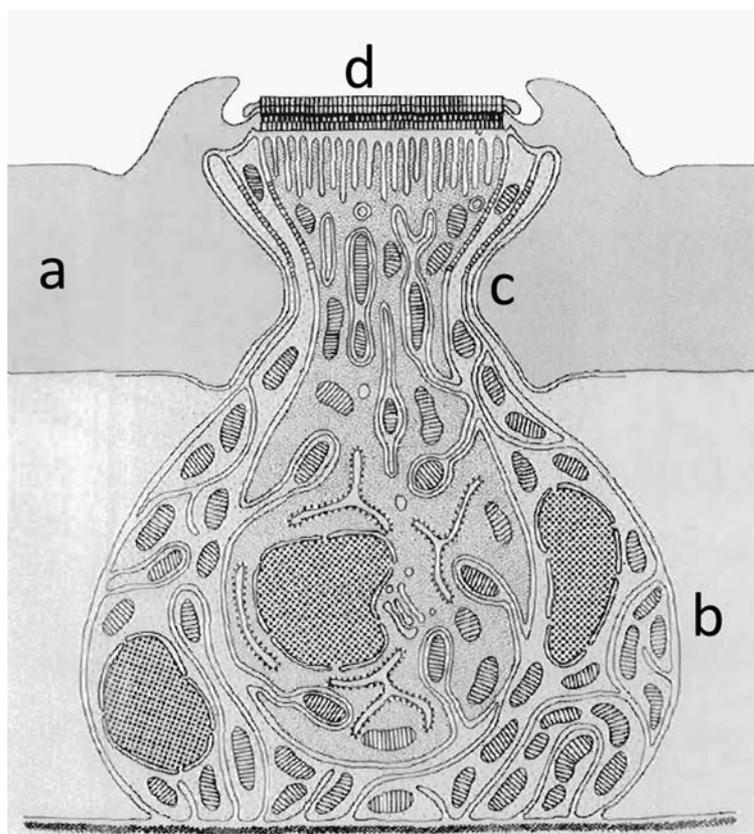


Figure 8-13. Cellules à chlorure de Plécoptère formant une structure de type coniforme. a : cuticule, b : partie basale de la structure, c : partie apicale de la structure et d : plaque poreuse de cuticule. (adapté de Komnick 1977)

Comme vu précédemment, l'acidification entraîne une diminution de l'osmolarité de l'hémolymphe de *D. cephalotes* en déclenchant la fuite d'ions sodium vers le milieu extérieur. Afin de limiter les effets de cette fuite d'ions, l'organisme peut essayer d'augmenter l'absorption d'ions via les cellules à chlorure (comme expliqué précédemment) mais également libérer dans l'hémolymphe des ions intra-cellulaires comme le sodium et le potassium (Favrel 1998). Si ces mesures ne parviennent pas à rétablir l'équilibre osmotique, une concentration de l'hémolymphe peut avoir lieu. Favrel (1998) a ainsi observé une augmentation de la concentration en protéines hémolympatiques dans les organismes exposés à un stress acide. Cette concentration pourrait s'expliquer par deux hypothèses: (i) une augmentation des protéines circulantes et (ii) une diminution du volume de l'hémolymphe. Ses travaux ayant par ailleurs montré une diminution du volume hémolympatique par réabsorption de l'eau par les cellules, Favrel (1998) a privilégié la seconde hypothèse sans toutefois complètement exclure la première. Or nos résultats tendent à prouver que la première hypothèse serait également valable puisque la synthèse importante d'hexamérine dans l'hémolymphe (où elle peut représenter jusqu'à plus de 50% des protéines, Telfer & Kunkel 1991) pourrait également contribuer à limiter l'apparition d'un gradient osmotique entre les compartiments intra- et extra-cellulaires de l'organisme.

8.4.2 – Utilisation du protéome en bio-indication

Les différences de profils protéomiques entre les organismes exposés sur le site témoin (*ref1*) et les sites acidifiés (*acid1* et *acid2*) ne sont pas aussi marquées pour l'espèce acido-tolérante *O. albicorne* que pour l'espèce acido-sensible *D. cephalotes*. Cette différence d'intensité dans la réponse protéomique au stress acide se retrouve dans l'efficacité des modèles de diagnostic établis à partir des profils protéomiques des deux espèces. En effet, les modèles construits pour *D. cephalotes* montrent des taux d'erreur (protéome entier : 50,0% / sélection RF2 : 16,67% / sélection RF1 : 0%) en moyenne plus de deux fois inférieurs à ceux construits pour *O. albicorne* (91,7% / 41,7% / 25,0%). Ces résultats soulignent le problème, maintes fois posé, du choix des espèces modèles à prendre en compte pour des études utilisant des bio-marqueurs (e.g. Hyne & Maher 2003) ou des bio-essais (e.g. Ducrot 2005) afin de réaliser une évaluation du risque écologique. Au vu de la très grande variabilité de sensibilité de différentes espèces à un même stress, il est préconisé d'utiliser des batteries de tests utilisant différentes espèces (Admiraal *et al.*

2000). Une approche originale pour la sélection des espèces modèles d'une telle batterie a été proposée par Ducrot *et al.* (2005). Selon cette méthode, les espèces modèles seront sélectionnées en se basant sur une classification obtenue d'après leurs profils de traits bio-écologiques. Cette approche se base sur le fait que la sensibilité des organismes aux contaminants est fortement liée à des traits décrivant par exemple leur morphologie, leur histoire de vie, leur physiologie, leur régime alimentaire (Baird & van den Brink 2007) et leur stratégie d'utilisation de l'habitat. La combinaison des réponses protéomiques obtenues avec une telle batterie d'organismes, suivant la même méthode que celle décrite dans ce chapitre, permettrait alors d'avoir un aperçu représentatif des réponses moléculaires à un stress donné, à l'échelle de l'assemblage faunistique.

L'utilisation de bio-marqueurs peut permettre d'appréhender certains aspects des mécanismes de toxicité au niveau individuel (Forbes, Palmqvist & Bach 2006). L'un des intérêts de l'approche protéomique est la possibilité de mettre en évidence et d'identifier objectivement des bio-marqueurs efficaces parmi un très large pool de bio-marqueurs « potentiels » (Issaq *et al.* 2002 ; Nesatyy & Suter 2007). Dans ce chapitre, nous avons montré que l'approche protéomique couplée à la sélection de spots par la méthode des forêts d'arbres de classification permettait l'identification de six bio-marqueurs potentiels du stress acide. Il est intéressant de noter que ces protéines ne font pas partie des jeux de bio-marqueurs classiquement utilisés bien que leurs réponses au stress acide peut relativement facilement être mises en relation avec des mécanismes connus de la toxicité des eaux acides comme la dérégulation de l'osmorégulation (Morgan & McMahon 1982 ; Favrel 1998 ; Masson, Guérold & Dangles 2002 ; Felten & Guérold 2006).

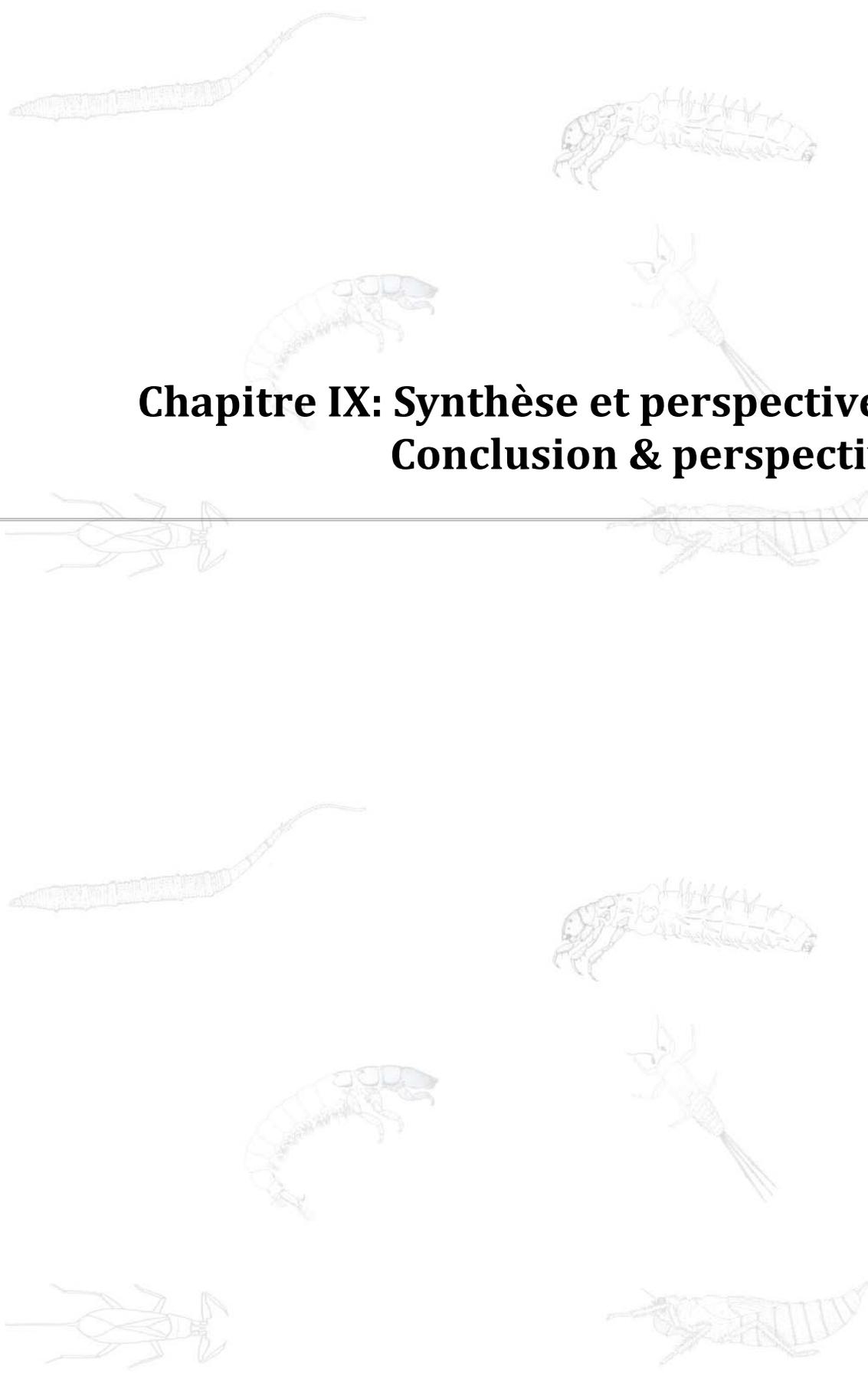
L'un des reproches souvent adressés aux études utilisant des bio-marqueurs isolés est le faible niveau de confiance que l'on peut accorder à l'interprétation des mesures obtenues sans une connaissance approfondie de potentiels facteurs confondants (Forbes *et al.* 2006), tels que le sexe (Sroda & Cossu-Leguille 2011), la composition du cocktail de polluants (Martín-Díaz *et al.* 2005) ou encore le parasitisme (Minguez *et al.* 2012). De plus, de la même manière que pour certaines métriques taxonomiques ou fonctionnelles (e.g. la diversité taxonomique et le pourcentage d'organismes polyvoltins, cf. chapitre III), certaines réponses moléculaires peuvent résulter de l'exposition des organismes à plusieurs types de pressions ou de stress anthropogéniques. Par exemple, la synthèse des métallothionéines n'est pas seulement induite

par la présence de métaux mais aussi par d'autres facteurs comme un stress oxydant (Haq, Mahoney & Koropatnick 2003). Comme pour les métriques taxonomiques et bio-écologiques, ces biais peuvent être limités par la prise en compte et l'interprétation simultanée de plusieurs bio-marqueurs (Beliaeff & Burgeot 2002 ; Shi *et al.* 2004).

L'approche protéomique permet, en une seule analyse, de mesurer une très grande partie des protéines d'un tissu / individu formant ainsi une batterie de mesures très complète de l'état des organismes. Un nombre croissant d'études montre que des approches protéomiques permettent de mettre en évidence des différences d'expression des protéines d'organismes modèles entre des situations de contrôle et des situations stressantes (Hu *et al.* 2003 ; Olsson *et al.* 2004 ; Nesatyy & Suter 2007 ; Wang *et al.* 2008 ; Immel, Renaut & Masfaraud 2012).

8.5 – Conclusion

L'approche protéomique permet d'obtenir une mesure simultanée d'un grand nombre de traits moléculaires (i.e. les spots) qui, après identification des protéines correspondantes, permettent d'apporter des informations sur les mécanismes d'effet des perturbations sur les organismes. Toutefois, jusqu'à présent, ces réponses protéomiques n'ont souvent été considérées que de manière isolée ; c'est à dire en ne regardant les réponses au stress que « protéine par protéine », perdant ainsi une partie de l'intérêt « intégrateur » de l'approche protéomique. Même si parfois, des approches descriptives multivariées (e.g. des analyses en composantes principales) ont été utilisées pour illustrer les différences globales de protéome entre différentes situations d'exposition (Jung 2009 ; Kieffer *et al.* 2009), l'information apportée par une batterie complète de spots n'a, à notre connaissance, pas encore été pleinement exploitée afin de créer une sorte de « système expert » permettant de poser un diagnostic écologique à partir des profils protéomiques obtenus sur un ensemble choisi d'espèces modèles. Le travail présenté dans ce chapitre montre que ce diagnostic, malgré un taux d'erreurs variable selon l'espèce modèle choisie, était fiable pour un cas de pression anthropique isolée. En nous basant sur l'expérience acquise avec les traits bio-écologiques (chapitre IV), nous pensons que l'approche présentée dans ce chapitre pourrait permettre de développer un système expert efficace et novateur d'aide au diagnostic écologique, applicable même en situation de pressions multiples.



**Chapitre IX: Synthèse et perspectives –
Conclusion & perspectives**

With the publication of the European Water Framework Directive (European Council 2000), the ecological evaluation of aquatic ecosystems has replaced the physico-chemical analyses as the main quality parameter in the regulatory assessment of water body quality at the European community scale. With this new order of things, many countries have had to change (or to create) their biomonitoring approaches (Böhmer *et al.* 2004b; Buffagni *et al.* 2004; Dahl & Johnson 2004; Ofenböck *et al.* 2004; Skoulikidis *et al.* 2004; Vlek *et al.* 2004; Gabriels *et al.* 2010). Because not WFD compliant, the former French macroinvertebrate index, the IBGN (AFNOR 2004), had also to be replaced. The French Ministry of environment initiated and supported the development of a new multimetric invertebrate index (I_2M_2) that should (i) be WFD-compliant and (ii) enhance the ecological quality assessment in comparison to the former methods.

Because, trait-based approaches have appeared as one of the most promising approaches in biomonitoring (Statzner & Bêche 2010; Culp *et al.* 2011) and ecological risk assessment (Rubach *et al.* 2011; Artigas *et al.* 2012), we have tried (i) to enhance French benthic invertebrate community-based bioassessment methods by including trait-based metrics in the evaluation of the ecological status of wadeable rivers, and (ii) to extend and promote the utilization of trait-based approaches in the biomonitoring of freshwaters.

Considering (i) that French national surveys already require the identification of macroinvertebrates and (ii) the availability of trait information for a large majority of European taxa, the “potential trait” approach could be more easily applied on existing biomonitoring surveys than the “realized trait” approach because it requires no supplementary cost. We have distinguished three biomonitoring areas in which potential traits could play a major role: (i) ecological quality assessment (chapter III), (ii) retrospective ecological risk assessment (chapter IV) and (iii) biodiversity loss analysis through functional homogenization (chapter V). In these three areas, we found that potential bio-ecological traits could significantly enhance the results of biomonitoring surveys.

In chapter III, we have demonstrated that trait-based metrics are good candidates for being included in a biomonitoring tool that quantifies the ecological quality of benthic communities and measures their responses to anthropogenic pressures, whatever the kind of pressure. Indeed, on

the 30 metrics that match the selection criteria (i.e. high discrimination efficiency to detect a large number of pressure categories, stability in near natural conditions and non redundancy), 21 were trait-based metrics (Table 3-I), thus supporting previous studies that have already highlighted the potential of traits to detect global anthropogenic impact (Dolédec *et al.* 1999; Usseglio-Polatera & Beisel 2002). On these 21 metrics, eleven are related to biological or physiological attributes and ten to ecological preferences of taxa. In previous studies examining the potential application of macroinvertebrate traits in biomonitoring, biological traits have been more often used than ecological traits (Charvet *et al.* 1998; Bady *et al.* 2005; Dolédec & Statzner 2008; Péru & Dolédec 2010). Taking into account our results (see also chapters IV and V), we have considered that ecological traits should receive the same attention than biological traits in biomonitoring studies.

Beyond their individual value as indicative metrics of anthropogenic impairment, these 21 metrics exhibited different levels of interest for potential integration in a multimetric index. Indeed, eleven trait-based metrics were only selected when a priori defined as the first metric of the combination (Table 3-II) and only five of them were selected in at least five metric combinations. These five metrics covered biological adaptations improving resistance (ovoviviparity), resilience (polyvoltinism) or both resistance and resilience abilities of taxa (relative richness of taxa from the biological group b: Usseglio-Polatera *et al.* 2000b) or their ecological tolerance to harsh environments (i.e. brackish and α -mesosaprobic waters). These metrics, not only exhibited high intrinsic value in biomonitoring, but also efficiently complement other metrics in the ecological diagnostic, including taxonomical metrics. Two of these five metrics are biological trait categories (ovoviviparity and polyvoltinism) that have been incorporated in the new French I₂M₂. The integration of these trait categories have thus contributed to enhance the large-scale (spatial and temporal) stability of this new multimetric index and its efficiency to identify important effect thresholds along pressure gradients (e.g. the good-moderate boundary; van den Brink *et al.* 2011).

It is also interesting to note that all the 30 potential multimetric indices built included at least one trait-based metric. Moreover, one combination (#25 in Table 3-II) was only composed of trait-based metrics, including the proportion of the community that is tolerant to brackish waters, the relative richness in (i) taxa considered as sensitive to pesticides (SPEAR_{pesticide}) and (ii) taxa

classified in biological group b (tolerant species, Usseglio-Polatera *et al.* 2000b). This specific multimetric index exhibited one of the highest stability levels among the 30 tested metric combinations and its discrimination efficiency was higher than 0.81. Such result suggests that a highly efficient and stable biomonitoring tool could be obtained using either only trait-based metrics or both trait-based metrics and taxonomical metrics.

The new I_2M_2 corresponds to the metric combination that best fulfils all the WFD requirements, since it integrates (i) type-specific stream reference conditions as well as (ii) diversity, (iii) sensitivity and (iv) informations on macroinvertebrate species. Moreover, the I_2M_2 significantly outclassed the former IBGN index when considering discrimination efficiency, and performed better than the European ICM index (Fig. 3-7).

Actually, the I_2M_2 provides a single score for a given reach at a given sampling date. However, some uncertainty exists around this score. This uncertainty is linked to a number of factors among which the “operator effect”, for example, could be of major importance as recently underlined by the IRSTEA (Archambault, comm. pers.). The quantification of this uncertainty and of its consequences on the corresponding quality class allocation will be performed in a follow-up study to enhance the quality of ecological assessment.

Evaluating the actual ecological quality of ecosystems is only the first step to successfully accomplish the WFD requirements, i.e. to reach and maintain a good ecological status. Indeed, identifying the cause(s) of adverse effects that already occurred – i.e. the main aim of retrospective ecological risk assessment (ERA; van den Brink *et al.* 2011) – is of the highest importance to help stream managers prioritizing their restoration options on a scientifically sound basis (Townsend *et al.* 2008).

Several authors (Dolédec *et al.* 1999; Statzner & Bêche 2010) have assumed that bio-ecological traits have the potential to identify different types of anthropogenic pressures that alter the macroinvertebrate habitat in different ways (e.g. by impairing water chemistry or physical characteristics of habitats). This assumption is based on the habitat templet theory that states that species life history strategies are forged against their habitat characteristics (Southwood 1977;

Southwood 1988; Townsend & Hildrew 1994). Archambault *et al.* (2010) had already demonstrated that trait-based approaches could discriminate different toxic quality classes of stream sediments and brought first evidences that the simultaneous consideration of multiple traits could be efficient and ecologically relevant to built a functional diagnostic tool.

We investigated the use of trait-based metrics to discriminate the effects of different categories of anthropogenic pressures (Chapter IV). We estimated the similarity of life history strategies exhibited by benthic communities and we found that, except for one couple of pressure categories (i.e. 'nitrates' and 'clogging risk'), the biological attributes and ecological strategies selected by macrobenthic communities in response to 16 different anthropogenic pressures were rather specific. This specificity indicates that species might be selected in a given community depending on their adaptations to specific features of their habitat, impaired or not by anthropogenic pressures, as hypothesized by the habitat templet theory (Southwood 1977; Southwood 1988; Townsend & Hildrew 1994). If different anthropogenic pressures induce different modifications in habitat features (e.g. different levels of oxygen or nutriment concentrations, flow speed modifications), then the observed specificity in bio-ecological attributes selected in communities would support the ability of trait-based approaches to disentangle the effects of different anthropogenic pressures (Statzner & Bêche 2010).

The observed similarity of the bio-ecological responses in communities subjected to 'nitrates' and 'clogging risk' was rather important ($r = 0.72$). This implies that disentangling the effects of such pressure categories would be quite complex in our data set. However, in the reaches from the French survey for which data were available, these two pressure categories constitute the most often observed pair of co-occurring pressures (Table 4-II). Thus, the observed similarity in invertebrate bio-ecological adaptations was probably more the result of a high co-occurrence of these pressures than of a similar impact of these two pressures on benthic communities. As a consequence, it seems possible to enhance the discrimination of these pressures using an extended data set which would integrate more data from reaches only subjected to one of these two pressure categories.

For 12 of the 16 investigated pressure categories, the bio-ecological responses of benthic communities to impairment were rather pressure-specific but also the built models (based on random forests) had demonstrated good efficiency (AUC > 0.70) in identifying reaches with significant levels of pressure (Table 4-III). Thus, the simultaneous consideration of a large number of bio-ecological features of benthic communities seem to constitute the core part of an ecologically sound and efficient functional diagnostic tool that has the potential to bring out some important informations to stream managers.

According to the WFD, the ecological quality of stream reaches has to be assessed not only by benthic macro-invertebrates but also by three other biological quality elements (BQEs), namely diatoms, macrophytes and fish (cf. Annex V in European Council 2000). A future promising direction should be to combine several biotraits of all these different BQEs, taking into account (i) the different sensitivity to individual pressure categories of each of these biotic groups (Feio *et al.* 2007; Marzin *et al.* 2012) and (ii) the different time scales with which such BQEs respond to - and recover from - anthropogenic pressures (see Hering *et al.* 2006b, and Table 1 in Culp *et al.* 2011). This important future research step may improve the performances and robustness of models identifying significantly acting pressures (Clews & Ormerod 2009) on biotic communities under multiple pressure scenarii. However, it will need first to collate existing ecological information varying in format, quality, trait description and coverage, which precludes the merging and comparison of different databases needed to further develop and validate multi-BQEs trait-based diagnostic tools.

The I₂M₂ and the diagnostic tool were designed from data collected on small- to medium-sized streams (i.e. where the multi-habitat sampling protocol for wadeable streams is working, AFNOR 2009). However, the ecological evaluation of large rivers (i.e. with a Strahler rank higher than six; Vannote *et al.* 1980) has also to be performed. An adaptation of the multi-habitat sampling protocol to large rivers has been applied in France since 2010 (MEDD 2009). The corresponding field sampling continuously feeds a data set on benthic macroinvertebrate assemblages which will allow soon statistical investigations to provide both an I₂M₂ and a diagnostic tool for large rivers. Large rivers are often located in highly populated areas, thus

finding natural reaches that could serve as reference reaches is a hard challenge (Schletterer *et al.* 2010). As a result, we might not be able to adopt the design applied to wadeable rivers and we could have to explore other approaches for deriving reference conditions, e.g. using: (i) historical data, (ii) data from other geographical areas with similar environmental characteristics (Nijboer *et al.* 2004) or (iii) modelling [e.g. based on ecological preferences of taxa, taking into account a set of environmental features that are not modified by human activities (e.g. altitude, biogeographic zone) or that can be estimated or predicted despite anthropogenic impairment (e.g. slope, bottom substrate mosaic, etc.); Nielsen *et al.* 2007]. We are confident that the trait-based approaches developed for wadeable streams will be also efficient, with some adjustments, in large rivers. Indeed, previous works have already demonstrated that the use of potential biotraits could enhance the ecological survey of such ecosystems (Dolédec *et al.* 1999; Usseglio-Polatera & Beisel 2002; Statzner *et al.* 2005 ; Dolédec & Statzner 2008).

The ultimate goal of biomonitoring is to prevent biodiversity loss due to anthropogenic impacts. Culp *et al.* (2011) stated that *“traits have the potential to be a more powerful and sensitive biomonitoring tool than taxonomic composition in all instances except programs aimed at conserving biodiversity”*. However, biodiversity is a concept that is often perceived in various ways by different persons. For example, the most important expression of biodiversity could be a “list of species” for a taxonomist and the “allelic diversity” for a geneticist (Noss 1990). A general definition of biodiversity then could be *“the sum total of all biotic variation from the level of genes to ecosystems”* (Purvis & Hector 2000). Although species diversity is one of the most studied aspect of biodiversity (Gaston 2000), it should be kept in mind that it is only one aspect of biodiversity. This is especially true when we consider the relationship between the loss of biodiversity and the loss of ecosystem functions (Chapin III *et al.* 2000; Loreau *et al.* 2001; Cardinale *et al.* 2006). Then, it is of major concern to elucidate how human impacts can induce biodiversity loss and subsequently how biodiversity loss alters ecosystem functioning. In this context, species traits could be not only useful in biodiversity studies but they can also represent one of the most powerful approaches to link anthropogenic pressures, biodiversity loss and ecosystem functioning alteration. Indeed, traits could provide mechanistic links between anthropogenic pressures and both the biological and taxonomical responses of taxa (chapters III, IV, VI and VII) and the functional consequences of community impairments (chapters VI and VII).

The potential of traits for underlining both the causes and the consequences of biodiversity loss explains the increasing attention paid to trait-based functional diversity (FD: Petchey & Gaston 2002; Mason *et al.* 2005; Mouchet *et al.* 2010) and functional homogenization (FH: Devictor *et al.* 2008; Clavel *et al.* 2010; Abadie *et al.* 2011).

Functional homogenization has recently be described as an important process observed in communities in response to anthropogenic pressures (Clavel *et al.* 2010). A convenient proxy for studying FH is the study of the patterns in specialization levels of organisms within communities (Clavel *et al.* 2010). We investigated if fuzzy-coded biotraits could be helpful to elucidate processes leading to biodiversity loss in response to anthropogenic pressures. More specifically, we tested the non-random effect that anthropogenic pressures are assumed to exert on organism depending on their specialization level (Futuyma & Moreno 1988; Smart *et al.* 2006; Devictor *et al.* 2008). Indeed, to our knowledge, the non-randomness of such anthropogenic effects has not yet been tested as such.

We demonstrated that the two studied anthropogenic pressures (i.e. acidification and organic contamination) do have non random effects on the specialization level of benthic communities for several biological and ecological traits. Moreover, this non random effect could explain, for some traits, a large amount of the total specialization variability observed in benthic macroinvertebrate communities. For example, organic contamination explained, in a non-random way, more than 70% of the specialization variability for the 'maximal potential size' and 'locomotion and substrate relationship' traits (Table 5-IV).

However, even if anthropogenic impairment of habitats generally induces a 'global' decline of specialists (Futuyma & Moreno 1988), this response pattern could be more precisely-described. First, in contrast to previous studies that only considered habitat requirements of species (Devictor & Robert 2009; Abadie *et al.* 2011), we studied both Grinnellian (\approx ecological) and Eltonian (\approx biological) traits. In contrast to Grinnellian traits (that respond to anthropogenic pressures through a decreasing level of community specialization), Eltonian traits do not give clear general response patterns, exhibiting both decreasing and increasing specialization levels depending on the studied trait.

Based on these results, we have considered that future studies should take into account a high number of traits, including both biological and ecological traits, to obtain a more complete picture of ecosystem functioning and its impairments under multiple anthropogenic pressures.

Second, we observed that the impact of human activities on community specialization depends on the way they are acting on organisms. Indeed, an important assumption of the specialization-disturbance hypothesis (i.e. that disturbances would induce functional homogenization) is that the effects of anthropogenic pressures should mainly be 'indirect' (e.g. by changing resource availability) while 'direct' effects (e.g. toxic effects) could violate this assumption and mask FH (Vázquez & Simberloff 2002). Our results have supported the idea that observed FH intensity results from a trade-off between the 'direct' and 'indirect' pressure effects on organisms with the stronger FH observed in reaches subjected to organic contamination that mainly modifies oxygen and food supply while acidification was linked to a less intense FH, probably because of its toxic effects on invertebrates.

Based on these results, we cannot fully support the hypothesis of a global trend of community generalization with increasing anthropogenic pressures. Thus, we appeal for more research on human induced functional homogenization and we suggest to better take into account the mechanisms with which pressures act on organisms, especially in rivers where a large panel of habitat impairments can occur (e.g. nutrient enrichment, toxic pollution and/or physical modifications; Table 2-III).

In our work, as well as in many other studies (Julliard *et al.* 2006; Devictor *et al.* 2008; Abadie *et al.* 2011), the decreasing importance of specialists in communities was considered as a proxy for FH (Clavel *et al.* 2010). However, for some traits, an increasing stress could also result in an increasing specialization level, at community scale. Indeed, in highly impaired habitats, specialist species could be preferentially selected (Attum *et al.* 2006; Clavero & Brotons 2010), the severe habitat impairment acting as a trait filter that allows only species well adapted to corresponding harsh environmental conditions (i.e. with a high specialization level for some traits) to survive (Statzner *et al.* 2004). In these conditions, a higher specialization level could also be associated with FH, because under similar pressures, communities tend to be more specialized, selecting a

common ecological strategy. To take into account both aspects of FH, i.e. increasing generalization or specialization, it would be interesting to directly measure trait similarity (e.g. using the Gower similarity index on fuzzy-coded trait profiles) among communities subjected to different types and levels of anthropogenic pressures.

We consider that biomonitoring would deeply benefit of a larger utilization of the “potential trait” approach (e.g. using fuzzy-coded biotraits, as applied in this work), because this approach allows stream managers to enhance ecological assessment without any supplementary cost in data acquisition. However, it is increasingly recognized that intra-specific trait variability, providing a large part of the total variability of “realized traits” (Blanck & Lamouroux 2007; Albert *et al.* 2010a; Jung *et al.* 2010), could improve the detection of community assembly rules (Jung *et al.* 2010). We investigated the potential of three methods to give information on realized biological traits: (i) stable isotopy for investigating invertebrate diet (Chapter VI), (ii) stoichiometry for investigating invertebrate development (Chapter VII) and (iii) proteomic to have an overview of the biological state of organisms (Chapter VIII).

Investigating the feeding habits of macroinvertebrates is a traditional topic in aquatic community ecology, especially through functional feeding groups (FFG: Merritt & Cummins 1996; Rawer-Jost *et al.* 2000). Indeed, the knowledge of such informations could be useful to investigate not only effects of anthropogenic pressures or stressors on (i) benthic communities but also on (ii) their functions (e.g. in organic matter fluxes) in ecosystems. The stable isotope analysis (SIA) approach is increasingly redefining the study of food webs (Peterson & Fry 1987; Peterson 1999; Bouillon *et al.* 2002; Ulseth & Hershey 2005; Li & Dudgeon 2008; Finlay *et al.* 2010) because stable isotopes potentially allow to trace the organic matter in food webs, from nutrients to predators. Linear mixing models (e.g. Phillips & Gregg 2001; Phillips & Gregg 2003) are generally used to estimate the diet of organisms from their own isotopic signatures and those of their potential food sources. However, the use of such models could provide biased results due to (i) the variability in the isotopic signatures of the sources and (ii) the variability in trophic discrimination (e.g. $\Delta^{13}\text{C}$ and $\Delta^{15}\text{N}$) (Codron *et al.* 2012; Galván, Sweeting & Polunin 2012). In chapter VI, we have proposed to use random forest-based models to predict the most probable diet of many invertebrates considering (i) the isotopic signatures of the organisms and of their potential food items, (ii) the

uncertainty associated with the trophic discrimination values and (iii) the food sources they are potentially able to use. These models exhibited, in average, a high level of efficiency (91.88 +/- 10.59% of good classification) allowing to identify the five major food sources (i.e. FPOM, perolithon, macrophytes, organic litter and animals; Table 6-III) from their isotopic signatures. This study thus has confirmed that SIA could provide a functional trait (isotopic trait) bringing out clear informations on the realized diet of benthic macroinvertebrates if (i) the variability in trophic discrimination was taken into account and (ii) the food sources potentially used by taxa do exhibit distinct isotopic signatures.

When potential food sources have similar isotopic signatures (e.g. *Leuctra* sp. model in *acid2*), the models can be improved by using (i) enriched isotope abundances (e.g. conditioning some food sources with much more higher ¹⁵N levels than those naturally found; Peterson 1999) or (ii) stable isotopes from other elements (e.g. sulfur or hydrogen: Peterson & Howarth 1987; McCutchan Jr et al. 2003 ; Finlay et al. 2010).

The application of these models to benthic communities from six study sites has demonstrated, in agreement with other papers (Friberg & Jacobsen 1994; Dangles 2002), the feeding plasticity of benthic macroinvertebrates and some diet shifts with ontogeny [e.g. *Limnius* sp. larvae and imagines (Fig. 6-3b) and *Gammarus* sp. from different size classes (Fig. 6-3e); see also Felten et al. 2008].

We also observed that diet plasticity can slightly limit food competition in least impaired conditions (Fig. 6-10). However, when the pressure intensity increases, the higher food specialization level of communities (Fig. 6-9) and the related lower diet plasticity (Fig. 6-7) could lead to a decreased ability to reduce the effects of competition. We have hypothesized that anthropogenic pressures could potentially, not only reinforce the abiotic filter, but also the biotic filter by limiting the ability of species to modulate competition in macroinvertebrate communities (Fig; 6-12). Then, benthic communities from impaired reaches should exhibit simplified food webs and would be characterized by: (i) lower taxonomic richness, (ii) higher potential specialization level, (iii) lower diet plasticity and (iv) lower competition intensity for food resources than in faunal assemblages from reference reaches (Fig. 6–12 and Table 6-VII). Our results have fully

validated the first three hypotheses assuming a food web structure of benthic communities more simple in reaches with high pressure level than in reference reaches. The last hypothesis has been confirmed in benthic communities from reaches subjected to organic contamination (*orga2*) but not in communities from reach subjected to strong acidification (*acid2*). However, the mismatch between expected and observed competition levels in *acid2* may be explained, in part, by the gross resolution used to define food categories (e.g. 'animals' correspond to a large range of animals with different sizes and locomotion habits) artificially inflating the observed level of competition.

It would be also interesting to investigate the effects of anthropogenic pressures on the simplification of benthic food webs using community-wide measures of trophic structure that can be calculated from stable isotope ratios (Layman *et al.* 2007). Based on the location of taxa on the stable isotope biplot (Fig. 6-3), these metrics would allow, to quantify the trophic diversity and redundancy of the benthic communities subjected to different water quality conditions.

Growth and development constitute two other key parameters of benthic macroinvertebrate life history (Arendt 1997). The study of these traits could bring out some insights on stream functioning (Imholt *et al.* 2010) and have long been performed using biometric approaches (Benke *et al.* 1999; Hury & Wallace 2000; Carlisle & Clements 2003). However, to obtain fair estimations, such approaches require an extensive data set gathered for a long-term study with repeated sampling events. Such studies are time consuming and would be difficult to apply in biomonitoring surveys. Recently, an emerging research topic, the “ecological stoichiometry” (Elser *et al.* 1996), focusing on the balance of several nutrients (e.g. C, N, P) among the different components of food webs, has produced an interesting theory: the “growth rate hypothesis”. This theory allows to mechanistically link the elemental composition (C : N : P) of organisms and their growth rate through the allocation of nutrients (e.g. phosphorous) to the different intra-cellular constituents (e.g. nucleic acids or ribosomes).

In chapter VII, we aimed at testing the potential of the stoichiometrical approach to investigate benthic macroinvertebrate development. We found that the nutrient ratio N : P is an efficient proxy for discriminating groups of taxa with contrasted potential development rates

(Fig. 7-5): the lower the N:P ratio is, the faster the development is. To our knowledge, this study is one of the very first testing the extension of the “growth rate hypothesis” (Elser *et al.* 1996; Main *et al.* 1997) to benthic macroinvertebrate development at the community scale. Based on our first results, the main driver of community stoichiometry variability seems to be the differential taxon composition, because among the benthic invertebrates examined, the deviation from homeostasis seems to be more an exception than the general rule (Fig. 7-7). These results indicate that, not only toxicological (e.g. sensitivity to aluminium) or physiological (e.g. tolerance to low oxygen concentrations) factors but also the stoichiometric requirements of taxa could influence the responses of faunal assemblages to human-induced habitat impairments (Singer & Battin 2007).

Previous studies have demonstrated that the realized growth of some invertebrate species could be linked to their stoichiometry (e.g. mayflies: Frost & Elser 2002; caddisflies: Veldboom & Roger 2011). In this work, we put in evidence the link existing between the elemental composition of organisms and their potential development rate. We also tested if the observed relationship between development and stoichiometry was still valid when considering the “realized” instead of “potential” development of taxa. To answer to this question, we have initiated a biometric analysis that has still to be completed. We should have also (i) to test the validity of the Growth Rate Hypothesis (GRH) in other anthropogenic pressure contexts and (ii) to identify other factors (e.g. lipid or protein concentrations in food) that can also limit growth and development in order to determine the application limits of the stoichiometric approach as a proxy of these biological traits.

Whereas, the potential bio-ecological trait approach is useful in retrospective ERA, i.e. giving information on the identity of pressures impairing benthic communities (Chapter V), the realized biological traits approach could bring out clear information in both prospective and retrospective ERA. For example, the “growth” and “development” traits could be used in retrospective ERA (Chapter VII) but also in prospective ERA; e.g. using growth inhibition tests which are designed to estimate the adverse effects of given toxicants on the growth of organisms (Pascoe *et al.* 2000).

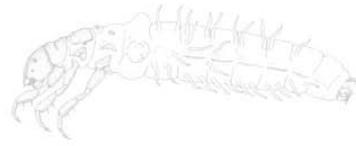
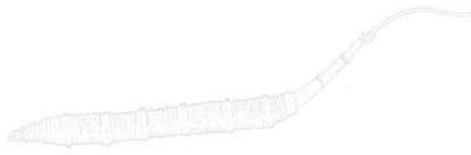
Biological traits (e.g. size, respiration mode or reproduction strategy) can be considered as the endpoints of many molecular and biochemical processes (van den Brink *et al.* 2011). Among these processes, the expression of the proteins could be of critical importance in the study of realized biological traits. Indeed, if the genetic structure of an organism reflects its biological potentialities, the expression of this genetic material in proteins reflects the realized part of these potentialities.

In chapter VIII, we applied the Differential In Gel Electrophoresis (DIGE), a proteomic approach, for studying the biological responses of two macroinvertebrate species (*Dinocras cephalotes* and *Odontocerum albicorne*) to an acidification gradient. We consider that the proteomic approach has a high potential in both prospective and retrospective ERA.

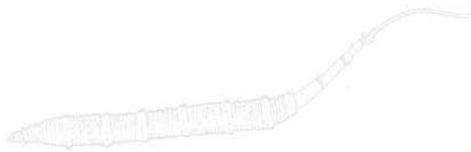
In prospective ERA, proteomic could provide, with a single experiment, a high number of potential biomarkers (Issaq *et al.* 2002). Using appropriate statistical methods (e.g. random forests), allows to measure the importance of all the candidate proteins in efficiently discriminating different exposure conditions (e.g. reference vs. impaired). We have found that two species with different tolerance levels to acidification (i.e. tolerant: *Odontocerum albicorne* and sensitive: *Dinocras cephalotes*) exhibited contrasted proportions of protein spots that significantly contributed to enhance the discrimination efficiency of different acidification levels (Figs. 8-8 and 8-9). Thus, it seems possible to use the DIGE approach for estimating the sensitivity of a species to toxicants. A possible way would be to measure the proportion of the whole expressed proteins that significantly contribute to the discrimination of the reference vs. impaired conditions. If compared to classical biomarker and bioassay approaches, the proteomic approach exhibits clear advantages. First, the proteomic approach does not focus on a limited and pre-defined set of biomarkers or bioassay sublethal endpoints. The global response of the organisms is analysed, thus providing a more valid interpretation of ecotoxicological effects of toxicants (Beliaeff & Burgeot 2002). The proteomic approach has highlighted proteins exhibiting a very significant response to acidification. These proteins were not classically used as biomarkers even if they could be linked to the mechanistic effects of the acid stress. Moreover, the high potential of the proteomic approach in prospective ERA could be even higher if the approach is applied not to a

single species but to a battery of organisms (Admiraal *et al.* 2000). The selection of tested organisms is certainly of great importance to facilitate the extrapolation of results to higher ecological levels such as the community or the related ecological functions. A promising approach, proposed by Ducrot *et al.* (2005), would be to classify species based on their bio-ecological traits (thus defining trait-based functional groups) and then to select one representative species in each functional group. However, this approach has some practical limitations. Indeed, in prospective ERA, tests are usually performed in laboratory and it could be potentially difficult to acclimate some of the selected species in laboratory conditions (especially for rheophilic species, such as the stonefly *D. cephalotes* used in our field study) Some trade-offs have probably to be found between community representativeness and practical issues (Ducrot 2005).

In retrospective ERA, *in situ* exposure of organisms (e.g. with caging) would allow to overcome the technical shortcomings of laboratory acclimatization mentioned above and would facilitate the composition of the battery proposed by Ducrot *et al.* (2005). An *in situ* utilization of the proteomic approach would provide, as in prospective ERA, (i) an idea of the intensity of the stress impairing species with the proposed sensitivity parameter (i.e. the proportion of spots contributive to the identification of exposure conditions) but also (ii) key information for identifying the nature of the stress. Finally, we have found that considering the complexity of the proteomic response of single species allowed to efficiently identify the exposure conditions of organisms (Tables 8-V and 8-VII). Thus, proteomic responses of a set of species could be considered as an efficient way to identify the nature of the stressors impairing a given benthic community and further studies on this topic should be encouraged.

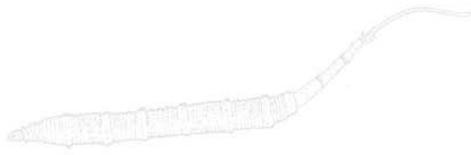


Liste des Abréviations

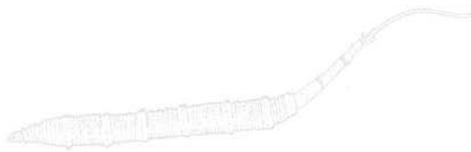


- (L)IRRs : (Least) Impaired River Reaches
- ACP / PCA : Analyse en Composantes Principales / Principal Components Analysis
- AFC / CA : Analyse Factorielle des Correspondances / Correspondence Analysis
- AK : Arginine Kinase
- ASPT : Average Score Per Taxon
- AUC : Area Under the (ROC) Curve
- BH : Biotic Homogenization
- CART : Classification And Regression Tree
- CIT : Conditional Inference Tree
- CSI : Community Specialization Index
- CTF : Conditional Tree Forest
- CV : Coefficient de Variation
- DBO5 / BDO5 : Demande Biologique en Oxygène sur 5 jours
- DCE / WFD : Directive Cadre sur l'Eau / Water Framework Directive
- DCO : Demande Chimique en Oxygène
- DE : Discrimination Efficiency
- DIGE : Differential In-Gel Electrophoresis
- EQB : Éléments de Qualité Biologique
- EQR : Ecological Quality Ratio
- ERA : Ecological Risk Assessment
- FCA : Fuzzy Correspondence Analysis
- FFG : Functional Feeding Group
- FH : Functional Homogenization
- FPOM : Fine Particulate Organic Matter
- GAM : Generalized Additive Models
- GH : Genetic Homogenization
- GRH : Growth Rate Hypothesis
- HD : Habitat Degradation
- HER : Hydro-ÉcoRégions
- I₂M₂ : Indice Invertébrés Multi-Métriques
- IBGN : Indice Biologique Global Normalisé
- ICM : InterCalibration Multimetric index
- IncErr : Increase in Error rate
- IP : Impairment Probability
- IR : Impairment Risk
- IRMS : Isotopic Ratio Mass Spectrometer
- MES : Matières En Suspension
- MS : Mass Spectrometer
- MS-MS : tandem Mass Spectrometer
- OOB : Out Of the Bag
- RCC : River Continuum Concept
- RCS : Réseau de Contrôle de Surveillance

- RF : Random Forest
- RHT : River Habitat Templet
- ROC : Receiver Operating Characteristic
- RSR : Réseau de Sites de Référence
- SIA : Stable Isotope Analysis
- SES : Standardized Effect Size
- TBA : Trait-Based Approach
- TDP : Taux de Développement Potentiel
- TEF : Trophic Enrichment Factor
- TH : Taxonomic Homogenization
- TNR : True Negative Rate
- TPR : True Positive Rate
- TSI : Taxon Specialization Index
- WQ : Water Quality



Liste des Figures



<i>Chapitre I: Introduction Générale</i>	1
Figure 1-1. Représentation schématique des niches écologiques potentielles et réalisées (Hutchinson 1957) de deux espèces (A et B) dans un espace défini par trois facteurs écologiques (x, y et z).....	4
Figure 1-2. Représentation schématique de la structuration des communautés sous l'action des filtres naturels (règles d'assemblage, en bleu) et avec l'ajout d'un filtre anthropique (règles de réponse, en orange). D'après Keddy (1992a) et Poff (1997).....	8
<i>Chapitre II: Matériel & méthodes</i>	21
Figure 2-1. Hydroécorégions de France métropolitaine et de Corse (d'après Wasson <i>et al.</i> 2002)	25
Figure 2-2. Qualification des 391 sites du réseau national de référence par HER de premier niveau (d'après Mengin <i>et al.</i> 2009).....	29
Figure 2-3. Classification des 1503 sites du réseau de contrôle et de surveillance en fonction du niveau d'anthropisation de leur bassin versant (vert : bon état ; jaune : état moyen ; orange : état médiocre ; blanc : pas de données).....	30
Figure 2-4. Localisation du Massif Vosgien (HER n°4) et des six sites d'études sélectionnés.....	36
Figure 2-5. Occupation des sols sur les bassins versants des cours d'eau au niveau des six sites d'études (données Corine Land Cover 2006). Les flèches bleues indiquent le sens d'écoulement des eaux.....	39
Figure 2-6. Site <i>ref1</i> (Photographie P. Wagner).....	40
Figure 2-7. Site <i>ref2</i> (Photographie P. Wagner).....	40
Figure 2-8. Site <i>acid1</i> (Photographie P. Wagner).....	40
Figure 2-9. Site <i>acid2</i> (Photographie P. Wagner).....	40
Figure 2-10. Site <i>orga1</i> (Photographie P. Wagner).....	40
Figure 2-11. Site <i>orga2</i> (Photographie P. Wagner).....	40

Figure 2-12. Premier plan factoriel de l'analyse en composantes principales réalisée sur la matrice physico-chimique (72 échantillons x 23 paramètres). a) Cercle des corrélations ; b) Position des échantillons et des sites d'études, la flèche grise indique le gradient d'acidification et la flèche noire indique le gradient de contamination organique. Les pourcentages de variance expliquée sont donnés sur chaque composante principale (PC1 et PC2).....43

Figure 2-13. Chroniques de la température de l'eau entre mai 2009 et avril 2010 sur les six sites d'études. La température est mesurée toute les quatre heures avec une sonde autonome (HOBO® Pendant Temperature logger, Onset). Les portions bleues des courbes correspondent aux valeurs de températures modélisées par des régressions GAM (voir le texte pour plus de détails) pour les sites et les périodes où les données étaient manquantes du fait de la perte des sondes autonomes.....45

Figure 2-14. Notes d'affinité relatives à l'utilisation potentielle de différentes sources de nourriture par (i) un Crustacé au régime alimentaire généraliste (*Gammarus sp.*) et (ii) un Trichoptère faisant l'objet d'un changement ontogénique de régime alimentaire (*Agrypnia sp.*)50

Figure 2-15. Modélisation de l'appartenance d'échantillons d'eau aux six sites d'étude (variable Y) à partir de leurs caractéristiques physico-chimiques (variables Xi) à l'aide d'un arbre d'inférence conditionnelle. Chaque nœud représente un critère de décision (une variable Xi) permettant de diviser un groupe « père » en deux groupes « fils ». La pertinence statistique (p-value) de ce critère de décision est indiqué dans le nœud et les valeurs de Xi permettant de classer les échantillons dans un groupe fils sont indiquées sur les branches. Les « nœuds » terminaux représentent la distribution des valeurs de la variable Y (sites de référence en blanc, sites acidifiés en gris clair et sites avec une contamination organique en gris foncé) dans les plus petits groupes fils qu'il a été possible de définir.....61

Chapitre III: Évaluation de la qualité écologique des cours d'eau Français..... 69

Figure 3-1. Flow diagram giving the main steps of the I₂M₂ development strategy. Literature references and sections from this manuscript precisely describing each step of the index development design were given into brackets.....76

Figure 3-2. Discrimination efficiency of normalized metric (DE_{SES}) decreasing (a) or increasing (b) with increasing anthropogenic pressure. Boxplots represent SES value distribution of metrics in least impaired river reaches (LIRRs, white box) and impaired river reaches (IRRs, grey box). The boxes range from the 25th percentile to the 75th percentile. The thick line represents the median and the whiskers extend to extremes values. Black dashed lines represent the 25th and 75th percentiles of SES distributions in LIRRs.....79

Figure 3-3. Ecological quality class boundaries (black dashed lines) and their respective 95% confidence interval (grey dotted lines). The boxplot represents the I_2M_2 score distribution in least impaired river reaches, ranging from the 25th to the 75th percentile of the distribution. The thick line represents the median. The whiskers extend to the extreme data points but no more than 1.5 times the interquartile range from this box. Black dots represent outliers.....85

Figure 3-4. Histograms of I_2M_2 score frequency distribution in the development (a) and in the test (b) data sets.....91

Figure 3-5. I_2M_2 score distributions in least impaired river reaches (white boxes) and impaired river reaches (grey boxes) for 10 different water quality pressure categories. Solid boxes represent the I_2M_2 score distribution in the development data set whereas stripped boxes represent the I_2M_2 score distribution in the test data set. Black dashed lines represent the 'low-moderate' pressure level boundary. 'n' represents the number of faunal samples considered in each group. For further details, see Fig. 3-3 legend.....92

Figure 3-6. I_2M_2 score distributions in least impaired river reaches (white boxes) and impaired river reaches (grey boxes) for 7 different habitat degradation pressure categories. For further details, see Fig. 3-3 & 3-5 legends.....93

Figure 3-7. Distribution of the 17 DEs of I_2M_2 , ICM_{Star} and IBGN. The boxes range from the 25th to the 75th percentile. The median is represented by the black thick line. The whiskers extend to the extreme data points. Different letters indicate significant differences in DE (multiple comparison test after Friedman test, Siegel & Castellan 1988).....94

Figure 3-8. Boxplot of I_2M_2 scores in relation to the pre-defined reach pressure levels concerning catchment anthropization. Black dashed lines represent ecological quality class boundaries. For further details, see Fig. 3-5 legend.....100

Chapitre IV :Évaluation des risques d'altération des cours d'eau Français..... 103

Fig. 4-1. Graphical output of the diagnostic tool applied to three reaches (a, b and c). Radial plots were built from impairment probabilities provided by the seven water quality (WQ) and the five habitat degradation (HD) conditional tree forest models exhibiting good efficiency ($AUC \geq 0.70$). Black dashed circle represent the lower value beyond which impairment probability is considered as significant (i.e. $IP = 0.5$).....121

Chapitre V: Pressions anthropiques et homogénéisation biologique..... 125

Figure 5-1. Ordination of water samples with two Principal Component Analyses (PCAs) performed on 20 water quality parameters for (i) the acidification gradient (a & b) and (ii) the organic contamination gradient (c & d). a & c) correlation circle giving the correlations of the 20 physico-chemical parameters with the two first principal components of each PCA (PC1 and PC2); b & d) first factorial plane of each PCA giving the location of the 40 water samples grouped by reach. Each reach was located at the weighted average (i.e. the centre of the star) of its corresponding samples. Explained variance was indicated for each of the two first principal components.....138

Figure 5-2. Modelling the observed community specialization (a, c, e) or deviation of community specialization from null expectations (b, d, f) along an acidification gradient for the Eltonian biotraits exhibiting significant and non-random relationship with the pressure gradient: (a, b) dispersal, (c, d) maximal potential size, (e, f) respiration techniques. Black solid lines and dotted lines correspond to predictions and 95% confidence intervals of generalized additive models (GAM), respectively. The percentage of explained deviance (Dev. expl.) and the p-value (p) were given in each case.....141

Figure 5-3. Modelling the observed community specialization along an acidification gradient for the Grinnellian biotraits exhibiting significant and non-random relationship with the pressure gradient: preferences in (a) altitude, (b) current velocity, (c) food, (d) pH, (e) substrate and (f) temperature. See text and the legend of Fig. 5-2 for further details.....141

Figure 5-4. Modelling the observed community specialization along an organic contamination gradient for the Eltonian biotraits exhibiting significant and non-random relationship with the pressure gradient: (a) aquatic stages, (b) dispersal, (c) feeding habits, (d) life cycle duration, (e) locomotion and substrate relationship, (f) maximal potential size, (g) potential number of cycles per year, (h) reproduction techniques, (i) resistance forms and (j) respiration techniques. See text and the legend of Fig. 5-2 for further details.....142

Figure 5-5. Modelling the observed community specialization along an organic contamination gradient for the Grinnellian biotraits exhibiting significant and non-random relationship with the pressure gradient: preferences in (a) altitude, (b) current velocity, (c) food, (d) longitudinal distribution, (e) pH, (f) salinity, (g) saprobity, (h) substrate, (i) temperature, (j) transversal distribution and (k) trophic status. See text and the legend of Fig. 5-2 for further details.....145

Chapitre VI: Estimation des régimes alimentaires réalisés des invertébrés benthiques : une approche isotopique..... 153

Figure 6-1. Schéma d'un spectromètre de masse IRMS et de son fonctionnement. Voir le texte pour plus de détails.....160

Figure 6-2. Préparation et analyse des échantillons pour analyse isotopique. a) Broyeur à billes (Retscher MM200), b) Balance de précision (Mettler Toledo MX5), c) microplaque 96 puits avec les nacelles en étain refermées, d) spectromètre de masse (IRMS: Finnigan Mat, Delta S) couplé à un analyseur élémentaire (Carlo Erba NA 1500NC).....164

Figure 6-3. Diagrammes isotopiques (plan $\delta^{13}\text{C} / \delta^{15}\text{N}$) pour chacun des sites d'études (a : *ref1*, b : *acid1*, c : *acid2*, d : *ref2*, e : *orga1* et f : *orga2*) lors de la campagne de mars 2011. La position moyenne des répliqués des échantillons de taxons (cercles noirs) et des autres types de nourriture (cercles verts) ainsi que leur degré de variation (barres grises : +/- 1écart-type) sont indiquées.....169

Figure 6-4. Prise en compte de la variabilité des valeurs d'enrichissement trophique (Δ) dans la procédure d'estimation du régime alimentaire probable d'un taxon. Illustration avec les valeurs de Δ données par Vander Zanden & Rasmussen 2001 (cf. tableau 6-IV) et trois scénarios possibles (bleu, rouge et vert) de paires de valeurs de $\Delta^{13}\text{C}$ et $\Delta^{15}\text{N}$170

- Figure 6-5. Comparaison de la composition faunistique des relevés de l'étude communautaire (points noirs), de l'étude isotopique (losanges verts) et de l'étude stœchiométrique (losanges bleus) sur le premier plan factoriel de l'AFC réalisée sur le tableau faunistique (162 taxons x 216 relevés). Les relevés de l'étude communautaire sont regroupés, toutes campagnes confondues, par site d'étude. Les « relevés » correspondant aux études isotopique et stœchiométriques sont projetés en tant qu'individus supplémentaires sur ce premier plan factoriel.....174
- Figure 6-6. Classification des types de nourriture d'après leurs signatures isotopiques ($\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$) pour les différents sites d'étude : a) *ref1*, b) *ref2*, c) *acid1*, d) *acid2* et e) *orga2*. Les dendrogrammes sont construits avec la méthode d'agrégation de Ward en utilisant les distances euclidiennes entre répliquats. Les cadres gris visualisent la position des types de nourriture « litière » et « matière organique fine ». MOF : matière organique fine, PER : périlithon, ALG : algues, BRY : bryophytes, HYD : hydrophytes et LIT : litière.....176
- Figure 6-7. Niveaux de différence (D) entre les régimes alimentaires observés et potentiels dans les différents sites d'études. La p-value associée à l'effet « Site » est indiquée à chaque nœud de l'arbre d'inférence conditionnelle, les distributions des valeurs de D dans les groupes de sites sont représentées sous la forme de boîtes (1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} quartiles) à moustaches (valeurs extrêmes non aberrantes), les valeurs aberrantes sont représentées par des cercles blancs, le nombre de régimes alimentaires reconstitués est indiqué en dessous des boîtes à moustaches.180
- Figure 6-8. Utilisation de deux types de nourriture (a : FPOM et b : périlithon) par les assemblages d'invertébrés benthiques en fonction du site d'étude où ils ont été échantillonnés (cf. légende de la figure 6-6 pour plus de détails).....182
- Figure 6-9. Niveaux observés de spécialisation alimentaire dans les différents sites d'études (cf. légende de la figure 6-6 pour plus de détails).....183
- Figure 6-10. Niveaux observés de compétition alimentaire (\bar{O}) en fonction des différents sites d'étude et du type de régime alimentaire utilisé (cf. légende de la figure 6-6 pour plus de détails).....184
- Figure 6-11. Relation proposée par Vannote *et al.* (1980) entre la taille des cours d'eau et les changements progressifs de structure et de caractéristiques fonctionnelles des communautés d'invertébrés benthiques. Voir le texte pour plus de détails.....188

Figure 6-12. Application du modèle conceptuel décrivant le rôle de la plasticité des traits dans les processus d'assemblages des communautés de Jung *et al.* 2010 à l'étude du rôle des pressions anthropiques dans la plasticité alimentaire des communautés benthiques. Les cercles noirs représentent les taxons et les barres verticales représentent l'étendue de la plasticité alimentaire des taxons. a) conditions de référence (plasticité alimentaire présente) b) conditions de pressions anthropiques (plasticité alimentaire réduite). Voir le texte pour plus de détails.....193

Chapitre VII : Une approche stœchiométrique du développement des invertébrés benthiques ..199

Figure 7-1. Trois stratégies de croissance et leurs conséquences au niveau de la répartition des bio-molécules et de la stœchiométrie (ratio N:P) dans les cellules. a) croissance lente, b) croissance modérée et c) croissance rapide (d'après Arrigo 2005).....205

Figure 7-2. Distribution des valeurs de ratio C : N (a), C : P (b) et N : P (c) des sources de nourriture non animales en fonction du type de nourriture et des sites d'étude La p-value associée à l'effet « Site » ou « Statut » est représentée à chaque nœud de l'arbre d'inférence conditionnelle. Les distributions des valeurs de C : N ; C : P et N : P dans les groupes de sites sont représentées sous la forme de boîtes (1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} quartiles) à moustaches (valeurs extrêmes non aberrantes), les valeurs aberrantes sont représentées par des cercles blancs. Le nombre d'échantillons dans chaque groupe de sites est indiqué en dessous des boîtes à moustaches.211

Figure 7-3. Caractérisation des quatre groupes de taxons avec des rythmes de développement différents : lent (DL), modéré (DM1 et DM2) et rapide (DR). Les positions des modalités des traits « durée du cycle de vie » (a) et « nombre de générations par an » (b) ainsi que la position des taxons appartenant aux groupes DL, DM1, DM2 et DR sont données sur le premier plan de l'analyse des correspondances sur codage flou (FCA) réalisée. Les pourcentages de variance expliquée par les deux premiers axes de l'analyse sont donnés en (a).....213

Figure 7-4. Répartition des taxons entre les quatre groupes de « taux de développement potentiel » en fonction des sites d'étude. La p-value associée à l'effet « Site » est représentée à chaque nœud de l'arbre d'inférence conditionnelle et le nombre d'individus (n) répartis entre les 4 groupes TDP (cf. Tableau 7-II) au niveau de chaque groupe de site est indiqué en dessous des graphiques en barres.....214

Figure 7-5. Répartition des taxons entre les quatre groupes de « taux de développement potentiel » en fonction de leurs ratio élémentaires (cf. légende de la figure 7-3 pour plus de détails).....215

Figure 7-6. Développement des invertébrés benthiques estimée par les traits stœchiométriques réalisés en fonction du site d'étude. a) Distribution des valeurs de ratio N : P en fonction du site d'étude (cf. la légende de la Figure 7-2 pour plus de détails). b) Probabilité moyenne d'appartenance (+ 1 écart-type) des invertébrés à chacun des groupes TDP en fonction du site d'étude.....216

Figure 7-7. Distribution, pour onze taxons présents sur au moins deux types de site, des valeurs du ratio N : P en fonction des catégories des sites d'étude considérées : a-d) référence (*ref*) vs. contamination organique (*orga*), e-j) référence vs. acidification (*acid*) et k) référence vs. contamination organique vs. acidification. Les distributions des valeurs de ratio N : P dans les groupes de sites sont représentées sous la forme de boîtes (1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} quartiles) à moustaches (valeurs extrêmes non aberrantes), les valeurs aberrantes sont représentées par des cercles blancs. Les astérisques représentent une déviation significative (test de Wilcoxon, $\alpha = 0.05$) des valeurs de N : P dans les sites soumis à pression par rapport aux sites de référence.218

Chapitre VIII: Évaluation de l'utilisation d'un trait moléculaire – le protéome – en bio-indication 229

Figure 8-1. Méthode d'électrophorèse bi-dimensionnelle DIGE permettant la comparaison d'échantillons ayant migré sur plusieurs gels d'électrophorèse au moyen des volumes normalisés des spots. Le principe est ici illustré pour deux gels. Les colorants fluorescents utilisés sont les cyanines Cy2, Cy3 et Cy5. Voir le texte pour plus de détails.....238

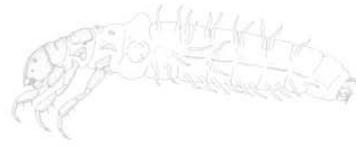
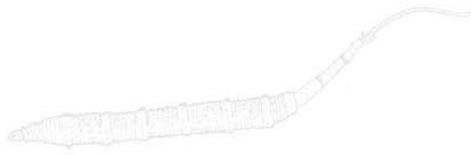
Figure 8-2. Schéma simplifié de fonctionnement d'un spectromètre de masse en tandem pendant une phase de scan complet et une phase de scans après fragmentation. Les différents composants du spectromètre de masse (boites rectangulaires) sont représentés avec un fond blanc lorsqu'ils sont actifs et un fond gris lorsqu'ils sont inactifs. Pour simplifier la représentation et la compréhension, seuls les ions de type b (et pas ceux de type y) sont représentés comme produits de la fragmentation. Voir texte pour plus de précision.....240

Figure 8-3. <i>Dinocras cephalotes</i> (Photographie L. Iversen, http://www.flickr.com/photos/liversen/4614160239/in/photostream).....	242
Figure 8-4. <i>Odontocerum albicorne</i> (Photographie © Biopix: JC Schou).....	243
Figure 8-5. Schéma des cages utilisées pour l'exposition in situ.....	244
Figure 8-6. Profils d'expressions protéomiques des individus de <i>Dinocras cephalotes</i> exposés sur les trois sites d'étude <i>ref1</i> , <i>acid1</i> et <i>acid2</i> . Premier plan factoriel d'une ACP réalisée sur les profils protéomiques (12 individus x 595 spots), les pourcentages de variance expliquée par chacune des composantes principales sont indiqués. a) Position des spots détectés en DIGE, b) position des individus (points noirs) et des sites d'exposition (étoiles).....	253
Figure 8-7. Profils d'expressions protéomiques des individus d' <i>Odontocerum albicorne</i> exposés sur les trois sites d'étude <i>ref1</i> , <i>acid1</i> et <i>acid2</i> . Premier plan factoriel d'une ACP réalisée sur les profils protéomiques (12 individus x 290 spots), les pourcentages de variance expliquée par chacune des composantes principales sont indiqués. a) Position des spots détectés en DIGE, b) position des individus (points noirs) et des sites d'exposition (étoiles).....	254
Figure 8-8. Importance des spots dans la forêt d'arbres de classification correspondant à l'espèce <i>Dinocras cephalotes</i> . La distribution des valeurs d'importance des spots au sein de chaque groupe est représentée par des boîtes (premier quartile, médiane, troisième quartile) à moustaches. Les cercles représentent les spots ayant des valeurs d'importance extrêmes par rapport à leur groupe. Le nombre de spots par groupe (n) est indiqué.....	256
Figure 8-9. Importance des spots dans la forêt d'arbres de classification correspondant à l'espèce <i>Odontocerum albicorne</i> . La distribution des valeurs d'importance des spots au sein de chaque groupe est représentée par des boîtes (premier quartile, médiane, troisième quartile) à moustaches. Les cercles représentent les spots ayant des valeurs d'importance extrêmes par rapport à leur groupe. Le nombre de spots par groupe (n) est indiqué.....	257
Figure 8-10. Spots sélectionnés pour identification en spectrométrie de masse en tandem. Les flèches indiquent les sens de migration au cours des deux étapes de séparation des protéines: en fonction de leur point isoélectrique (bleu) et en fonction de leur masse (vert). Les ellipses rouges, noires et vertes correspondent respectivement aux spots non analysés car non repérables, analysés mais sans identification validée et analysés avec une identification validée.	261

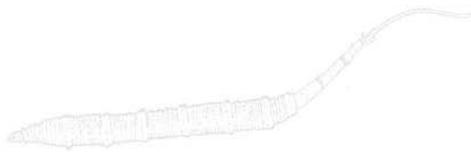
Figure 8-11. Évolution de l'expression des protéines (a : hexamérine et b : arginine kinase) le long du gradient d'acidification. Les sites d'exposition sont en abscisse et le volume normalisé des spots en ordonnée. La distribution des volumes normalisés des spots pour chaque site d'exposition est représentée par des boîtes (premier quartile, médiane, troisième quartile) à moustaches (minimum, maximum).....262

Figure 8-12. Évolution de l'expression des protéines (a : actine, b : troponine, c : paramyosine et d : myosine) le long du gradient d'acidification. Les sites d'exposition sont en abscisse et le volume normalisé des spots en ordonnée. La distribution des volumes normalisés des spots pour chaque site d'exposition est représentée par des boîtes (premier quartile, médiane, troisième quartile) à moustaches (minimum, maximum).....263

Figure 8-13. Cellules à chlorure de Plécoptère formant une structure de type coniforme. a : cuticule, b : partie basale de la structure, c : partie apicale de la structure et d : plaque poreuse de cuticule. (adapté de Komnick 1977).....269



Liste des Tableaux



<i>Chapitre I: Introduction Générale</i>	1
Tableau 1-I. Douze critères pour définir un outil de bio-évaluation idéal utilisant les macro-invertébrés benthiques (d'après Bonada <i>et al.</i> 2006).....	12
<i>Chapitre II: Matériel & méthodes</i>	21
Tableau 2-I: Systèmes typologiques proposés par la DCE.....	24
Tableau 2-II. Attribution des masses d'eau à une classe de taille d'après leur rang de Strahler (d'après MEDD 2005).....	26
Tableau 2-III. Liste des pressions relatives à la qualité de l'eau et à la qualité de l'habitat physique prises en compte.....	28
Tableau 2-IV. Substrats échantillonnés et protocole de prélèvements selon le protocole multi-habitats normalisé (d'après AFNOR 2009).....	33
Tableau 2-V. Niveau de détermination requis pour les différents grands groupes d'invertébrés benthiques d'après le protocole multi-habitats normalisé (d'après AFNOR 2010).....	34
Tableau 2-VI. Synthèse du nombre d'opérations de contrôle répertoriées dans la base de donnée nationale par réseau (RSR et RCS) et par année.....	35
Tableau 2-VII. Description générale des 6 stations sélectionnées. Les données de largeur correspondent aux valeurs moyennes de « largeur mouillée » mesurée sur chaque site d'étude	38
Tableau 2-VIII. Caractérisation physico-chimique des 6 stations sélectionnées. Les valeurs correspondent aux moyennes (+/- écart-type) sur l'ensemble des campagnes d'échantillonnage	42
Tableau 2-IX. Caractérisation thermique des six sites d'études pendant (i) les deux mois les plus froids (janvier et février) et (ii) les deux mois les plus chauds (juillet et août). μ : moyenne, sd : écart-type.....	46
Tableau 2-X. Chronologie des différentes études réalisées sur les six sites d'études vosgiens.....	47
Tableau 2-XI. Traits biologiques (11) et modalités correspondantes (63). Le niveau de codage employé pour chaque trait est indiqué entre crochets.....	53
Tableau 2-XII. Traits écologiques (11) et modalités correspondantes (55). Le niveau de codage employé pour chaque trait est indiqué entre crochets.....	56

Tableau 2-XIII. Bibliothèques du logiciel R utilisées pour réaliser les différents types d'analyse de données utilisés dans ce travail de thèse.....65

Chapitre III: Évaluation de la qualité écologique des cours d'eau Français.....69

Table 3-I. Métriques candidates à l'inclusion dans l'I₂M₂. Les (i) étiquettes complètes, (ii) codes, (iii & iv) nombres de catégories de pression (qualité de l'eau et dégradation de l'habitat) avec une réponse significative, (v) efficacité moyenne de discrimination (DE) et (vi) coefficient moyen de variation dans les tronçons de rivière à moindre impact (LIRRs) sont donnés. S = richesse taxonomique.....88

Table 3-II. Composition des métriques, efficacité de discrimination (DE), stabilité et robustesse des 30 combinaisons de métriques testées. Voir le tableau 3-I pour les étiquettes complètes des métriques.....89

Table 3-III. Schémas de réponse et efficacité de discrimination des métriques individuelles de l'I₂M₂, ICM_{Star} et IBGN. Voir § 3.4.1.5 pour une description complète des métriques de l'I₂M₂.....90

Chapitre IV :Évaluation des risques d'altération des cours d'eau Français.....103

Table 4-I. Codes et étiquettes complètes des catégories de pression de qualité de l'eau (10) et de dégradation de l'habitat (6) examinées dans cette étude.....110

Table 4-II. Coefficient Kappa de co-occurrence des catégories de pression (cellules blanches) et coefficient de corrélation de Pearson décrivant la relation d'importance des métriques basée sur les traits lorsque l'on compare des couples de modèles de forêt conditionnelle (cellules grises). Les valeurs nulles et négatives du coefficient Kappa de Cohen indiquent que la co-occurrence du couple de pressions était égale ou inférieure à l'attente aléatoire. Plus le coefficient Kappa est élevé, plus la co-occurrence de la pression est significative. Les catégories de pression et les modèles associés ont été identifiés par les codes donnés dans le tableau 4-I.114

Table 4-III. Caractéristiques et performances des 16 modèles dans les OOB (i.e. apprentissage) et les jeux de données de test. AUC: aire sous la courbe caractéristique de fonctionnement du récepteur, p: valeur p du test de permutation comparant les AUC calculés pour chaque modèle sur les OOB et les jeux de données de test. TPR: taux de positivité vraie, TNR: taux de négativité vraie. Chaque modèle est identifié par le code de la catégorie de pression étudiée (voir le tableau 4-I pour les étiquettes complètes des catégories de pression et le texte pour plus de détails).....116

<i>Chapitre V: Pressions anthropiques et homogénéisation biologique</i>	125
Table 5-I. Eltonian and Grinnellian traits used in this study (cf. Tables 2-XI and 2-XII for further details).....	133
Table 5-II. Taxon Specialization Index (TSI and TSI'): illustration of the index calculation with three taxa exhibiting contrasted trait profiles. See text for further details.....	134
Table 5-III. Characteristics of the generalized additive models (GAMs) built from observed community specialization levels (CSI').....	139
Table 5-IV. Characteristics of the generalized additive models built from deviations of the observed community specialization levels from null expectations (CSI' _{SES}).....	140
<i>Chapitre VI: Estimation des régimes alimentaires réalisés des invertébrés benthiques : une approche isotopique</i>	153
Tableau 6-I. Formes isotopiques stables du carbone, de l'oxygène et de l'azote et des molécules de dioxyde de carbone et de diazote.....	161
Tableau 6-II. Plan d'échantillonnage pour l'étude isotopique. Pour chaque taxon et chaque source de nourriture, le nombre d'échantillons prélevés par site est indiqué. Le nombre d'individus par échantillon est indiqué entre parenthèses.	162
Tableau 6-III. Définition des types de nourriture utilisés pour reconstituer les régimes alimentaires réalisés des taxons.....	163
Tableau 6-IV. Facteurs d'enrichissement trophique moyens (+/- un écart-type) pour les isotopes stables du carbone ($\Delta^{13}\text{C}$) et de l'azote ($\Delta^{15}\text{N}$) chez les invertébrés aquatiques.....	166
Tableau 6-V. Profils alimentaires potentiels et observés des 31 taxons pour lesquels un modèle de type RF a été construit. L'efficacité des modèles, les différences entre profils potentiels et observés (D) et les niveaux de spécialisation (TSI') sont donnés (moyenne +/- 1 écart-type)..	177
Tableau 6-VI Classement des sites par ordre croissant d'utilisation des cinq types de nourriture par les communautés benthiques. Résultats obtenus avec des analyses CIT (voir le texte pour plus de détails).....	181

Tableau 6-VII. Test du concept de renforcement du filtre biotique par les pressions anthropiques sur les cinq sites d'études considérés dans l'analyse isotopique. Les valeurs données (moyenne \pm écart-type) correspondent aux estimateurs de richesse (obtenue sur l'ensemble des douze campagnes mensuelles), de la spécialisation des taxons (TSI'), de la plasticité (D) et de la compétition (\bar{O}) pour le trait « sources de nourriture ».....195

Chapitre VII : Une approche stœchiométrique du développement des invertébrés benthiques ..199

Tableau 7-I. Plan d'échantillonnage pour l'étude stœchiométrique. Pour chaque taxon et chaque source de nourriture, le nombre d'échantillons prélevés par site est indiqué. Le nombre d'individus par échantillon est indiqué entre parenthèses pour les taxons.207

Tableau 7-II. Attribution des 124 individus utilisés pour l'analyse stœchiométrique aux 22 taxons et aux quatre groupes de développement potentiel (= groupes TDP).....214

Chapitre VIII: Évaluation de l'utilisation d'un trait moléculaire – le protéome – en bio-indication
 229

Tableau 8-I. Distribution et marquage des 24 échantillons (3 sites d'étude x 2 espèces x 4 réplicats) sur les 12 gels d'électrophorèse bi-dimensionnelle.....246

Tableau 8-II. Performances de la forêt d'arbres de classification réalisée à partir des volumes normalisés de 595 spots pour les douze individus de *Dinocras cephalotes* exposés à différentes conditions d'acidification. La matrice de confusion est créée à partir des individus « *out of the bag* ».....255

Tableau 8-III. Performances de la forêt d'arbres de classification réalisée à partir des volumes normalisés de 290 spots pour les douze individus d'*Odontocerum albicorne* exposés à différentes conditions d'acidification. La matrice de confusion est créée à partir des individus « *out of the bag* ».....257

Tableau 8-IV. Performances du modèle de classification Dinocras_RF2. La matrice de confusion est créée à partir des individus « *out of the bag* ».....258

Tableau 8-V. Performances du modèle de classification Dinocras_RF1. La matrice de confusion est créée à partir des individus « *out of the bag* ».....258

Tableau 8-VI. Performances du modèle de classification Odontocerum_RF2. La matrice de confusion est créée à partir des individus « *out of the bag* ».....259

Tableau 8-VII. Performances du modèle de classification Odontocerum_RF1. La matrice de confusion est créée à partir des individus « *out of the bag* ».....259

Tableau 8-VIII. Résultats de l'identification des protéines par spectrométrie de masse en tandem. Les identifications validées par les deux approches (MASCOT et BLAST) apparaissent en gras .
.....260

Liste des Annexes

Les différentes annexes sont fournies sous format électronique dans le CD fourni avec le manuscrit.

Annexe I : Typologie des cours d'eau français

Annexe II : Paramètres de la qualité de l'eau pris en compte dans la thèse

Annexe III : Paramètres d'occupation des sols et hydro-morphologiques pris en compte dans la thèse

Annexe IV : Protocole d'acquisition des données faunistiques sur le réseau de sites de référence (RSR)

Annexe V : Protocole d'échantillonnage et de traitement au laboratoire des prélèvements macroinvertébrés sur les sites du réseau de contrôle et surveillance (RCS) : Circulaire DCE 2007/22 à l'origine des normes XP T90-333 (AFNOR 2009) et XP T90-388 (AFNOR 2010)

Annexe VI : Base de traits bio-écologiques (325 taxons x 118 modalités) utilisée dans la thèse

Annexe VII : Mondy, C. P., Villeneuve, B., Archambault, V. & Usseglio-Polatera, P. (2012) A new macroinvertebrate-based multimetric index (I2M2) to evaluate ecological quality of French wadeable streams fulfilling the WFD demands: A taxonomical and trait approach. *Ecological Indicators*, **18**,452-467

Annexe VIII : Distribution des sites les moins impactés (LIRRs) et des autres sites (IRRs) parmi les 57 types de cours d'eau simplifié utilisés pour le développement de l'I₂M₂.

Annexe IX : Groupes et description des métriques biologiques et niveaux de calcul testés lors du développement de l'I₂M₂.

Annexe X : Valeurs de référence des cinq métriques constitutives de l'I₂M₂ dans les 57 types de cours d'eau simplifiés.

Annexe XI : Mondy C. P. & Usseglio-Polatera P. (2012) Using conditional tree forests and life history traits to assess specific risks of ecological impairment under multiple pressure scenarii. *Science of the Total Environment* (submitted).

Annexe XII : Liste des 216 métriques basées sur les traits utilisées pour le développement de l'outil diagnostic. Pour chaque métrique est renseigné son niveau de variabilité en conditions peu impactées (i.e. leur coefficient de variation dans les LIRRs) ainsi que leur importance (IncErr) dans les modèles correspondant à chacun des 16 types de pression étudiés.

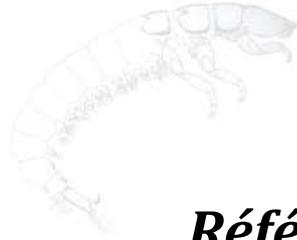
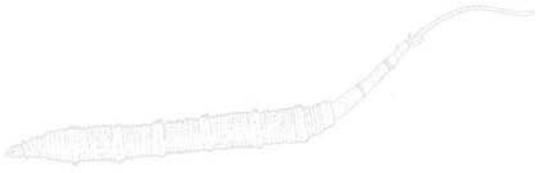
Annexe XIII : Mondy C. P. & Usseglio-Polatera P. (2012) Using fuzzy-coded biotraits to elucidate the non-random rôle of anthropogenic habitat alteration in functional homogenization. *Freshwater Biology* (submitted).

Annexe XIV : Invertébrés benthiques : métriques biologiques, conditions de référence, méthodes de bioindication, système-expert. Rapport d'activité au Ministère de l'Environnement (Novembre 2008)

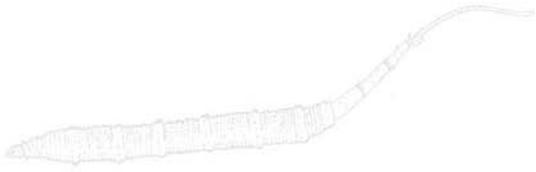
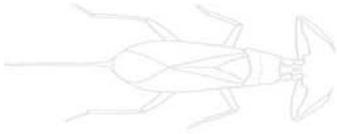
Annexe XV : Invertébrés benthiques : métriques biologiques, conditions de référence, méthodes de bioindication, système-expert. Rapport d'activité au Ministère de l'Environnement (Février 2010)

Annexe XVI : Invertébrés benthiques : métriques biologiques, conditions de référence, méthodes de bioindication, système-expert. Rapport d'activité au Ministère de l'Environnement (Février 2011)

Annexe XVII : Développement et optimisation de l'indice invertébrés multimétrique (I2M2) pour les cours d'eau. Rapport d'activité à l'Office National des Eaux et des Milieux Aquatiques (Décembre 2011)



Références bibliographiques



A

- Abadie, J. C., Machon, N., Muratet, A. & Porcher, E. (2011) Landscape disturbance causes small-scale functional homogenization, but limited taxonomic homogenization, in plant communities. *Journal of Ecology*, **99**, 1134-1142.
- Abe, H., Hirai, S. & Okada, S. (2007) Metabolic responses and arginine kinase expression under hypoxic stress of the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, **146**, 40 - 46.
- Acharya, K., Kyle, M. & Elser, J.J. (2004) Biological stoichiometry of *Daphnia* growth: An ecophysiological test of the growth rate hypothesis. *Limnology And Oceanography*, **49**, 656-665.
- Ackerly, D. D. & Cornwell, W.K. (2007) A trait-based approach to community assembly: Partitioning of species trait values into within- and among-community components. *Ecology Letters*, **10**, 135-145.
- Adams, T. S. & Sterner, R.W. (2000) The effect of dietary nitrogen content on trophic level ^{15}N enrichment. *Limnology and Oceanography*, **45**, 601-607.
- Admiraal, W., Barranguet, C., van Beusekom, S. A. M., Bleeker, E. A. J., van den Ende, F. P., van der Geest, H. G., Groenendijk, D., Ivorra, N., Kraak, M. H. S. & Stuijzand, S.C. (2000) Linking ecological and ecotoxicological techniques to support river rehabilitation. *Chemosphere*, **41**, 289-295.
- AFNOR (1992) *Détermination de l'Indice Biologique Global Normalisé (IBGN)*. AFNOR, Paris. NF T90-350. 9p.
- AFNOR (2004) *Qualité de l'eau - Détermination de l'indice biologique global normalisé (IBGN)*. AFNOR, Paris. NF T90-350. 15p.
- AFNOR (2009) *Qualité de l'eau - Prélèvement des macro-invertébrés aquatiques en rivières peu profondes*. AFNOR, Paris. XP T90-333. 22p.
- AFNOR (2010) *Qualité de l'eau - Traitement au laboratoire d'échantillons contenant des macro-invertébrés de cours d'eau*. AFNOR, Paris, France. XP T90-388. 21p.

- Albert, C. H., Thuiller, W., Yoccoz, N. G., Douzet, R., Aubert, S. & Lavorel, S. (2010a) A multi-trait approach reveals the structure and the relative importance of intra- vs. interspecific variability in plant traits. *Functional Ecology*, **24**, 1192-1201.
- Albert, C. H., Thuiller, W., Yoccoz, N. G., Soudant, A., Boucher, F., Saccone, P. & Lavorel, S. (2010b) Intraspecific functional variability: extent, structure and sources of variation. *Journal of Ecology*, **98**, 604-613.
- Allan, J. D. & Castillo, M.M. (2007) *Stream ecology: structure and function of running waters*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Alves, J., Caliman, A., Guariento, R., Figueiredo-Barros, M., Carneiro, L., Farjalla, V., Bozelli, R. & Esteves, F. (2010) Stoichiometry of benthic invertebrate nutrient recycling: Interspecific variation and the role of body mass. *Aquatic Ecology*, **44**, 421-430.
- Anderson, C. & Cabana, G. (2009) Anthropogenic alterations of lotic food web structure: Evidence from the use of nitrogen isotopes. *Oikos*, **118**, 1929-1939.
- Archambault, V. (2003) *Réponses bio-écologiques des macroinvertébrés benthiques aux perturbations : La base d'un outil diagnostique fonctionnel des écosystèmes d'eaux courantes*. PhD thesis, Université Paul Verlaine-Metz, France.
- Archambault, V., Usseglio-Polatera, P. & Vanden Bossche, J.P. (2005) Functional differences among benthic macroinvertebrate communities in reference streams of same order in a given biogeographic area. *Hydrobiologia*, **551**, 171-182.
- Archambault, V., Usseglio-Polatera, P., Garric, J., Wasson, J. G. & Babut, M. (2010) Assessing pollution of toxic sediment in streams using bio-ecological traits of benthic macroinvertebrates. *Freshwater Biology*, **55**, 1430-1446.
- Arendt, J. D. (1997) Adaptive intrinsic growth rates: An integration across taxa. *The Quarterly Review of Biology*, **72**, 149-177.
- Armitage, P., Moss, D., Wright, J. & Furse, M. (1983) The performance of a new biological water quality score system based on macroinvertebrates over a wide range of unpolluted running-water sites. *Water Research*, **17**, 333-347.
- Arrigo, K. R. (2005) Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature*, **437**, 349-355.
- Artigas, J., Arts, G., Babut, M., Caracciolo, A. B., Charles, S., Chaumot, A., Combourieu, B., Dahllöf, I., Despréaux, D., Ferrari, B., Friberg, N., Garric, J., Geffard, O., Gourlay-Francé, C., Hein, M., Hjorth, M., Krauss, M., Lange, H. J. D., Lahr, J., Lehtonen, K. K., Lettieri, T., Liess, M., Lofts, S.,

Mayer, P., Morin, S., Paschke, A., Svendsen, C., Usseglio-Polatera, P., van den Brink, N., Vindimian, E. & Williams, R. (2012) Towards a renewed research agenda in ecotoxicology. *Environmental Pollution*, **160**, 201-206.

Attrill, M. J. & Depledge, M.H. (1997) Community and population indicators of ecosystem health: Targeting links between levels of biological organisation. *Aquatic Toxicology*, **38**, 183-197.

Attum, O., Eason, P., Cobbs, G. & Baha El Din, S.M. (2006) Response of a desert lizard community to habitat degradation: Do ideas about habitat specialists/generalists hold? *Biological Conservation*, **133**, 52 – 62.

B

Back, J. A., Taylor, J. M., King, R. S., Fallert, K. L. & Hintzen, E.H. (2008) Ontogenic differences in mayfly stoichiometry influence growth rates in response to phosphorus enrichment. *Fundamental and Applied Limnology*, **171**, 233-240.

Bady, P., Dolédec, S., Fesl, C., Gayraud, S., Bacchi, M. & Schöll, F. (2005) Use of invertebrate traits for the biomonitoring of European large rivers: The effects of sampling effort on genus richness and functional diversity. *Freshwater Biology*, **50**, 159-173.

Baird, D. J. & van den Brink, P.J. (2007) Using biological traits to predict species sensitivity to toxic substances. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **67**, 296-301.

Barbour, M. T., Gerritsen, J., Snyder, B. & Stribling, J.B. (1999) *Rapid bioassessment protocols for use in streams and wadeable rivers: periphyton, benthic macroinvertebrates and fish*. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water; Washington, D.C.

Baudoin, J. M., Guérol, F., Felten, V., Chauvet, E., Wagner, P. & Rousselle, P. (2008) Elevated aluminium concentration in acidified headwater streams lowers aquatic hyphomycete diversity and impairs leaf-litter breakdown. *Microbial Ecology*, **56**, 260-269.

Bêche, L. A., McElravy, E. P. & Resh, V.H. (2006) Long-term seasonal variation in the biological traits of benthic-macroinvertebrates in two Mediterranean-climate streams in California, U.S.A. *Freshwater Biology*, **51**, 56-75.

Bêche, L. H. & Resh, V.H. (2007) Short-term climatic trends affect the temporal variability of macroinvertebrates in California 'Mediterranean' streams. *Freshwater Biology*, **52**, 2317-2339.

- Beintema, J. J., Stam, W. T., Hazes, B. & Smidt, M.P. (1994) Evolution of arthropod hemocyanins and insect storage proteins (hexamerins). *Molecular Biology and Evolution*, **11**, 493-503.
- Beketov, M. A. & Liess, M. (2008) An indicator for effects of organic toxicants on lotic invertebrate communities: Independence of confounding environmental factors over an extensive river continuum. *Environmental Pollution*, **156**, 980-987.
- Beketov, M. A., Foit, K., Schäfer, R. B., Schriever, C. A., Sacchi, A., Capri, E., Biggs, J., Wells, C. & Liess, M. (2009) SPEAR indicates pesticide effects in streams - Comparative use of species- and family-level biomonitoring data. *Environmental Pollution*, **157**, 1841-1848.
- Beliaeff, B. & Burgeot, T. (2002) Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **21**, 1316-1322.
- Benke, A. C., Huryn, A. D., Smock, L. A. & Wallace, J.B. (1999) Length-mass relationships for freshwater macroinvertebrates in North America with particular reference to the Southeastern United States. *Journal of The North American Benthological Society*, **18**, 308-343.
- Bennett, C., Owen, R., Birk, S., Buffagni, A., Erba, S., Mengin, N., Murray-Bligh, J., Ofenböck, G., Pardo, I., van de Bund, W., Wagner, F. & Wasson, J.G. (2011) Bringing European river quality into line: An exercise to intercalibrate macro-invertebrate classification methods. *Hydrobiologia*, **667**, 31-48.
- Berg, M. & Ellers, J. (2010) Trait plasticity in species interactions: A driving force of community dynamics. *Evolutionary Ecology*, **24**, 617-629.
- Bergfur, J., Johnson, R. K., Sandin, L. & Goedkoop, W. (2009) Effects of nutrient enrichment on C and N stable isotope ratios of invertebrates, fish and their food resources in boreal streams. *Hydrobiologia*, **628**, 67-79.
- Blanck, A. & Lamouroux, N. (2007) Large-scale intraspecific variation in life-history traits of European freshwater fish. *Journal of Biogeography*, **34**, 862-875.
- Blethen, S. L. & Kaplan, N.O. (1968) Characteristics of arthropod arginine kinases. *Biochemistry*, **7**, 2123-2135.
- Böhmer, J., Rawer-Jost, C. & Zenker, A. (2004a) Multimetric assessment of data provided by water managers from Germany: Assessment of several different types of stressors with macrozoobenthos communities. *Hydrobiologia*, **516**, 215-228.

- Böhmer, J., Rawer-Jost, C., Zenker, A., Meier, C., Feld, C. K., Biss, R. & Hering, D. (2004b) Assessing streams in Germany with benthic invertebrates: Development of a multimetric invertebrate based assessment system. *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters*, **34**, 416-432.
- Bolnick, D. I., Amarasekare, P., Araújo, M. S., Bürger, R., Levine, J. M., Novak, M., Rudolf, V. H. W., Schreiber, S. J., Urban, M. C. & Vasseur, D.A. (2011) Why intraspecific trait variation matters in community ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, **26**, 183 - 192.
- Bonada, N., Prat, N., Resh, V. H. & Statzner, B. (2006) Developments in aquatic insect biomonitoring: A comparative analysis of recent approaches. *Annual Review of Entomology*, **51**, 495-523.
- Bonada, N., Rieradevall, M. & Prat, N. (2007) Macroinvertebrate community structure and biological traits related to flow permanence in a Mediterranean river network. *Hydrobiologia*, **589**, 91-106.
- Bouillon, S., Koedam, N., Raman, A. & Dehairs, F. (2002) Primary producers sustaining macroinvertebrate communities in intertidal mangrove forests. *Oecologia*, **130**, 441-448.
- Bournaud, M., Richoux, P. & Usseglio-Polatera, P. (1992) An approach to the synthesis of qualitative ecological information from aquatic Coleoptera communities. *Regulated Rivers: Research & Management*, **7**, 165-180.
- Bowman, M. F., Chambers, P. A. & Schindler, D.W. (2005) Changes in stoichiometric constraints on epilithon and benthic macroinvertebrates in response to slight nutrient enrichment of mountain rivers. *Freshwater Biology*, **50**, 1836-1852.
- Brabec, K., Zahradkova, S., Nemejcova, D., Paril, P., Kokes, J. & Jarkovsky, J. (2004) Assessment of organic pollution effect considering differences between lotic and lentic stream habitats. *Hydrobiologia*, **516**, 331-346.
- Braukmann, U. (2001) Stream acidification in South Germany – Chemical and biological assessment methods and trends. *Aquatic Ecology*, **35**, 207-232.
- Breiman, L. (2001) Random Forests. *Machine Learning*, **45**, 5-32.
- Breiman, L., Friedman, J. H., Olshen, R. A. & Stone, C.J. (1984) *Classification and regression trees*. Wadsworth, California.
- Brett, M. & Müller-Navarra, D. (1997) The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic foodweb processes. *Freshwater Biology*, **38**, 483-499.

- Brown, A. E. & Grossman, S.H. (2004) The mechanism and modes of inhibition of arginine kinase from the cockroach (*Periplaneta americana*). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **57**, 166-177.
- Buffagni, A., Erba, S., Cazzola, M. & Kemp, J. (2004) The AQEM multimetric system for the southern Italian Apennines: Assessing the impact of water quality and habitat degradation on pool macroinvertebrates in Mediterranean rivers. *Hydrobiologia*, **516**, 313-329.
- Buffagni, A., Erba, S., Cazzola, M., Murray-Bligh, J., Soszka, H. & Genoni, P. (2006) The STAR common metrics approach to the WFD intercalibration process: Full application for small, lowland rivers in three European countries. *Hydrobiologia*, **566**, 379-399.
- Bunn, S. (1988) Processing of leaf litter in two Northern Jarrah forest streams, Western Australia: II. The role of macroinvertebrates and the influence of soluble polyphenols and inorganic sediment. *Hydrobiologia*, **162**, 211-223.
- Bureau, A., Dupuis, J., Falls, K., Lunetta, K. L., Hayward, B. H., Keith, T. P. & van Eerdewegh, P. (2005) Identifying SNPs predictive of phenotype using random forests. *Genetic Epidemiology*, **28**, 171-182.
- Burmester, T. (1999) Evolution and function of the insect hexamerins. *European Journal of Entomology*, **96**, 213-225.

C

- Caquet, T. (2006) Use of carbon and nitrogen stable isotope ratios to assess the effects of environmental contaminants on aquatic food webs. *Environmental Pollution*, **141**, 54-59.
- Cardinale, B. J., Srivastava, D. S., Emmett Duffy, J., Wright, J. P., Downing, A. L., Sankaran, M. & Jouseau, C. (2006) Effects of biodiversity on the functioning of trophic groups and ecosystems. *Nature*, **443**, 989-992.
- Cargill, A. S., Cummins, K. W., Hanson, B. J. & Lowry, R.R. (1985) The role of lipids as feeding stimulants for shredding aquatic insects. *Freshwater Biology*, **15**, 455-464.
- Carlisle, D. M. & Clements, W.H. (2003) Growth and secondary production of aquatic insects along a gradient of Zn contamination in Rocky Mountain streams. *Journal of the North American Benthological Society*, **22**, 582-597.

- Chandesris, A., Wasson, J. G., Pella, H., Sauquet, E. & Mengin, N. (2006) *Appui scientifique à la mise en œuvre de la Directive Européenne Cadre sur l'Eau. Typologie des cours d'eau de France métropolitaine*. Cemagref, Lyon. Technical report. 64p.
- Chapin III, F. S., Zavaleta, E. S., Eviner, V. T., Naylor, R. L., Vitousek, P. M., Reynolds, H. L., Hooper, D. U., Lavorel, S., Sala, O. E., Hobbie, S. E., Mack, M. C. & Diaz, S. (2000) Consequences of changing biodiversity. *Nature*, **405**, 234-242.
- Charvet, S., Kosmala, A. & Statzner, B. (1998) Biomonitoring through biological traits of benthic macroinvertebrates: Perspectives for a general tool in stream management. *Archiv für Hydrobiologie*, **142**, 415-432.
- Charvet, S., Statzner, B., Usseglio-Polatera, P. & Dumont, B. (2000) Traits of benthic macroinvertebrates in semi-natural French streams: An initial application to biomonitoring in Europe. *Freshwater Biology*, **43**, 277-296.
- Chase, J. M. & Leibold, M.A. (2003) *Ecological Niches: Linking classical and contemporary approaches*. The University of Chicago Press, Chicago.
- Chen, X. W. & Liu, M. (2005) Prediction of protein-protein interactions using random decision forest framework. *Bioinformatics*, **21**, 4394-4400.
- Chevenet, F., Dolédec, S. & Chessel, D. (1994) A fuzzy coding approach for the analysis of long-term ecological data. *Freshwater Biology*, **31**, 295-309.
- Clavel, J., Julliard, R. & Devictor, V. (2010) Worldwide decline of specialist species: Toward a global functional homogenization? *Frontiers in Ecology and the Environment*, **9**, 222-228.
- Clavero, M. & Brotons, L. (2010) Functional homogenization of bird communities along habitat gradients: Accounting for niche multidimensionality. *Global Ecology and Biogeography*, **19**, 684-696.
- Clews, E. & Ormerod, S.J. (2009) Improving bio-diagnostic monitoring using simple combinations of standard biotic indices. *River Research and Applications*, **25**, 348-361.
- Codron, D., Sponheimer, M., Codron, J., Newton, I., Lanham, J. & Clauss, M. (2012) The confounding effects of source isotopic heterogeneity on consumer-diet and tissue-tissue stable isotope relationships. *Oecologia*, **online**, 1-15.
- Cohen, J. (1960) A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement*, **20**, 37-46.

- Comte, L., Lek, S., de Deckere, E., de Zwart, D. & Gevrey, M. (2010) Assessment of stream biological responses under multiple-stress conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, **17**, 1469-1478.
- Crain, C. M., Kroeker, K. & Halpern, B.S. (2008) Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. *Ecology Letters*, **11**, 1304-1315.
- Cross, W. F., Benstead, J. P., Frost, P. C. & Thomas, S.A. (2005) Ecological stoichiometry in freshwater benthic systems: Recent progress and perspectives. *Freshwater Biology*, **50**, 1895-1912.
- Cross, W. F., Benstead, J. P., Rosemond, A. D. & Bruce Wallace, J. (2003) Consumer-resource stoichiometry in detritus-based streams. *Ecology Letters*, **6**, 721-732.
- Culp, J. M., Armanini, D. G., Dunbar, M. J., Orlofske, J. M., Poff, N. L., Pollard, A. I., Yates, A. G. & Hose, G.C. (2011) Incorporating traits in aquatic biomonitoring to enhance causal diagnosis and prediction. *Integrated Environmental Assessment and Management*, **7**, 187-197.
- Cummins, K. W. & Klug, M.J. (1979) Feeding Ecology of Stream Invertebrates. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **10**, 147-172.
- Cutler, D. R., Edwards, T. C., Beard, K. H., Cutler, A., Hess, K. T., Gibson, J. & Lawler, J.J. (2007) Random forests for classification in ecology. *Ecology*, **88**, 2783-2792.

D

- Dahl, J. & Johnson, R.K. (2004) A multimetric macroinvertebrate index for detecting organic pollution of streams in southern Sweden. *Archiv für Hydrobiologie*, **160**, 487-513.
- Dahl, J., Johnson, R. & Sandin, L. (2004) Detection of organic pollution of streams in southern Sweden using benthic macroinvertebrates. *Hydrobiologia*, **516**, 161-172.
- Dangles, O. (2002) Functional plasticity of benthic macroinvertebrates: Implications for trophic dynamics in acid streams. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **59**, 1563-1573.
- Dangles, O., Gessner, M. O., Guerold, F. & Chauvet, E. (2004) Impacts of stream acidification on litter breakdown: Implications for assessing ecosystem functioning. *Journal of Applied Ecology*, **41**, 365-378.

- de Pauw, N. & Vanhooren, G. (1983) Method for biological quality assessment of watercourses in Belgium. *Hydrobiologia*, **100**, 153-168.
- deBruyn, A. M. H. & Rasmussen, J.B. (2002) Quantifying assimilation of sewage-derived organic matter by riverine benthos. *Ecological Applications*, **12**, 511-520.
- Devictor, V. & Robert, A. (2009) Measuring community responses to large-scale disturbance in conservation biogeography. *Diversity and Distributions*, **15**, 122-130.
- Devictor, V., Clavel, J., Julliard, R., Lavergne, S., Mouillot, D., Thuiller, W., Venail, P., Villéger, S. & Mouquet, N. (2010) Defining and measuring ecological specialization. *Journal of Applied Ecology*, **47**, 15-25.
- Devictor, V., Julliard, R., Clavel, J., Jiguet, F., Lee, A. & Couvet, D. (2008) Functional biotic homogenization of bird communities in disturbed landscapes. *Global Ecology and Biogeography*, **17**, 252-261.
- Devin, S. & Beisel, J.N. (2007) Biological and ecological characteristics of invasive species: A gammarid study. *Biological Invasions*, **9**, 13-24.
- Devin, S., Bollache, L., Noël, P. Y. & Beisel, J.N. (2005) Patterns of biological invasions in French freshwater systems by non-indigenous macroinvertebrates. *Hydrobiologia*, **551**, 137-146.
- Doi, H., Kikuchi, E., Takagi, S. & Shikano, S. (2007a) Changes in carbon and nitrogen stable isotopes of chironomid larvae during growth, starvation and metamorphosis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **21**, 997-1002.
- Doi, H., Takagi, A. & Kikuchi, E. (2007b) Stream macroinvertebrate community affected by point-source metal pollution. *International Review of Hydrobiology*, **92**, 258-266.
- Dolédec, S. & Statzner, B. (2008) Invertebrate traits for the biomonitoring of large European rivers: An assessment of specific types of human impact. *Freshwater Biology*, **53**, 617-634.
- Dolédec, S., Philips, N., Scarsbrook, M., Riley, R. H. & Townsend, C.R. (2006) Comparison of structural and functional approaches to determining landuse effects on grassland stream invertebrate communities. *Journal of the North American Benthological Society*, **25**, 44-60.
- Dolédec, S., Statzner, B. & Bournaud, M. (1999) Species traits for future biomonitoring across ecoregions: Patterns along a human-impacted river. *Freshwater Biology*, **42**, 737-758.

Ducrot, V. (2005) *Compréhension et modélisation des relations entre les caractéristiques biologiques et écologiques et la sensibilité aux contaminants des communautés d'invertébrés benthiques : Perspectives pour l'évaluation des effets des substances chimiques*. PhD thesis, Université Paul Verlaine-Metz, France.

Ducrot, V., Usseglio-Polatera, P., Péry, A. R., Mouthon, J., Lafont, M., Roger, M. C., Garric, J. & Férard, J.F. (2005) Using aquatic macroinvertebrate species traits to build test batteries for sediment toxicity assessment: Accounting for the diversity of potential biological responses to toxicants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **24**, 2306-2315.

E

EC REFCOND Working Group (2001) *Guidance on the establishing reference conditions and ecological status class boundaries for inland surface waters*. 3rd draft.

Elser, J. J. & Urabe, J. (1999) The stoichiometry of consumer-driven nutrient recycling: Theory, observations, and consequences. *Ecology*, **80**, 735-751.

Elser, J. J., Acharya, K., Kyle, M., Cotner, J., Makino, W., Markow, T., Watts, T., Hobbie, S., Fagan, W., Schade, J., Hood, J. & Sterner, R.W. (2003) Growth rate-stoichiometry couplings in diverse biota. *Ecology Letters*, **6**, 936-943.

Elser, J. J., Dobberfuhl, D. R., MacKay, N. A. & Schampel, J.H. (1996) Organism size, life history, and N:P stoichiometry. *BioScience*, **46**, 674-684.

Elser, J. J., Schampel, J. H., Kyle, M., Watts, J., Carson, E. W., Dowling, T. E., Tang, C. & Roopnarine, P.D. (2005) Response of grazing snails to phosphorus enrichment of modern stromatolitic microbial communities. *Freshwater Biology*, **50**, 1826-1835.

Elser, J. J., Sterner, R. W., Gorokhova, E., Fagan, W. F., Markow, T. A., Cotner, J. B., Harrison, J. F., Hobbie, S. E., Odell, G. M. & Weider, L.W. (2000) Biological stoichiometry from genes to ecosystems. *Ecology Letters*, **3**, 540-550.

Elton, C. S. (1927) *Animal Ecology*. Sidgwick and Jackson, London.

Emery, N. C., Ewanchuk, P. J. & Bertness, M.D. (2001) Competition and salt-marsh plant zonation: Stress tolerators may be dominant competitors. *Ecology*, **82**, 2471-2485.

ESRI (2006) *ArcGis 9.2*. ESRI (Environmental Systems Research Institute), Redlands.

- European Commission (2003) *Common implementation strategy for the Water Framework Directive (2000/60/EC). Guidance document No. 10, rivers and lakes - typology, reference conditions and classification systems*. Office for official publications of the European Communities, Luxembourg. 94p.
- European Council (2000) *Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy*. Office for official publications of the European Communities, Brussels. 72p.
- Evans-White, M. A., Dodds, W. K., Huggins, D. G. & Baker, D.S. (2009) Thresholds in macroinvertebrate biodiversity and stoichiometry across water-quality gradients in Central Plains (USA) streams. *Journal of the North American Benthological Society*, **28**, 855-868.
- Evans-White, M. A., Stelzer, R. S. & Lamberti, G.A. (2005) Taxonomic and regional patterns in benthic macroinvertebrate elemental composition in streams. *Freshwater Biology*, **50**, 1786-1799.

F

- Favrel, C. (1998) *Ecophysiologie de la larve de Dinocras cephalotes (Plécoptère, Perlidé) exposée à un milieu acidifié (pH acide, faible minéralisation et forte concentration en aluminium)*. PhD thesis, Université Paul Verlaine - Metz, France.
- Fawcett, T. (2006) An introduction to ROC analysis. *Pattern Recognition Letters*, **27**, 861-874.
- Feio, M. J., Almeida, S. F. P., Craveiro, S. C. & Calado, A.J. (2007) Diatoms and macroinvertebrates provide consistent and complementary information on environmental quality. *Fundamental and Applied Limnology*, **169**, 247-258.
- Felten, V. & Guérol, F. (2006) Short-term physiological responses to a severe acid stress in three macroinvertebrate species: A comparative study. *Chemosphere*, **63**, 1427-1435.
- Felten, V., Tixier, G., Guérol, F., De Crespin De Billy, V. & Dangles, O. (2008) Quantification of diet variability in a stream amphipod: Implications for ecosystem functioning. *Archiv für Hydrobiologie*, **170**, 303-313.
- Finlay, J. C., Doucett, R. R. & McNeely, C. (2010) Tracing energy flow in stream food webs using stable isotopes of hydrogen. *Freshwater Biology*, **55**, 941-951.

- Fleeger, J. W., Carman, K. R. & Nisbet, R.M. (2003) Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment*, **317**, 207-233.
- Forbes, V. E., Palmqvist, A. & Bach, L. (2006) The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **25**, 272-280.
- Ford, H. A., Barrett, G. W., Saunders, D. A. & Recher, H.F. (2001) Why have birds in the woodlands of Southern Australia declined? *Biological Conservation*, **97**, 71 - 88.
- Friberg, N. & Jacobsen, D. (1994) Feeding plasticity of two detritivore-shredders. *Freshwater Biology*, **32**, 133-142.
- Friberg, N., Skriver, J., Larsen, S. E., Pedersen, M. L. & Buffagni, A. (2010) Stream macroinvertebrate occurrence along gradients in organic pollution and eutrophication. *Freshwater Biology*, **55**, 1405-1419.
- Fromm, P. (1980) A review of some physiological and toxicological responses of freshwater fish to acid stress. *Environmental Biology of Fishes*, **5**, 79-93.
- Frost, P. C. & Elser, J.J. (2002) Growth responses of littoral mayflies to the phosphorus content of their food. *Ecology Letters*, **5**, 232-240.
- Frost, P. C., Cross, W. F. & Benstead, J.P. (2005) Ecological stoichiometry in freshwater benthic ecosystems: An introduction. *Freshwater Biology*, **50**, 1781-1785.
- Frost, P. C., Stelzer, R. S., Lamberti, G. A. & Elser, J.J. (2002) Ecological stoichiometry of trophic interactions in the benthos: Understanding the role of C:N:P ratios in lentic and lotic habitats. *Journal of the North American Benthological Society*, **21**, 515-528.
- Fry, B. (1991) Stable isotope diagrams of freshwater food webs. *Ecology*, **72**, 2293-2297.
- Füreder, L., Welter, C. & Jackson, J.K. (2003) Dietary and stable isotope (δ^{13} , δ^{15} N) analyses in alpine stream insects. *International Review of Hydrobiology*, **88**, 314-331.
- Futuyma, D. J. & Moreno, G. (1988) The evolution of ecological specialization. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **19**, 207-233.

G

- Gabriels, W., Lock, K., de Pauw, N. & Goethals, P.L.M. (2010) Multimetric Macroinvertebrate Index Flanders (MMIF) for biological assessment of rivers and lakes in Flanders (Belgium). *Limnologia - Ecology and Management of Inland Waters*, **40**, 199-207.
- Galván, D., Sweeting, C. & Polunin, N. (2012) Methodological uncertainty in resource mixing models for generalist fishes. *Oecologia*, **169**, 1083-1093.
- Gaston, K. J. (2000) Global patterns in biodiversity. *Nature*, **405**, 220-227.
- Gause, G. F. (1934) *The Struggle for existence*. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Gayraud, S., Statzner, B., Bady, P., Haybach, A., Schöll, F., Usseglio-Polatera, P. & Bacchi, M. (2003) Invertebrate traits for the biomonitoring of large European rivers: An initial assessment of alternative metrics. *Freshwater Biology*, **48**, 2045-2064.
- Genkai-Kato, M., Nozaki, K., Mitsuhashi, H., Kohmatsu, Y., Miyasaka, H. & Nakanishi, M. (2000) Push-up response of stonefly larvae in low-oxygen conditions. *Ecological Research*, **15**, 175-179.
- Gerhardt, A. (2000) *Biomonitoring of polluted water*. Trans Tech Publications, Ltd, California.
- Gessner, M. O., Chauvet, E. & Dobson, M. (1999) A perspective on leaf litter breakdown in streams. *Oikos*, **85**, 377-384.
- Gotelli, N. J. & McCabe, D.J. (2002) Species co-occurrence: A meta-analysis of J. M. Diamond's assembly rules model. *Ecology*, **83**, 2091-2096.
- Grabowski, M., Bacela, K. & Konopacka, A. (2007) How to be an invasive gammarid (Amphipoda: Gammaroidea) – Comparison of life history traits. *Hydrobiologia*, **590**, 75-84.
- Greathouse, E. & Pringle, C. (2006) Does the river continuum concept apply on a tropical island? Longitudinal variation in a Puerto Rican stream. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **63**, 134-152.
- Grinnell, J. (1917) The niche-relationships of the California Trasher. *The Auk*, **34**, 427-433.
- Groom, A. P. & Hildrew, A.G. (1989) Food quality for detritivores in streams of contrasting pH. *Journal of Animal Ecology*, **58**, 863-881.

- Guérol, F., Boudot, J. P., Jacquemin, G., Vein, D., Merlet, D. & Rouiller, J. (2000) Macroinvertebrate community loss as a result of headwater stream acidification in the Vosges Mountains (N-E France). *Biodiversity and Conservation*, **9**, 767-783.
- Guérol, F., Giamberini, L., Tourmann, J. -, Pihan, J. -. & Kaufmann, R. (1995b) Occurrence of aluminium in chloride cells of *Perla marginata* (Plecoptera) after exposure to low pH and elevated aluminum concentration. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **54**, 620-625.
- Guérol, F., Vein, D., Jacquemin, G. & Pihan, J.C. (1995a) The macroinvertebrate communities of streams draining a small granitic catchment exposed to acidic precipitations (Vosges Mountains, northeastern France). *Hydrobiologia*, **300-301**, 141-148.

H

- Hagner-Holler, S., Pick, C., Girgenrath, S., Marden, J. H. & Burmester, T. (2007) Diversity of stonefly hexamerins and implication for the evolution of insect storage proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **37**, 1064 - 1074.
- Hahn, D. A. & Denlinger, D.L. (2007) Meeting the energetic demands of insect diapause: Nutrient storage and utilization. *Journal of Insect Physiology*, **53**, 760 - 773.
- Haq, F., Mahoney, M. & Koropatnick, J. (2003) Signaling events for metallothionein induction. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **533**, 211 - 226.
- Hart, E. & Lovvorn, J. (2002) Interpreting stable isotopes from macroinvertebrate foodwebs in saline wetlands. *Limnology and Oceanography*, **47**, 580-584.
- Hellawell, J. (1986) *Biological indicators of freshwater pollution and environmental management*. Elsevier Applied Science Publishers, New York.
- Hering, D., Feld, C., Moog, O. & Ofenböck, T. (2006a) Cook book for the development of a multimetric index for biological condition of aquatic ecosystems: Experiences from the European AQEM and STAR projects and related initiatives. *Hydrobiologia*, **566**, 311-324.
- Hering, D., Johnson, R. K. & Buffagni, A. (2006b) Linking organism groups - Major results and conclusions from the STAR project. *Hydrobiologia*, **566**, 109-113.

- Hering, D., Meier, C., Rawer-Jost, C., Feld, C. K., Biss, R., Zenker, A., Sundermann, A., Lohse, S. & Böhmer, J. (2004c) Assessing streams in Germany with benthic invertebrates: Selection of candidate metrics. *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters*, **34**, 398-415.
- Hering, D., Moog, O., Sandin, L. & Verdonshot, P.F.M. (2004a) Overview and application of the AQEM assessment system. *Hydrobiologia*, **516**, 1-20.
- Hering, D., Verdonshot, P. F. M., Moog, O. & Sandin, L. (2004b) Integrated assessment of running waters in Europe. *Hydrobiologia*, **516**, 1-379.
- Hothorn, T., Hornik, K. & Zeileis, A. (2006) Unbiased recursive partitioning: A conditional inference framework. *Journal of Computational & Graphical Statistics*, **15**, 651-674.
- Hu, Y., Wang, G., Chen, G. Y. J., Fu, X. & Yao, S.Q. (2003) Proteome analysis of *Saccharomyces cerevisiae* under metal stress by two-dimensional differential gel electrophoresis. *Electrophoresis*, **24**, 1458-1470.
- Hubbell, S. P. (2001) *The unified neutral theory of biodiversity and biogeography*. Princeton University Press, Princeton.
- Hurny, A. D. & Wallace, J.B. (2000) Life history and production of stream insects. *Annual Review of Entomology*, **45**, 83-110.
- Hutchinson, G. E. (1957) The multivariate niche. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, vol.XXII.
- Hyne, R. V. & Maher, W.A. (2003) Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **54**, 366-374.
- Hynes, H. B. N. (1976) Biology of Plecoptera. *Annual Review of Entomology*, **21**, 135-153.

I/J

- Illies, J. (1978) *Limnofauna Europaea*. Fischer Verlag, Stuttgart, Germany.
- Illies, J. & Botosaneanu, L. (1963) Problèmes et méthodes de la classification et de la zonation écologique des eaux courantes, considérées surtout du point de vue faunistique. *Mitteilungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, **12**, 1-57.

- Imholt, C., Gibbins, C. N., Malcolm, I. A., Langan, S. & Soulsby, C. (2010) Influence of riparian cover on stream temperatures and the growth of the mayfly *Baetis rhodani* in an upland stream. *Aquatic Ecology*, **44**, 669-678.
- Immel, F., Renaut, J. & Masfaraud, J.F. (2012) Physiological response and differential leaf proteome pattern in the European invasive Asteraceae *Solidago canadensis* colonizing a former cokery soil. *Journal of Proteomics*, **75**, 1129 - 1143.
- Issaq, H. J., Veenstra, T. D., Conrads, T. P. & Felschow, D. (2002) The SELDI-TOF MS approach to proteomics: Protein profiling and biomarker identification. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **292**, 587 – 592.
- Jardine, T. D., Curry, R. A., Heard, K. S. & Cunjak, R.A. (2005) High fidelity: Isotopic relationship between stream invertebrates and their gut contents. *Journal of the North American Benthological Society*, **24**, 290-299.
- Jiang, H., Li, F., Xie, Y., Huang, B., Zhang, J., Zhang, J., Zhang, C., Li, S. & Xiang, J. (2009) Comparative proteomic profiles of the hepatopancreas in *Fenneropenaeus chinensis* response to hypoxic stress. *Proteomics*, **9**, 3353-3367.
- Julliard, R., Clavel, J., Devictor, V., Jiguet, F. & Couvet, D. (2006) Spatial segregation of specialists and generalists in bird communities. *Ecology Letters*, **9**, 1237-1244.
- Jung, V. (2009) *Étude de la structuration des communautés végétales des prairies alluviales le long d'un gradient d'inondation*. PhD thesis, Université Paul Verlaine – Metz, France.
- Jung, V., Violle, C., Mondy, C., Hoffmann, L. & Muller, S. (2010) Intraspecific variability and trait-based community assembly. *Journal of Ecology*, **98**, 1134-1140.

K

- Kang, L., Shi, H., Liu, X., Zhang, C., Yao, Q., Wang, Y., Chang, C., Shi, J., Cao, J., Kong, J. & Chen, K. (2011) Arginine kinase is highly expressed in a resistant strain of silkworm (*Bombyx mori*, Lepidoptera): Implication of its role in resistance to *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **158**, 230 - 234.

- Kapoor, N. N. (1974) Some studies on the respiration of stonefly nymph, *Paragnetina media* (Walker). *Hydrobiologia*, **44**, 37-41.
- Karr, J. R. & Chu, E.W. (1997) Biological monitoring: Essential foundation for ecological risk assessment. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, **3**, 993 - 1004.
- Karr, J. R. & Dudley, D.R. (1981) Ecological perspective on water quality goals. *Environmental Management*, **5**, 55-68.
- Kattge, J., Díaz, S., Lavorel, S., Prentice, I. C., Leadley, P., Bönsch, G., Garnier, E., Westoby, M., Reich, P. B., Wright, I. J., Cornelissen, J. H. C., Violle, C., Harrison, S. P., Van Bodegom, P. M., Reichstein, M., Enquist, B. J., Soudzilovskaia, N. A., Ackerly, D. D., Anand, M., Atkin, O., Bahn, M., Baker, T. R., Baldocchi, D., Bekker, R., Blanco, C. C., Blonder, B., Bond, W. J., Bradstock, R., Bunker, D. E., Casanoves, F., Cavender-Bares, J., Chambers, J. Q., Chapin III, F. S., Chave, J., Coomes, D., Cornwell, W. K., Craine, J. M., Dobrin, B. H., Duarte, L., Durka, W., Elser, J., Esser, G., Estiarte, M., Fagan, W. F., Fang, J., Fernández-Méndez, F., Fidelis, A., Finegan, B., Flores, O., Ford, H., Frank, D., Freschet, G. T., Fyllas, N. M., Gallagher, R. V., Green, W. A., Gutierrez, A. G., Hickler, T., Higgins, S. I., Hodgson, J. G., Jalili, A., Jansen, S., Joly, C. A., Kerkhoff, A. J., Kirkup, D., Kitajima, K., Kleyer, M., Klotz, S., Knops, J. M. H., Kramer, K., Kühn, I., Kurokawa, H., Laughlin, D., Lee, T. D., Leishman, M., Lens, F., Lenz, T., Lewis, S. L., Lloyd, J., Llusià, J., Louault, F., Ma, S., Mahecha, M. D., Manning, P., Massad, T., Medlyn, B. E., Messier, J., Moles, A. T., Müller, S. C., Nadrowski, K., Naeem, S., Niinemets, Ü., Nöllert, S., Nüske, A., Ogaya, R., Oleksyn, J., Onipchenko, V. G., Onoda, Y., Ordoñez, J., Overbeck, G., Ozinga, W. A., Patiño, S., Paula, S., Pausas, J. G., Peñuelas, J., Phillips, O. L., Pillar, V., Poorter, H., Poorter, L., Poschlod, P., Prinzing, A., Proulx, R., Rammig, A., Reinsch, S., Reu, B., Sack, L., Salgado-Negret, B., Sardans, J., Shiodera, S., Shipley, B., Siefert, A., Sosinski, E., Soussana, J. -, Swaine, E., Swenson, N., Thompson, K., Thornton, P., Waldram, M., Weiher, E., White, M., White, S., Wright, S. J., Yguel, B., Zaehle, S., Zanne, A. E. & Wirth, C. (2011) TRY: a global database of plant traits. *Global Change Biology*, **17**, 2905-2935.
- Keddy, P. A. (1992a) Assembly and response rules: Two goals for predictive community ecology. *Journal of Vegetation Science*, **3**, 157-164.
- Keddy, P. A. (1992b) A pragmatic approach to functional ecology. *Functional Ecology*, **6**, 621-626.

- Keller, R. P., Kocev, D. & Džeroski, S. (2011) Trait-based risk assessment for invasive species: High performance across diverse taxonomic groups, geographic ranges and machine learning/statistical tools. *Diversity and Distributions*, **17**, 451-461.
- Kerans, B. L. & Karr, J.R. (1994) A Benthic Index of Biotic Integrity (B-IBI) for rivers of the Tennessee valley. *Ecological Applications*, **4**, 768-785.
- Kieffer, P., Schröder, P., Dommès, J., Hoffmann, L., Renaut, J. & Hausman, J.F. (2009) Proteomic and enzymatic response of poplar to cadmium stress. *Journal of Proteomics*, **72**, 379 - 396.
- Klein Breteler, W. C. M., Schogt, N., Baas, M., Schouten, S. & Kraay, G.W. (1999) Trophic upgrading of food quality by protozoans enhancing copepod growth: Role of essential lipids. *Marine Biology*, **135**, 191-198.
- Kolkwitz, R. & Marsson, M. (1902) Grundsätze für die biologische Beurtheilung des Wassers nach seiner Flora und Fauna. *Mitteilungen aus der Koniglichen Prüfungsanstalt für Wasser Abwasser*, **1**, 3-72.
- Kolkwitz, R. & Marsson, M. (1909) Okologie der tierischen Saprobien. *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie*, **2**, 126-152.
- Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B. & Buxton, H.T. (2002) Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environmental Science & Technology*, **36**, 1202-1211.
- Komnick, H. (1977) Chloride cells and chloride epithelia of aquatic insects. *International Review of Cytology*, **49**, 285 – 329.

L

- Larrañaga, A., Layer, K., Basaguren, A., Pozo, J. & Woodward, G. (2010) Consumer body composition and community structure in a stream is altered by pH. *Freshwater Biology*, **55**, 670-680.
- Layman, C. A., Arrington, D. A., Montaña, C. G. & Post, D. M. (2007) Can stable isotope ratios provide for community-wide measures of trophic structure? *Ecology*, **88**, 42-48.

- Lebart, L., Piron, M. & Morineau, A. (2006) *Statistique exploratoire multidimensionnelle*. Dunod, Paris.
- Lecerf, A. & Chauvet, E. (2008) Intraspecific variability in leaf traits strongly affects alder leaf decomposition in a stream. *Basic and Applied Ecology*, **9**, 598 - 605.
- Leroy, D., Haubruge, E., Pauw, E. D., Thomé, J. & Francis, F. (2010) Development of ecotoxicoproteomics on the freshwater amphipod *Gammarus pulex*: Identification of PCB biomarkers in glycolysis and glutamate pathways. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **73**, 343 - 352.
- Li, A. O. & Dudgeon, D. (2008) Food resources of shredders and other benthic macroinvertebrates in relation to shading conditions in tropical Hong Kong streams. *Freshwater Biology*, **53**, 2011-2025.
- Liebler, D. C. (2001) *Introduction to proteomics. Tools for the new biology*. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Liess, M. & Beketov, M. (2011) Traits and stress: Keys to identify community effects of low levels of toxicants in test systems. *Ecotoxicology*, **20**, 1328-1340.
- Liess, M. & von der Ohe, P.C. (2005) Analyzing effects of pesticides on invertebrate communities in streams. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **24**, 954-965.
- Lilley, K. S. & Friedman, D.B. (2004) All about DIGE: Quantification technology for differential-display 2D-gel proteomics. *Expert Review of Proteomics*, **1**, 401-409.
- Lockwood, J. L., Brooks, T. M. & McKinney, M.L. (2000) Taxonomic homogenization of the global avifauna. *Animal Conservation*, **3**, 27-35.
- Loreau, M., Naeem, S., Inchausti, P., Bengtsson, J., Grime, J. P., Hector, A., Hooper, D. U., Huston, M. A., Raffaelli, D., Schmid, B., Tilman, D. & Wardle, D.A. (2001) Biodiversity and ecosystem functioning: Current knowledge and future challenges. *Science*, **294**, 804-808.
- Lorenz, A., Hering, D., Feld, C. & Rolaufts, P. (2004) A new method for assessing the impact of hydromorphological degradation on the macroinvertebrate fauna of five German stream types. *Hydrobiologia*, **516**, 107-127.
- Lorenzen, C. J. (1967) Determination of chlorophyll and phaeo-pigments : Spectrophotometric equations. *Limnology and Oceanography*, **12**, 343-346.

- Lougheed, V. L., McIntosh, M. D., Parker, C. A. & Stevenson, R.J. (2008) Wetland degradation leads to homogenization of the biota at local and landscape scales. *Freshwater Biology*, **53**, 2402-2413.
- Lücke, J. D. & Johnson, R.K. (2009) Detection of ecological change in stream macroinvertebrate assemblages using single metric, multimetric or multivariate approaches. *Ecological Indicators*, **9**, 659-669.

M

- MacArthur, R. & Levins, R. (1967) The limiting similarity, convergence, and divergence of coexisting species. *The American Naturalist*, **101**, 377-385.
- Main, T. M., Dobberfuhl, D. R. & Elser, J.J. (1997) N : P stoichiometry and ontogeny of crustacean zooplankton: A test of the growth rate hypothesis. *Limnology and Oceanography*, **42**, 1474-1478.
- Martín-Díaz, M. L., Villena-Lincoln, A., Bamber, S., Blasco, J. & DelValls, T.Á. (2005) An integrated approach using bioaccumulation and biomarker measurements in female shore crab, *Carcinus maenas*. *Chemosphere*, **58**, 615 - 626.
- Marzin, A., Archambault, V., Belliard, J., Chauvin, C., Delmas, F. & Pont, D. (2012) Ecological assessment of running waters: Do macrophytes, macroinvertebrates, diatoms and fish show similar responses to human pressures? *Ecological Indicators*, **23**, 56 - 65.
- Mason, N. W. H., Mouillot, D., Lee, W. G. & Wilson, J.B. (2005) Functional richness, functional evenness and functional divergence: the primary components of functional diversity. *Oikos*, **111**, 112-118.
- Masson, N., Guérol, F. & Dangles, O. (2002) Use of blood parameters in fish to assess acidic stress and chloride pollution in French running waters. *Chemosphere*, **47**, 467 - 473.
- McCahon, C. P. & Pascoe, D. (1989) Short-term experimental acidification of a Welsh stream: Toxicity of different forms of aluminium at low pH to fish and invertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **18**, 233-242.
- McCutchan Jr, J. H., Lewis Jr, W. M., Kendall, C. & McGrath, C.C. (2003) Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen, and sulfur. *Oikos*, **102**, 378-390.

- McGill, B. J., Enquist, B. J., Weiher, E. & Westoby, M. (2006) Rebuilding community ecology from functional traits. *Trends in Ecology & Evolution*, **21**, 178-185.
- McKinney, M. L. & Lockwood, J.L. (1999) Biotic homogenization: A few winners replacing many losers in the next mass extinction. *Trends in Ecology & Evolution*, **14**, 450-453.
- MEDD (2004) *Circulaire DCE 2004/08 relative à la constitution et la mise en œuvre du réseau de sites de référence pour les eaux douces de surface (cours d'eau et plans d'eau) en application de la directive 2000/60/DCE du 23 octobre 2000 du Parlement et du Conseil établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau.* Ministère de l'Écologie et du Développement Durable, Paris. 41p.
- MEDD (2005) *Circulaire DCE 2005/11 relative à la typologie nationale des eaux de surface (cours d'eau, plans d'eau, eau de transition et eaux côtières) en application de la directive 2000/60/DCE du 23 octobre 2000 du Parlement et du Conseil établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau.* Ministère de l'Écologie et du Développement Durable, Paris. 18p.
- MEDD (2009) *Circulaire relative au protocole expérimental d'échantillonnage des « macro-invertébrés » en cours d'eau profond.* Ministère de l'Écologie et du Développement Durable, Paris. 19p.
- Mendes, R. S., Evangelista, L. R., Thomaz, S. M., Agostinho, A. A. & Gomes, L.C. (2008) A unified index to measure ecological diversity and species rarity. *Ecography*, **31**, 450-456.
- Menezes, S., Baird, D. J. & Soares, A.M.V.M. (2010) Beyond taxonomy: A review of macroinvertebrate trait-based community descriptors as tools for freshwater biomonitoring. *Journal of Applied Ecology*, **47**, 711-719.
- Mengin, N., Bougon, N., Chandesris, A., Oraison, F., Souchon, Y., Valette, L. & Villeneuve, B. (2009) *Réseau de référence des eaux douces de surface - Cours d'eau.* Cemagref, Lyon. 63p.
- Merritt, R. W. & Cummins, K.W. (1996) *An introduction to the aquatic insects of North America.* Kendall Hunt Pub Co, USA.
- Metcalf, J. L. (1989) Biological water quality assessment of running waters based on macroinvertebrate communities: History and present status in Europe. *Environmental Pollution*, **60**, 101-139.
- Michener, R. & Lajtha, K. (2007) *Stable isotopes in ecology and environmental science.* Blackwell Publishing Ltd, Oxford.

- Mihuc, T. B. (1997) The functional trophic role of lotic primary consumers: Generalist versus specialist strategies. *Freshwater Biology*, **37**, 455-462.
- Miner, B. G., Sultan, S. E., Morgan, S. G., Padilla, D. K. & Relyea, R.A. (2005) Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology & Evolution*, **20**, 685 - 692.
- Minguez, L., Buronfosse, T., Beisel, J. N. & Giambérini, L. (2012) Parasitism can be a confounding factor in assessing the response of zebra mussels to water contamination. *Environmental Pollution*, **162**, 234 - 240.
- Mondy, C. P., Villeneuve, B., Archaimbault, V. & Usseglio-Polatera, P. (2012) A new macroinvertebrate-based multimetric index (I2M2) to evaluate ecological quality of French wadeable streams fulfilling the WFD demands: A taxonomical and trait approach. *Ecological Indicators*, **18**, 452-467.
- Moore, J. C., Berlow, E. L., Coleman, D. C., de Ruiter, P. C., Dong, Q., Hastings, A., Johnson, N. C., McCann, K. S., Melville, K., Morin, P. J., Nadelhoffer, K., Rosemond, A. D., Post, D. M., Sabo, J. L., Scow, K. M., Vanni, M. J. & Wall, D.H. (2004) Detritus, trophic dynamics and biodiversity. *Ecology Letters*, **7**, 584-600.
- Morgan, D. O. & McMahon, B.R. (1982) Acid tolerance and effects of sublethal acid exposure on iono-regulation and acid-base status in two crayfish *Procambarus clarki* and *Orconectes rusticus*. *Journal of Experimental Biology*, **97**, 241-252.
- Mouchet, M. A., Villéger, S., Mason, N. W. H. & Mouillot, D. (2010) Functional diversity measures: An overview of their redundancy and their ability to discriminate community assembly rules. *Functional Ecology*, **24**, 867-876.
- Müller-Navarra, D. (1995) Biochemical versus mineral limitation in *Daphnia*. *Limnology and Oceanography*, **40**, 1209-1214.
- Munné, A. & Prat, N. (2009) Use of macroinvertebrate-based multimetric indices for water quality evaluation in Spanish Mediterranean rivers: An intercalibration approach with the IBMWP index. *Hydrobiologia*, **628**, 203-225.
- Murakami, M. & Nakano, S. (2001) Species-specific foraging behavior of birds in a riparian forest. *Ecological Research*, **16**, 913-923.

N/O

- Nesatyy, V. J. & Suter, M.J. (2007) Proteomics for the analysis of environmental stress responses in organisms. *Environmental Science & Technology*, **41**, 6891-6900.
- Newsholme, E. A., Beis, I., Leech, A. R. & Zammit, V.A. (1978) The role of creatine kinase and arginine kinase in muscle. *Biochemical Journal*, **172**, 533-537.
- Nielsen, S. E., Bayne, E. M., Schieck, J., Herbers, J. & Boutin, S. (2007) A new method to estimate species and biodiversity intactness using empirically derived reference conditions. *Biological Conservation*, **137**, 403 - 414.
- Niemi, G. J. & McDonald, M.E. (2004) Application of ecological indicators. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **35**, 89-111.
- Nijboer, R., Johnson, R., Verdonschot, P., Sommerhäuser, M. & Buffagni, A. (2004) Establishing reference conditions for European streams. *Hydrobiologia*, **516**, 91-105.
- Norris, R. H. & Thorns, M.C. (1999) What is river health? *Freshwater Biology*, **41**, 197-209.
- Noss, R. F. (1990) Indicators for monitoring biodiversity: A hierarchical approach. *Conservation Biology*, **4**, 355-364.
- Ofenböck, T., Moog, O., Gerritsen, J. & Barbour, M. (2004) A stressor specific multimetric approach for monitoring running waters in Austria using benthic macro-invertebrates. *Hydrobiologia*, **516**, 251-268.
- Olden, J. D. & Rooney, T.P. (2006) On defining and quantifying biotic homogenization. *Global Ecology and Biogeography*, **15**, 113-120.
- Olden, J. D., Poff, N. L., Douglas, M. R., Douglas, M. E. & Fausch, K.D. (2004) Ecological and evolutionary consequences of biotic homogenization. *Trends in Ecology & Evolution*, **19**, 18-24.
- Olsson, B., Bradley, B. P., Gilek, M., Reimer, O., Shepard, J. L. & Tedengren, M. (2004) Physiological and proteomic responses in *Mytilus edulis* exposed to PCBs and PAHs extracted from Baltic Sea sediments. *Hydrobiologia*, **514**, 15-27.
- Oudin, L. C. & Maupas, D. (2003) *Système d'évaluation de la qualité de l'eau des cours d'eau (Seq-Eau)*. Ministère de l'Écologie et du Développement Durable - Agences de l'Eau, Paris, France. Technical report. 106p.

P

- Pascoe, D., Wenzel, A., Janssen, C., Girling, A., Jüttner, I., Fliedner, A., Blockwell, S., Maund, S., Taylor, E., Diedrich, M., Persoone, G., Verhelst, P., Stephenson, R., Crossland, N., Mitchell, G., Pearson, N., Tattersfield, L., Lay, J. P., Peither, A., Neumeier, B. & Velletti, A. R. (2000) The development of toxicity tests for freshwater pollutants and their validation in stream and pond mesocosms. *Water Research*, **34**, 2323 - 2329.
- Pearce, J. & Ferrier, S. (2000) Evaluating the predictive performance of habitat models developed using logistic regression. *Ecological Modelling*, **133**, 225 - 245.
- Pearson, R. G. & Connolly, N.M. (2000) Nutrient enhancement, food quality and community dynamics in a tropical rainforest stream. *Freshwater Biology*, **43**, 31-42.
- Péru, N. & Dolédec, S. (2010) From compositional to functional biodiversity metrics in bioassessment: A case study using stream macroinvertebrate communities. *Ecological Indicators*, **10**, 1025 - 1036.
- Petchey, O. L. & Gaston, K.J. (2002) Extinction and the loss of functional diversity. *Proceedings of the royal society B: Biological sciences*, **269**, 1721-1727.
- Peterson, B. (1999) Stable isotopes as tracers of organic matter input and transfer in benthic food webs: A review. *Acta Oecologica*, **20**, 479-487.
- Peterson, B. J. & Fry, B. (1987) Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 293-320.
- Peterson, B. J. & Howarth, R.W. (1987) Sulfur, carbon and nitrogen isotopes used to trace organic matter flow in the salt-marsh estuaries of Sapelo Island, Georgia. *Limnology and Oceanography*, **32**, 1195-1213.
- Petrin, Z. (2011) Species traits predict assembly of mayfly and stonefly communities along pH gradients. *Oecologia*, **167**, 513-524.
- Philibert, A., Desprez-Loustau, M., Fabre, B., Frey, P., Halkett, F., Husson, C., Lung-Escarmant, B., Marçais, B., Robin, C., Vacher, C. & Makowski, D. (2011) Predicting invasion success of forest pathogenic fungi from species traits. *Journal of Applied Ecology*, **48**, 1381-1390.

- Phillips, D. L. & Gregg, J.W. (2001) Uncertainty in source partitioning using stable isotopes. *Oecologia*, **127**, 171-179.
- Phillips, D. L. & Gregg, J.W. (2003) Source partitioning using stable isotopes: Coping with too many sources. *Oecologia*, **136**, 261-269.
- Pianka, E. R. (1974) Niche overlap and diffuse competition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **71**, 2141-2145.
- Pinto, P., Rosado, J., Morais, M. & Antunes, I. (2004) Assessment methodology for southern siliceous basins in Portugal. *Hydrobiologia*, **516**, 191-214.
- Piscart, C., Moreteau, J. C. & Beisel, J.N. (2006a) Salinization consequences in running waters: Use of a sentinel substrate as a bioassessment method. *Journal of the North American Benthological Society*, **25**, 477-486.
- Piscart, C., Usseglio-Polatera, P., Moreteau, J. C. & Beisel, J.N. (2006b) The role of salinity in the selection of biological traits of freshwater invertebrates. *Archiv für Hydrobiologie*, **166**, 185-198.
- Poff, L. N., Olden, J. D., Vieira, N. K. M., Finn, D. S., Simmons, M. P. & Kondratieff, B.C. (2006) Functional trait niches of North American lotic insects: Traits-based ecological applications in light of phylogenetic relationships. *Journal of the North American Benthological Society*, **25**, 730-755.
- Poff, N. L. (1997) Landscape filters and species traits: Towards mechanistic understanding and prediction in stream ecology. *Journal of the North American Benthological Society*, **16**, 391-409.
- Pollard, A. I. & Yuan, L.L. (2010) Assessing the consistency of response metrics of the invertebrate benthos: a comparison of trait- and identity-based measures. *Freshwater Biology*, **55**, 1420-1429.
- Poquet, J., Alba-Tercedor, J., Punti, T., del Mar Sanchez-Montoya, M., Robles, S., Alvarez, M., Zamora-Munoz, C., Sainz-Cantero, C., Vidal-Abarca, M., Suarez, M., Toro, M., Pujante, A., Rieradevall, M. & Prat, N. (2009) The MEDiterranean Prediction And Classification System (MEDPACS): An implementation of the RIVPACS/AUSRIVAS predictive approach for assessing Mediterranean aquatic macroinvertebrate communities. *Hydrobiologia*, **623**, 153-171.
- Prasad, A., Iverson, L. & Liaw, A. (2006) Newer classification and regression tree techniques: Bagging and random forests for ecological prediction. *Ecosystems*, **9**, 181-199.

- Preston, B. L. & Shackelford, J. (2002) Multiple stressor effects on benthic biodiversity of Chesapeake Bay: Implications for ecological risk assessment. *Ecotoxicology*, **11**, 85-99.
- Purvis, A. & Hector, A. (2000) Getting the measure of biodiversity. *Nature*, **405**, 212-219.

Q/R

- Qian, H. & Ricklefs, R.E. (2006) The role of exotic species in homogenizing the North American flora. *Ecology Letters*, **9**, 1293-1298.
- R Development Core Team (2009) R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, <http://www.R-project.org/>
- Rahel, F. J. (2000) Homogenization of fish faunas across the United States. *Science*, **288**, 854-856.
- Rahel, F. J. (2002) Homogenization of freshwater faunas. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **33**, 291-315.
- Rawer-Jost, C., Böhmer, J., Blank, J. & Rahmann, H. (2000) Macroinvertebrate functional feeding group methods in ecological assessment. *Hydrobiologia*, **422-423**, 225-232.
- Resh, V. H. & Solem, J.O. (1996) *Phylogenetic relationships and evolutionary adaptations of aquatic insects*. In R. W. Merritt & K. W. Cummins (Eds.), *An introduction to the aquatic insects of North America*, pp. 98-107. Kendall Hunt Pub Co, USA.
- Resh, V. H., Hildrew, A. G., Statzner, B. & Townsend, C.R. (1994) Theoretical habitat templates, species traits, and species richness: A synthesis of long-term ecological research on the Upper Rhône River in the context of concurrently developed ecological theory. *Freshwater Biology*, **31**, 539-554.
- Reynoldson, T. B., Norris, R. H., Resh, V. H., Day, K. E. & Rosenberg, D.M. (1997) The reference condition: A comparison of multimetric and multivariate approaches to assess water-quality impairment using benthic macroinvertebrates. *Journal of the North American Benthological Society*, **16**, 833-852.
- Robin, X., Turck, N., Hainard, A., Tibert, N., Lisacek, F., Sanchez, J. C. & Müller, M. (2011) pROC: An open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics*, **12**, 77.

- Rooney, T. P., Wiegmann, S. M., Rogers, D. A. & Waller, D.M. (2004) Biotic impoverishment and homogenization in unfragmented forest understory communities. *Conservation Biology*, **18**, 787-798.
- Rosenberg, D. M. & Resh, V.H. (1993) *Introduction to freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates*. In: D. M. Rosenberg & V. H. Resh (Eds.), pp. 1-9, 'Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates', Chapman and Hall, New York.
- Rosi-Marshall, E. & Wallace, J. (2002) Invertebrate food webs along a stream resource gradient. *Freshwater Biology*, **47**, 129-141.
- Rowe, L., Berrill, M., Hollett, L. & Hall, R. (1989) The effects of short-term laboratory pH depressions on molting, mortality and major ion concentrations in the mayflies *Stenonema femoratum* and *Leptophlebia cupida*. *Hydrobiologia*, **184**, 89-97.
- Royer, T. V., Robinson, C. T. & Minshall, G.W. (2001) Development of macroinvertebrate-based index for bioassessment of Idaho rivers. *Environmental Management*, **27**, 627-636.
- Rubach, M. N., Ashauer, R., Buchwalter, D. B., De Lange, H., Hamer, M., Preuss, T. G., Töpke, K. & Maund, S.J. (2011) Framework for traits-based assessment in ecotoxicology. *Integrated Environmental Assessment and Management*, **7**, 172-186.

S

- Sandin, L., Dahl, J. & Johnson, R.K. (2004) Assessing acid stress in Swedish boreal and alpine streams using benthic macroinvertebrates. *Hydrobiologia*, **516**, 129-148.
- Sandin, R. & Johnson, L. (2000) The statistical power of selected indicator metrics using macroinvertebrates for assessing acidification and eutrophication of running waters. *Hydrobiologia*, **422/423**, 233-243.
- Sarriquet, P. E., Bordenave, P. & Marmonier, P. (2007) Effects of bottom sediment restoration on interstitial habitat characteristics and benthic macroinvertebrate assemblages in a headwater stream. *River Research and Applications*, **23**, 815-828.

- Schäfer, R. B., Kefford, B. J., Metzeling, L., Liess, M., Burgert, S., Marchant, R., Pettigrove, V., Goonan, P. & Nugegoda, D. (2011) A trait database of stream invertebrates for the ecological risk assessment of single and combined effects of salinity and pesticides in South-East Australia. *Science of the Total Environment*, **409**, 2055-2063.
- Schletterer, M., Füreder, L., Kuzovlev, V. V. & Beketov, M.A. (2010) Testing the coherence of several macroinvertebrate indices and environmental factors in a large lowland river system (Volga River, Russia). *Ecological Indicators*, **10**, 1083-1092.
- Shannon, C. E. (1948) A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal*, **27**, 379-423, 623-656.
- Shi, H., Paolucci, U., Vigneau-Callahan, K., Milbury, P., Matson, W. & Kristal, B. (2004) Development of biomarkers based on diet-dependent metabolic serotypes: Practical issues in development of expert system-based classification models in metabolomic studies. *Omics*, **8**, 197-208.
- Siegel, S. & Castellan, N.J.J. (1988) *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Singer, G. A. & Battin, T.J. (2007) Anthropogenic subsidies alter stream consumer-resource stoichiometry, biodiversity, and food chains. *Ecological Applications*, **17**, 376-389.
- Skoulikidis, N., Gritzalis, K., Kouvarda, T. & Buffagni, A. (2004) The development of an ecological quality assessment and classification system for Greek running waters based on benthic macroinvertebrates. *Hydrobiologia*, **516**, 149-160.
- Small, G. & Pringle, C. (2010) Deviation from strict homeostasis across multiple trophic levels in an invertebrate consumer assemblage exposed to high chronic phosphorus enrichment in a Neotropical stream. *Oecologia*, **162**, 581-590.
- Smart, S. M., Thompson, K., Marrs, R. H., Le Duc, M. G., Maskell, L. C. & Firbank, L.G. (2006) Biotic homogenization and changes in species diversity across human-modified ecosystems. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **273**, 2659-2665.
- Southwood, T. R. E. (1977) Habitat, the templet for ecological strategies? *Journal of Animal Ecology*, **46**, 336-365.
- Southwood, T. R. E. (1988) Tactics, strategies and templets. *Oikos*, **52**, 3-18.
- Spear, D. & Chown, S.L. (2008) Taxonomic homogenization in ungulates: Patterns and mechanisms at local and global scales. *Journal of Biogeography*, **35**, 1962-1975.

- Spijkerman, E. & Wacker, A. (2011) Interactions between P-limitation and different C conditions on the fatty acid composition of an extremophile microalga. *Extremophiles*, **15**, 597-609.
- Sroda, S. & Cossu-Leguille, C. (2011) Effects of sublethal copper exposure on two gammarid species: which is the best competitor? *Ecotoxicology*, **20**, 264-273.
- Statzner, B. & Bêche, L.A. (2010) Can biological invertebrate traits resolve effects of multiple stressors on running water ecosystems? *Freshwater Biology*, **55**, 80-119.
- Statzner, B., Bady, P., Dolédec, S. & Schöll, F. (2005) Invertebrate traits for the biomonitoring of large European rivers: An initial assessment of trait patterns in least impacted river reaches. *Freshwater Biology*, **50**, 2136-2161.
- Statzner, B., Bis, B., Dolédec, S. & Usseglio-Polatera, P. (2001) Perspectives for biomonitoring at large spatial scales: A unified measure for the functional composition of invertebrate communities in European running waters. *Basic and Applied Ecology*, **2**, 73-85.
- Statzner, B., Dolédec, S. & Hugueny, B. (2004) Biological trait composition of European stream invertebrate communities: Assessing the effects of various trait filter types. *Ecography*, **27**, 470-488.
- Statzner, B., Hoppenhaus, K., Arens, M. & Richoux, P. (1997) Reproductive traits, habitat use and templet theory: A synthesis of world-wide data on aquatic insects. *Freshwater Biology*, **38**, 109-135.
- Statzner, B., Resh, V. H. & Dolédec, S. (1994a) Ecology of the Upper Rhône River: A test of habitat templet theories. *Freshwater Biology*, **31**, 253-554.
- Statzner, B., Resh, V. H. & Roux, L.A. (1994b) The synthesis of long-term ecological research in the context of concurrently developed ecological theory: Design of a research strategy for the Upper Rhône River and its floodplain. *Freshwater Biology*, **31**, 253-263.
- Stelzer, R. S. & Lamberti, G.A. (2002) Ecological stoichiometry in running waters: Periphyton chemical composition and snail growth. *Ecology*, **83**, 1039-1051.
- Sterner, R. W. & Elser, J.J. (2002) *Ecological stoichiometry: the biology of elements from molecules to the biosphere*. Princeton University Press, New Jersey.
- Sterner, R. W. & Hessen, D.O. (1994) Algal nutrient limitation and the nutrition of aquatic herbivores. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **25**, 1-29.
- Stirling, G. & Wilsey, B. (2001) Empirical relationships between species richness, evenness, and proportional diversity. *The American Naturalist*, **158**, 286-299.

- Strahler, A. N. (1957) Quantitative analysis of watershed geomorphology. *Transactions of the American Geophysical Union*, **38**, 913-920.
- Strobl, C., Boulesteix, A. L., Zeileis, A. & Hothorn, T. (2007) Bias in random forest variable importance measures: Illustrations, sources and a solution. *BMC Bioinformatics*, **8**, 25.
- Sulzman, E. W. (2007) *Stable isotope chemistry and measurement: a primer*. In R. Mitchener & K. Lajtha (Eds.), *Stable isotopes in ecology and environmental science*, pp. 29-49. Blackwell Publishing Ltd, Oxford.

T

- Tachet, H., Richoux, P., Bournaud, M. & Usseglio-Polatera, P. (2010) *Invertébrés d'eau douce – Systématique, biologie, écologie*. CNRS éditions, Paris.
- Telfer, W. H. & Kunkel, J.G. (1991) The function and evolution of insect storage hexamers. *Annual Review of Entomology*, **36**, 205-228.
- Terwilliger, N. B. (1999) Hemolymph proteins and molting in Crustaceans and Insects. *American Zoologist*, **39**, 589-599.
- Thorne, R. & Williams, P. (1997) The response of benthic macroinvertebrates to pollution in developing countries: A multimetric system of bioassessment. *Freshwater Biology*, **37**, 671-686.
- Tibbets, T. M., Wheelless, L. A. & Rio, C.M.D. (2008) Isotopic enrichment without change in diet: An ontogenetic shift in ¹⁵N during insect metamorphosis. *Functional Ecology*, **22**, 109-113.
- Tixier, G. & Guérol, F. (2005) Plecoptera response to acidification in several headwater streams in the Vosges Mountains (northeastern France). *Biodiversity and Conservation*, **14**, 1525-1539.
- Tomanova, S., Tedesco, P., Campero, M., Van Damme, P., Moya, N. & Oberdorff, T. (2007) Longitudinal and altitudinal changes of macroinvertebrate functional feeding groups in neotropical streams: A test of the River Continuum Concept. *Archiv für Hydrobiologie*, **170**, 233-241.
- Townsend, C. R. (1989) The patch dynamics concept of stream community ecology. *Journal of the North American Benthological Society*, **8**, 36-50.
- Townsend, C. R. & Hildrew, A.G. (1994) Species traits in relation to a habitat templet for river systems. *Freshwater Biology*, **31**, 265-275.

- Townsend, C. R., Hildrew, A. G. & Francis, J. (1983) Community structure in some southern English streams: The influence of physicochemical factors. *Freshwater Biology*, **13**, 521-544.
- Townsend, C. R., Uhlmann, S. S. & Matthaei, C.D. (2008) Individual and combined responses of stream ecosystems to multiple stressors. *Journal of Applied Ecology*, **45**, 1810-1819.
- Townsend, C., Dolédec, S. & Scarsbrook, M. (1997) Species traits in relation to temporal and spatial heterogeneity in streams: A test of habitat templet theory. *Freshwater Biology*, **37**, 367-387.

U

- Ulrich, W. & Gotelli, N.J. (2010) Null model analysis of species associations using abundance data. *Ecology*, **91**, 3384-3397.
- Ulseth, A. J. & Hershey, A.E. (2005) Natural abundances of stable isotopes trace anthropogenic N and C in an urban stream. *Journal of the North American Benthological Society*, **24**, 270-289.
- Usseglio-Polatera, P. (1992) Graphical expression of the ecological significance of a faunistic assemblage and its application to the study of the Rhône river Trichoptera at Lyon (France). In: *7th International Symposium on Trichoptera*, Umeå, Sweden. 301-307.
- Usseglio-Polatera, P. (1994) Theoretical habitat templates, species traits, and species richness: Aquatic insects in the Upper Rhône River and its floodplain. *Freshwater Biology*, **31**, 417-437.
- Usseglio-Polatera, P. (1997) Long-term changes in the Ephemeroptera of the river Rhone at Lyon, France, assessed using a fuzzy coding approach. In: *Ephemeroptera & Plecoptera: Biology, Ecology, Systematics (Proc. 8th Int. Conf. Ephemeroptera, 1995)*, Lausanne, Swiss. 227-234.
- Usseglio-Polatera, P. & Beisel, J.N. (2002) Longitudinal changes in macroinvertebrate assemblages in the Meuse River: Anthropogenic effects versus natural change. *River Research and Applications*, **18**, 197-211.
- Usseglio-Polatera, P. & Wasson, J.G. (2005) *Protocole de prélèvement des Invertébrés sur les sites de référence*. Ministère de l'Écologie et du Développement Durable, Paris, France. Technical report. 8p.

- Usseglio-Polatera, P., Bournaud, M., Richoux, P. & Tachet, H. (2000a) Biomonitoring through biological traits of benthic macroinvertebrates: How to use species trait databases? *Hydrobiologia*, **422-423**, 153-162.
- Usseglio-Polatera, P., Bournaud, M., Richoux, P. & Tachet, H. (2000b) Biological and ecological traits of benthic freshwater macroinvertebrates: Relationships and definition of groups with similar traits. *Freshwater Biology*, **43**, 175-205.
- Usseglio-Polatera, P., Richoux, P., Bournaud, M. & Tachet, H. (2001) A functional classification of benthic macroinvertebrates based on biological and ecological traits: Application to river condition assessment and stream management. *Archiv für Hydrobiologie*, **Suppl. 139**, 53-83.

V

- van den Brink, P. J., Alexander, A. C., Desrosiers, M., Goedkoop, W., Goethals, P. L., Liess, M. & Dyer, S.D. (2011) Traits-based approaches in bioassessment and ecological risk assessment: Strengths, weaknesses, opportunities and threats. *Integrated Environmental Assessment and Management*, **7**, 198-208.
- Vander Zanden, M. J. & Rasmussen, J.B. (2001) Variation in ^{15}N and ^{13}C trophic fractionation: Implications for aquatic food web studies. *Limnology and Oceanography*, **46**, 2061-2066.
- Vandewalle, M., de Bello, F., Berg, M., Bolger, T., Dolédec, S., Dubs, F., Feld, C., Harrington, R., Harrison, P., Lavorel, S., da Silva, P., Moretti, M., Niemelä, J., Santos, P., Sattler, T., Sousa, J., Sykes, M., Vanbergen, A. & Woodcock, B. (2010) Functional traits as indicators of biodiversity response to land use changes across ecosystems and organisms. *Biodiversity and Conservation*, **19**, 2921-2947.
- Vannote, R. L., Minshall, G. W., Cummins, K. W., Sedell, J. R. & Cushing, C.E. (1980) The River Continuum Concept. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **37**, 130-137.
- Vázquez, D. P. & Simberloff, D. (2002) Ecological specialization and susceptibility to disturbance: Conjectures and refutations. *The American Naturalist*, **159**, 606-623.
- Veldboom, J. & Haro, R. (2011) Stoichiometric relationship between suspension-feeding caddisfly (Trichoptera: Brachycentridae) and seston. *Hydrobiologia*, **675**, 129-141.

- Verberk, W. C. E. P., Siepel, H. & Esselink, H. (2008) Life-history strategies in freshwater macroinvertebrates. *Freshwater Biology*, **53**, 1722-1738.
- Verdonschot, P. F. M. (2000) Integrated ecological assessment methods as a basis for sustainable catchment management. *Hydrobiologia*, **422/423**, 389-412.
- Verneaux, J., Galmiche, P., Janier, F. & Monnot, A. (1982) Une nouvelle méthode pratique d'évaluation de la qualité des eaux courantes. Un indice biologique de qualité générale: l'IBG. *Annales Scientifiques de l'Université de Franche-Comté, Biologie Animale*, **4**, 19.
- Vieira, N. K. M., Poff, N. L., Carlisle, D. M., Moulton II, S. R., Koski, M. L. & Kondratieff, B.C. (2006) A database of lotic invertebrate traits for North America. U.S. Department of the Interior, Reston.
- Violle, C., Enquist, B. J., McGill, B. J., Jiang, L., Albert, C. H., Hulshof, C., Jung, V. & Messier, J. (2012) The return of the variance: Intraspecific variability in community ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, **27**, 244 - 252.
- Vlek, H. E., Verdonschot, P. F. M. & Nijboer, R.C. (2004) Towards a multimetric index for the assessment of Dutch streams using benthic macroinvertebrates. *Hydrobiologia*, **516**, 173-189.
- von der Ohe, P. C. & Liess, M. (2004) Relative sensitivity distribution of aquatic invertebrates to organic and metal compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23**, 150-156.

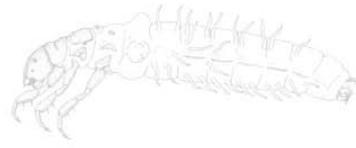
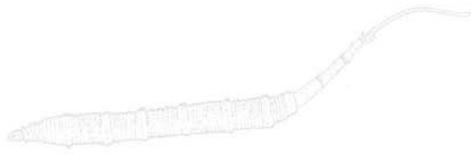
W

- Wallace, J. B. & Webster, J.R. (1996) The role of macroinvertebrates in stream ecosystem function. *Annual Review of Entomology*, **41**, 115-139.
- Wallace, J. B., Eggert, S. L., Meyer, J. L. & Webster, J.R. (1999) Effects of resource limitation on a detrital-based ecosystem. *Ecological Monographs*, **69**, 409-442.
- Wang, J., Wei, Y., Wang, D., Chan, L. & Dai, J. (2008) Proteomic study of the effects of complex environmental stresses in the livers of goldfish (*Carassius auratus*) that inhabit Gaobeidian Lake in Beijing, China. *Ecotoxicology*, **17**, 213-220.
- Wasson, J. G., Chandesris, A., Pella, H. & Blanc, L. (2002) *Les hydro-écorégions de France métropolitaine : Approche régionale de la typologie des eaux courantes et éléments pour la définition des peuplements de référence d'invertébrés*. Cemagref, Lyon. Technical report. 190p.

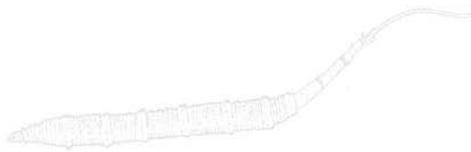
- Webster, J. R., Benfield, E. F., Ehrman, T. P., Schaeffer, M. A., Tank, J. L., Hutchens, J. J. & D'Angelo, D.J. (1999) What happens to allochthonous material that falls into streams? A synthesis of new and published information from Coweeta. *Freshwater Biology*, **41**, 687-705.
- Webster, J. R., Newbold, J. D., Thomas, S. A., Valett, H. M. & Mulholland, P.J. (2009) Nutrient uptake and mineralization during leaf decay in streams - a model simulation. *International Review of Hydrobiology*, **94**, 372-390.
- Weider, L. J., Elser, J. J., Crease, T. J., Mateos, M., Cotner, J. B. & Markow, T.A. (2005) The functional significance of ribosomal (r)DNA variation: Impacts on the evolutionary ecology of organisms. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **36**, 219-242.
- Weiher, E. & Keddy, P.A. (1995) Assembly rules, null models, and trait dispersion : New questions from old patterns. *Oikos*, **74**, 159-164.
- Williams, R. J. & Martinez, N.D. (2000) Simple rules yield complex food webs. *Nature*, **404**, 180-183.
- Wood, S. N. (2011) Fast stable restricted maximum likelihood and marginal likelihood estimation of semiparametric generalized linear models. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B*, **73**, 3-36.
- Woodward, G. & Hildrew, A.G. (2002a) Body-size determinants of niche overlap and intraguild predation within a complex food web. *Journal of Animal Ecology*, **71**, 1063-1074.
- Woodward, G. & Hildrew, A.G. (2002b) Food web structure in riverine landscapes. *Freshwater Biology*, **47**, 777-798.
- Wright, J. F., Moss, D., Armitage, P. D. & Furse, M.T. (1984) A preliminary classification of running-water sites in Great Britain based on macro-invertebrate species and the prediction of community type using environmental data. *Freshwater Biology*, **14**, 221-256.

X/Y/Z

- Yuan, L. L. (2004) Assigning macroinvertebrate tolerance classifications using generalised additive models. *Freshwater Biology*, **49**, 662-677.
- Zhou, Q., Wu, C., Dong, B., Li, F., Liu, F. & Xiang, J. (2010) Proteomic analysis of acute responses to copper sulfate stress in larvae of the brine shrimp, *Artemia sinica*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, **28**, 224-232.



Curriculum Vitae



Education

2007 – 2012

University of Lorraine (formerly University Paul Verlaine) – Metz (France), LIEBE (CNRS UMR 7146): PhD in Ecology

2006-2007

University Paul Verlaine – Metz (France): Master of Science in Environmental management. Speciality: Ecotoxicology and Biodiversity

2005-2006

University Paul Sabatier – Toulouse (France): Master of Science in Ecology

2002-2005

University Henri Poincaré – Nancy (France): Bachelor of Science in Biology of Organisms

Scientific communication

Technical Reports

- **MONDY C.**, USSEGLIO-POLATERA P. (2011) *Développement et optimisation de l'indice biologique macroinvertébrés benthiques (I2M2) pour les cours d'eau*. 129 p. Metz: UPV. LIEBE. Technical report for the ONEMA.
- USSEGLIO-POLATERA P., **MONDY C.** (2011) *Invertébrés benthiques : métriques biologiques, conditions de référence, méthodes de bioindication, système-expert*. 147 p. Metz: UPV. LIEBE. Technical report (Final year) for the MEDDTL.
- **MONDY C.**, USSEGLIO-POLATERA P. (2010) *Invertébrés benthiques : métriques biologiques, conditions de référence, méthodes de bioindication, système-expert*. 89 p. Metz: UPV. LIEBE. Technical report (Second year) for the MEEDDEM.
- USSEGLIO-POLATERA P., **MONDY C.** (2008) *Invertébrés benthiques : métriques biologiques, conditions de référence, méthodes de bioindication, système-expert*. 144 p. Metz: UPV. LIEBE. Technical report (First year) for the MEEDDAT.

Publications

- **MONDY C. P.** & USSEGLIO-POLATERA P. *Using benthic macroinvertebrate biotraits to assess specific risks of stream ecological impairment under multiple pressure scenarii*. Submitted to Science of the Total Environment.
- **MONDY C. P.** & USSEGLIO-POLATERA P. *Using fuzzy-coded biotraits to elucidate the non-random role of anthropogenic habitat alteration in functional homogenization*. Submitted to Freshwater Biology.
- **MONDY C. P.**, VILLENEUVE, B., ARCHAIMBAULT, V. & USSEGLIO-POLATERA, P. (2012) *A new macroinvertebrate-based multimetric index (I_2M_2) to evaluate ecological quality of French wadeable streams fulfilling the WFD demands: A taxonomical and trait approach*. Ecological Indicators, 18, 452-467.
- JUNG V., VIOLLE C., **MONDY C.**, HOFFMANN L. & MULLER S. (2010) *Intraspecific trait variability challenges the rules governing community assembly*. Journal of Ecology, 98, 1134-1140
- BOICHE A., **MONDY C.**, JACQUEMIN G. & THIÉBAUT G. (2009) *Découverte d'*Isoptena serricornis* (Pictet, 1841) en France [Plecoptera, Chloroperlidae] (First record of *Isoptena serricornis* (Pictet, 1841) in France [Plecoptera, Chloroperlidae])*. Ephemera, 10, 1-6

Platform communication

- PRIETO-MONTES M., **MONDY C.** & USSEGLIO-POLATERA P. (2012) *Le nouvel Indice Invertébrés Multi-Métrique (I_2M_2)*. *Changement dans la méthode d'évaluation des cours d'eau*. Journée scientifique de la société zoologique de France : Les macroinvertébrés benthiques d'eau douce. Paris, France, 29/05/2012.
- **MONDY C.**, VILLENEUVE B., ARCHAIMBAULT V. & USSEGLIO-POLATERA P. (2011) *Towards the new French Multi-Metric Invertebrate Index (I_2M_2)*. Meeting of the Central Baltic GIG Steering Group. Edinburg, Scotland, 26-27/01/2011.
- **MONDY C.**, VILLENEUVE B., ARCHAIMBAULT V. & USSEGLIO-POLATERA P. (2011) *Proposition d'un nouvel indice multimétrique de bioévaluation des cours d'eau basé sur le compartiment macro-benthique: l' I_2M_2* . Séminaire ONEMA Bio-évaluation dans le contexte de la DCE, Paris, France, 19-22/04/2011

- **MONDY C.**, ARCHAIMBAULT V. & USSEGLIO-POLATERA P. (2010) *Invertébrés benthiques : quelles métriques biologiques intégrer dans un outil de diagnostic de l'état écologique d'un cours d'eau peu profond ?* Séminaire Cémagref Bioindication, Lyon, France, 20-21/09/2010.
- **MONDY C.**, ANGELI N. & USSEGLIO-POLATERA P. (2010) *Une vision isotopique de l'organisation trophique des peuplements de macroinvertébrés benthiques le long d'un gradient d'acidification.* Journées Scientifiques ZAM, Vittel, France, 10-11/05/2010.
- USSEGLIO-POLATERA P., **MONDY C.** & BEISEL J.-N. (2010) *Longitudinal changes in macroinvertebrate assemblages of the Meuse River: a taxonomic /versus /functional trait diversity approach.* 3rd International Scientific Meuse Symposium, "The Meuse District: Challenges for tomorrow", Liège, Belgium, 22-23/04/2010.
- PROVOST C., **MONDY C.**, BUSSEER O., PONS M.-N., POTIER, O., WAGNER, P. & USSEGLIO-POLATERA P. (2009) *Les caractéristiques taxonomiques et fonctionnelles du compartiment macrobenthique peuvent-elles être indicatrices de la qualité des eaux de surface, dans un secteur de cours d'eau subissant plusieurs contaminations successives.* 8^{ème} congrès international du GRUTTEE : "Ressources en eau : Quels outils scientifiques pour une gestion durable de leur qualité ?", Nancy, France, 26-28/10/2009.
- **MONDY C.**, ARCHAIMBAULT V., USSEGLIO-POLATERA P. (2009) *Changes in freshwater invertebrate feeding specialization and competition in a context of anthropogenic perturbations.* SEFS6. 6th Symposium for European Freshwater Sciences. Sinaia, Romania, 17-21/08/2009.
- **MONDY C.**, USSEGLIO-POLATERA P. (2009) *L'approche traits biologiques confirme-t-elle les hypothèses théoriques du River Continuum Concept à large échelle spatiale ?* 9^{èmes} Journées Internationales de Limnologie. Luxembourg, Luxembourg, 06-09/04/2009.
- BOICHÉ A., **MONDY C.**, BEISEL J.-N., THIÉBAUT G. (2009) *Evolution saisonnière des peuplements de macroinvertébrés associés aux macrophytes dans les cours d'eau des Vosges du Nord.* 9^{èmes} Journées Internationales de Limnologie. Luxembourg, Luxembourg, 06-09/04/2009.
- JUNG V., VIOLLE C., **MONDY C.**, HOFFMANN L., MULLER S. (2009) *Rôle de la variabilité intraspécifique de traits fonctionnels dans la structuration des communautés végétales des prairies alluviales.* 9^{èmes} Journées Internationales de Limnologie. Luxembourg, Luxembourg, 06-09/04/2009.

- **MONDY C. & USSEGLIO-POLATERA P.** (2008) *The Water Framework Directive application: Integrating river's longitudinal continuum into reference state characterization - An initial proposal based on macroinvertebrate communities.* 7th CIO "From sources to the sea: Mastering water quality", Rouen, France, 14-16/10/2008.
- **MONDY C., USSEGLIO-POLATERA P.** (2007) *Impact des activités anthropiques sur la biodiversité des communautés benthiques de la Moselle dans le secteur d'Epinal / Golbey.* Journées Scientifiques ZAM, Champenoux, France, 26/09/2007

Poster communication

- **MONDY C. & USSEGLIO-POLATERA P.** (2012) *Using macroinvertebrate benthic biotraits to assess specific risk of stream ecological impairment under multiple pressures scenarii.* 6th SETAC World congress, Berlin, Germany, 20-24/05/2012
- **MONDY C. & USSEGLIO-POLATERA P.** (2011) *In situ ecological risk assessment of rivers using taxonomic metrics and life history traits of macroinvertebrates.* 21st SETAC Europe annual meeting, Milan, Italy, 15-19/05/2011
- **MONDY C &, USSEGLIO-POLATERA P.** (2009) *Les traits biologiques potentiels des communautés benthiques : un outil pour tester les hypothèses de fonctionnement écologique du River Continuum Concept.* Séminaire de l'Ecole doctorale RP2E. Nancy, France, 15/01/2009
- **MONDY C., WAGNER P &, USSEGLIO-POLATERA P.** (2007) *Impacts de perturbations anthropiques successives sur un peuplement macrobenthique : intérêts respectifs des métriques taxonomiques et des métriques fonctionnelles dans le diagnostic écologique.* 50^{ème} Congrès annuel de l'Association française de limnologie. Toulouse, France, 13-15/11/2007.

Teaching activities between 2009 and 2012

Grade	Subject matter	number of hours
BSc	Introduction to the research	4
BSc	Biostatistics	12
BSc	Biotic indicators	13
MSc	Modelling and population dynamic	74
MSc	Introduction to the research	2
MSc	The effects of disturbances on biodiversity	6

Introduction to the research (BSc & MSc): Presentation of the French PhD formation to Bachelor and Master students based on my own experience and my research activities.

Biostatistics (BSc): Application of parametric statistical tests to biological data from an aquatic Coleoptera population. Basic functionalities of MS Excel.

Biotic indicators (BSc): Presentation, application and statistical interpretation of data achieved using the French standardized biomonitoring method (IBGN) based on the benthic invertebrate assemblage of two river reaches subjected to different levels of perturbation. Discussion of the advantages and the limits of this method in the context of the European Water Framework Directive.

Modelling and population dynamic (MSc): Sampling and identification of benthic macroinvertebrates. Statistical analysis and interpretation of a faunal data base: Basic (data importation and manipulation) and advanced (multivariate and classification analyses) use of the statistical software R.

The effects of disturbances on biodiversity (MSc): Use of the French software « Expert system for the interpretation of data obtained with the IBGN protocol ». of the objective was to establish an ecological diagnostic on the ecological status of a set of study sites based on their macroinvertebrate communities.

Résumé

Dans le contexte d'un environnement soumis à des pressions humaines de plus en plus importantes, l'évaluation de la qualité écologique des milieux naturels est devenue un enjeu scientifique, politique et sociétal majeur. Au début des années 2000, les méthodes de bio-évaluation existantes se sont révélées insuffisantes au regard des exigences affichées par la Directive Européenne Cadre sur l'Eau de maintenir ou recouvrer le bon état écologique pour les masses d'eau continentales. En parallèle de cette prise de conscience politique de la nécessité d'une amélioration des méthodes de bio-évaluation, un certain nombre d'auteurs ont plaidé pour une prise en compte explicite des caractéristiques biologiques et écologiques des espèces (i.e. leurs « traits ») de façon à mieux comprendre les processus de mise-en-place et d'organisation des communautés en relation avec les caractéristiques de leur habitat.

Le but principal de ce travail de thèse a été d'étudier comment les approches « traits », à plusieurs échelles d'organisation biologique, peuvent permettre d'améliorer la bio-évaluation des cours d'eau Français. Pour cela, nous avons étudié dans un premier temps l'application sur les communautés benthiques de l'approche « traits bio-écologiques potentiels » pour l'évaluation (i) de la qualité écologique, (ii) des risques d'altération et (iii) du degré d'homogénéisation fonctionnelle des cours d'eaux. Ensuite, nous avons exploré le potentiel de nouveaux traits (i.e. isotopiques, stœchiométriques et protéomiques) pour la caractérisation des réponses biologiques des invertébrés benthiques soumis à des pressions anthropiques 'simples' (i.e. acidification et contamination organique).

Nos résultats ont démontré que les traits bio-écologiques potentiels permettaient d'améliorer de manière significative l'évaluation du statut écologique des cours d'eaux et des pressions anthropiques qu'ils subissent, à large échelle spatiale (e.g. sur les réseaux nationaux de suivi de la qualité de l'eau). Les analyses isotopique et stœchiométrique ont permis également, sur des problématiques plus locales, de relier des informations sur des traits biologiques (régime alimentaire et développement) aux transferts de nutriments et de matière organique réalisés par les communautés benthiques au sein des systèmes lotiques. Enfin, l'analyse protéomique réalisée le long d'un gradient d'acidification ouvre des perspectives intéressantes pour la mise en place d'un « système expert » précoce des effets d'une détérioration de la qualité de l'eau sur les invertébrés benthiques.

Abstract

In a global change context, ecosystems are subjected to more and more severe human pressures. In this context, optimizing the biomonitoring of natural ecosystems has become a major scientific, political and societal issue. In the early 2000th, most of the freshwater bioassessment methods did not succeed in fulfilling the requirements of the European Water Framework Directive, for efficiently evaluating the ecological status of rivers with the main objective to maintain or to reach the good ecological status for all the water bodies. In the same time, a major advance in community ecology was the explicit consideration of the biological and ecological attributes of species (i.e. their “traits”) to better explain the role of habitat characteristics in community assembly.

The main goal of this PhD work was to establish how trait-based approaches, at different biological scales, could enhance the bioassessment of French streams. We have first focused on the utilization of potential bio-ecological traits of macrobenthic communities for (i) evaluating the ecological quality of rivers, (ii) assessing the risk of significant alteration of benthic assemblages by specific pressure categories and (iii) appraising the human pressure-driven functional homogenization process in benthic communities. We examined the potential of new traits (derived from stable isotopy, stoichiometry and proteomics) for depicting the benthic invertebrate responses to 'simple' anthropogenic pressures (i.e. acidification and organic contamination).

We have demonstrated that using potential bio-ecological traits efficiently enhances the ecological monitoring of wadeable rivers, at large spatial scale (e.g. on National survey networks). The stable isotope and stoichiometry analyses, when applied at reach scale, have allowed to link biological traits (i.e. diet and development) to ecological functions provided by macrobenthic communities, such as nutriment and organic matter flows in rivers. Finally, the proteomic analysis, performed along an acidification gradient, has brought out very interesting perspectives for the development of an integrative “expert system” that early detects the biological effects of water quality alteration on benthic invertebrate assemblages.