



HAL
open science

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

Virginie Ducrot

► **To cite this version:**

Virginie Ducrot. 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. Toxicologie. Université Paul Verlaine - Metz, 2005. Français. NNT : 2005METZ013S . tel-01752413

HAL Id: tel-01752413

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752413v1>

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>

THESE

Présentée devant
L'UNIVERSITE DE METZ

UFR Sciences fondamentales et Appliquées

**EXCLU DU
PRÊT**

Pour l'obtention du grade de docteur en sciences de la vie

Spécialité TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT

par

Virginie DUCROT

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.

Soutenue le 2 décembre 2005 devant la commission d'examen suivante :

Directeur de thèse
Co-Encadrant

Jean-François FERARD
Jeanne GARRIC

Professeur, Université de Metz
Directrice de recherches, Cemagref

Rapporteurs

Sylvain DOLEDEC
Cédric BACHER

Professeur, Université Lyon 1
Chargé de recherches, Ifremer

Examineurs

Alexandre PERY
Jean-Gabriel WASSON
Kristin BECKER VON SLOOTEN

Chargé de recherches, Cemagref
Directeur de recherches, Cemagref
Chargée de recherches, Ecole
Polytechnique Fédérale de Lausanne

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ



031 536328 5



Laboratoire d'écotoxicologie

UNIVERSITE Paul Verlaine METZ	
S.C.D.	
N° Inv.	2005037S
Cote	S/M ₃ 05/13
Loc	

THESE

Présentée devant

L'UNIVERSITE DE METZ

UFR Sciences fondamentales et Appliquées

Pour l'obtention du grade de docteur en sciences de la vie

Spécialité TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT

par

Virginie DUCROT

EXCLU DU PRÊT

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.

Soutenue le 2 décembre 2005 devant la commission d'examen suivante :

Directeur de thèse
Co-Encadrant

Jean-François FERARD
Jeanne GARRIC

Professeur, Université de Metz
Directrice de recherches, Cemagref

Rapporteurs

Sylvain DOLEDEC
Cédric BACHER

Professeur, Université Lyon 1
Chargé de recherches, Ifremer

Examineurs

Alexandre PERY
Jean-Gabriel WASSON
Kristin BECKER VON SLOOTEN

Chargé de recherches, Cemagref
Directeur de recherches, Cemagref
Chargée de recherches, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Jean-François Férard, professeur à l'université de Metz et directeur de cette thèse, pour m'avoir conseillé et soutenu jusque dans les toutes dernières heures de ce travail.

Un grand merci à Jeanne Garric, directrice du laboratoire d'écotoxicologie du Cemagref et co-encadrante de ce travail, pour m'avoir accueilli dans son équipe de recherche en maîtrise et m'avoir renouvelé sa confiance jusqu'à la fin de la thèse. Sa présence, son écoute et ses conseils avisés m'ont énormément aidé à m'affirmer et à évoluer en tant que jeune chercheur. Je lui adresse ici toute ma reconnaissance et mon admiration.

Je ne sais ô combien remercier Alexandre Péry, chargé de recherches et co-encadrant de cette thèse, pour sa disponibilité et son soutien de chaque instant. A chaque étape du travail, il a su me guider avec une grande patience. Il a fait preuve de beaucoup de compréhension dans les moments les plus difficiles et n'a jamais cessé de me soutenir et de m'encourager. Je lui témoigne ici ma profonde gratitude et toute mon amitié.

Je suis très honorée que Messieurs Cédric Bacher, chargé de recherches à l'IFREMER et Sylvain Dolédec, professeur à l'université Lyon 1, aient accepté la charge de rapporter ce travail. Je les en remercie chaleureusement.

Je suis également très reconnaissante à Jean-Gabriel Wasson, directeur de recherches au Cemagref, et Kristin Becker Van Slooten, chargée de recherches à l'école polytechnique fédérale de Lausanne, d'avoir accepté de participer au jury.

Tout ma gratitude à l'ensemble des membres du comité de pilotage de la thèse : Thierry Caquet, Patrick Flammarion, Sandrine Charles, Jeanne Garric, Alexandre Péry et Jean François Férard. Vos conseils et vos encouragements, toujours formulés dans la bonne humeur, m'ont beaucoup aidé.

Je tiens tout particulièrement à remercier Philippe Usseglio-Polatera et Sandrine Charles pour les heures de travail qu'ils m'ont consacrées tout au long de cette thèse, leur disponibilité, leur patience et leur gentillesse.

Je remercie par ailleurs, Jacques Mouthon, Michel Lafont et Marie-Claude Roger pour leur aide précieuse dans le cadre de mon initiation à la biologie et à l'écologie des invertébrés benthiques, ainsi que Bas Kooijman et Tjalling Jager pour leur accueil dans leur laboratoire et leur aide dans le cadre de la modélisation des données.

Comment ne pas remercier mes courageux stagiaires, Guillaume et Claudine, pour l'aide technique efficace et les moments agréables (et parfois pittoresques !) qu'ils m'ont apporté au cours de cette thèse ?

Du fond du cœur, un grand merci à mes collègues et amis, Benoit, Bernard(s), Hervé, Olivier, Raphaël, Sophie et Virginie, avec qui j'ai partagé tant de fous rires et d'instant inoubliables.

Enfin, un énorme merci à mes parents et mes sœurs, qui ont tant fait pour moi pendant toutes ces années. Une pensée émue pour ma deuxième famille : Véro, Greg, Matthieu, Marion, Edwige, Nico, Céline, Anne-Laure, Thibo et Bes. Les mots me manquent pour vous dire à quel point je vous suis reconnaissante et combien je tiens à vous.

RESUME

Nous avons cherché à améliorer la pertinence écologique des méthodes existantes d'évaluation des effets des substances chimiques pour les communautés d'invertébrés benthiques.

Nous avons tout d'abord mis au point une méthode qui permet de construire des batteries de test représentatives de la typologie de traits biologiques et écologiques rencontrés dans les communautés naturelles, grâce à l'analyse statistique des combinaisons de 22 caractéristiques biologiques et écologiques pour 479 espèces d'invertébrés rencontrées en Europe de l'Ouest. Nous avons utilisé cette méthode afin de construire une batterie de test représentative de la communauté d'invertébrés inféodés aux sédiments de zone aval de cours d'eau et de lacs. Cette batterie est constituée de cinq espèces : *Chironomus riparius*, *Valvata (Cincinna) piscinalis*, *Branchiura sowerbyi*, *Lumbriculus variegatus* et *Sericostoma personatum*.

Nous avons alors caractérisé la réponse biologique au zinc des populations de laboratoire pour *C. riparius*, *V. piscinalis* et *B. sowerbyi*. Pour ce faire, nous avons mis au point des méthodes d'élevage, décrit le cycle de vie en laboratoire en milieu non contaminé et réalisé des tests de toxicité afin de caractériser les effets d'une contamination du sédiment par le zinc sur la survie, la croissance et la reproduction des organismes. Ces effets ont été analysés au niveau individuel grâce à des modèles basés sur la perturbation de la gestion de l'énergie par le toxique. A partir de données individuelles, nous avons estimé les effets attendus au niveau des populations en couplant ces modèles d'effets sur les individus avec des modèles biodémographiques matriciels basés sur l'étude du cycle de vie des organismes.

L'étude de la sensibilité au zinc des populations de *C. riparius*, *V. piscinalis* et *B. sowerbyi* nous a permis d'estimer une concentration sans effet du zinc sur les communautés benthiques qui est relativement fiable par rapport aux résultats observés sur le terrain. La validation et l'adaptation des outils proposés en vue d'une utilisation en routine pour l'évaluation des effets des substances chimiques représentent les perspectives majeures de la thèse.

Mots clés : Invertébrés benthiques, Sensibilité, Traits biologiques, Traits écologiques, Evaluation du risque, Modélisation, Energie, Population, Zinc.

ABSTRACT

We sought to improve the ecological relevance of the existing effect assessment methods for benthic invertebrate communities.

We have thus developed a method, which permits to build test batteries that represent the typology of biological and ecological traits occurring in natural communities. It is based on the statistical analysis of the combinations of 22 biological and ecological traits for 479 western European invertebrate species. We used this method in order to build a test battery that represents the range of biological and ecological traits in benthic communities that inhabit fine sediments of lowland rivers and lakes in Western Europe. This battery gathers five species: *Chironomus riparius*, *Valvata (Cincinna) piscinalis*, *Branchiura sowerbyi*, *Lumbriculus variegatus* and *Sericostoma personatum*.

We have then sought to characterize the biological response to zinc of lab populations for *C. riparius*, *V. piscinalis* and *B. sowerbyi*. For these species, we developed handling and breeding methods and described their life cycle at the lab in clean sediments. Then, we ran toxicity tests to characterize the effects of zinc on individual survival, growth and reproduction. Test data were first analyzed at the individual level using mechanistic models based on the perturbation of energy budgets by the toxicant. On the basis of both the data from toxicity tests and the effects models, we estimated the effects of zinc at the population level using matrix population models. Finally, we used population level results to derive a no-effect concentration for the benthic community.

The study of population effects of zinc on *C. riparius*, *V. piscinalis* and *B. sowerbyi* allowed us to estimate a no-effect concentration for the benthic community, which is reliable when compared to field results. The validation and the adaptation the methods we used for routine effect assessment of chemicals represents the major prospect of our work.

Keywords: Benthic Invertebrates, Sensitivity, Biological traits, Ecological traits, Ecological risk assessment, Modeling, Energy, Population, Zinc.

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I : INTRODUCTION.....	15
1. CONTEXTE DE L'ETUDE.....	15
1.1. Evaluation du risque des substances chimiques pour le milieu aquatique.....	15
1.2. Evaluation des effets toxiques : questions actuelles.....	18
2. EVALUATION DES EFFETS TOXIQUES : ETAT DE L'ART.....	22
2.1. Qu'est ce qui détermine la réponse biologique des organismes aux contaminants ?	22
2.2. Approches alternatives pour le choix des espèces tests.....	28
2.3. Approches alternatives pour le calcul des valeurs seuil.....	34
I.3. PROBLEMATIQUE.....	38
I.4. DEMARCHE SCIENTIFIQUE.....	39
I.5. ORGANISATION DU MANUSCRIT.....	42
CHAPITRE II : CONSTRUCTION D'UNE BATTERIE D'INVERTEBRES BENTHIQUES BASEE SUR L'ETUDE DES TRAITS BIOLOGIQUES ET ECOLOGIQUES.....	45
1. TRAITS BIOLOGIQUES & ECOLOGIQUES ET DIVERSITE FONCTIONNELLE DES COMMUNAUTES.....	46
1.1. Définitions.....	46
1.2. Pourquoi utiliser les traits biologiques et écologiques comme critère de sélection des organismes composant une batterie de tests ?.....	47
2. CONSTRUCTION D'UNE BATTERIE D'INVERTEBRES BENTHIQUES : DEMARCHE & OUTILS.....	49
2.1. Support et caractérisation de l'information biologique et écologique utilisée.....	49
2.2. Définition d'une communauté benthique théorique.....	53
2.3. Typologie des traits biologiques et écologiques rencontrés dans cette communauté : construction des groupes fonctionnels.....	56
2.4. Sélection de représentants des groupes fonctionnels : construction de la batterie de tests.....	62
3. CONSTRUCTION D'UNE BATTERIE D'INVERTEBRES BENTHIQUES : RESULTATS.....	64
3.1. Construction de la communauté benthique théorique.....	64
3.2. Groupes fonctionnels obtenus.....	65
3.3. Caractérisation synthétique des groupes fonctionnels obtenus.....	74
3.4. Sélection de représentants des groupes fonctionnels.....	75
4. BIOLOGIE ET ECOLOGIE DE NOS ESPECES MODELES.....	81
4.1. <i>Chironomus riparius</i>	81
4.2. <i>Valvata (Cincinna) piscinalis</i>	85
4.3. <i>Branchiura sowerbyi</i>	90
4.4. Comparaison des traits biologiques et écologiques de nos espèces modèles par rapport aux caractéristiques moyennes de leur groupe fonctionnel.....	96
5. CONCLUSIONS DU CHAPITRE II.....	99
CHAPITRE III : ELEVAGE, CARACTERISATION ET MODELISATION DU CYCLE DE VIE EN LABORATOIRE DE NOS ESPECES MODELES.....	101
1. PRELEVEMENTS, ACCLIMATATIONS ET ELEVAGES.....	102
1.1. <i>Chironomus riparius</i>	102
1.2. <i>Valvata (Cincinna) piscinalis</i>	104
1.3. <i>Branchiura sowerbyi</i>	108

2. CARACTERISATION ET MODELISATION DU CYCLE DE VIE DES ESPECES ETUDIEES EN LABORATOIRE : PRINCIPES ET METHODES	112
2.1. Technique d'analyse des données : la modélisation.....	112
2.2. Définition des conditions expérimentales	119
2.3. Méthodes de caractérisation des paramètres du cycle de vie : les bioessais	122
2.4. Méthodes d'analyse des données	132
3. CARACTERISATION DU CYCLE DE VIE AU LABORATOIRE POUR LES TROIS ESPECES ETUDIEES : RESULTATS	133
3.1. Cycle de vie de <i>Chironomus riparius</i>	133
3.2. Cycle de vie de <i>Valvata (Cincinna) piscinalis</i>	138
3.3. Cycle de vie de <i>Branchiura sowerbyi</i>	162
3.4. SYNTHESE COMPARATIVE DES PARAMETRES VITAUX DE NOS TROIS ORGANISMES.....	182
4. CONCLUSIONS DU CHAPITRE III.....	185
 CHAPITRE IV : EVALUATION DE LA TOXICITE AU NIVEAU DE L'INDIVIDU	187
1. TOXIQUE DE REFERENCE : LE ZINC.....	188
1.1. Critères de choix du toxique de référence.....	188
1.2. Mode d'action du zinc chez les invertébrés aquatiques	189
2. TECHNIQUE D'ANALYSE DES DONNEES : LA MODELISATION	192
2.1. La clé d'interprétation des effets toxiques : l'énergie	192
2.2. Hypothèses fondamentales et utilisation des modèles d'effets DEBtox.	193
2.3. Le modèle toxico-cinétique général	194
2.4. Effets sur la survie des organismes	196
2.6. Effets sur la reproduction des organismes.....	204
3. LES METHODES D'EVALUATION DE LA TOXICITE DU ZINC AU NIVEAU DE L'INDIVIDU.....	212
3.1. Principe et méthodes des bioessais de toxicité.....	212
3.2. Enrichissement du sédiment en zinc	212
3.3. Voies de contamination des organismes	215
3.4. Tests de toxicité.....	216
3.5. Méthodologie de dosage de la concentration interne en zinc.....	221
4. EVALUATION DE LA TOXICITE AU NIVEAU DE L'INDIVIDU : APPLICATION EXPERIMENTALE.....	223
4.1. Effets du zinc chez <i>Chironomus riparius</i>	223
4.2. Effets du zinc chez <i>Valvata (Cincinna) piscinalis</i>	240
4.3. Effets du zinc chez <i>Branchiura sowerbyi</i>	258
4.4. Comparaison des effets individuels chez les trois espèces étudiées	268
5. CONCLUSION DU CHAPITRE IV.....	271
 CHAPITRE V : EVALUATION DE LA TOXICITE AU NIVEAU DE LA POPULATION	273
1. CARACTERISATION DES POPULATIONS DE LABORATOIRE	275
2. LA VARIABLE D'EFFET PRIVILEGIEE : LE TAUX DE CROISSANCE DE LA POPULATION.....	276
3. METHODES DE CALCUL DU TAUX DE CROISSANCE DE LA POPULATION .	277
4. MODELES DEMOGRAPHIQUES MATRICIELS : PRINCIPES DE CONSTRUCTION ET D'UTILISATION COMMUNS AUX TROIS ESPECES ETUDIEES.....	281
5. PARAMETRAGE DU MODELE BIODEMOGRAPHIQUE.....	286

5.1. <i>Chironomus riparius</i>	286
5.2. <i>Valvata (Cincinna) piscinalis</i>	292
5.3. <i>Branchiura sowerbyi</i>	296
6. ETUDE DE SENSIBILITE.....	300
7. EVALUATION DE LA TOXICITE AU NIVEAU DE LA POPULATION :	
APPLICATION EXPERIMENTALE.....	301
7.1. Effets du zinc sur les populations de <i>Chironomus riparius</i>	301
7.2. Effets du zinc sur les populations de <i>Valvata (Cincinna) piscinalis</i>	305
7.3. Effets du zinc sur les populations de <i>Branchiura sowerbyi</i>	308
8. RELATION ENTRE LA REPONSE BIOLOGIQUE MESUREE AU NIVEAU INDIVIDUEL ET AU NIVEAU POPULATIONNEL CHEZ NOS TROIS ESPECES	311
9. COMPARAISON DES EFFETS AU NIVEAU DE LA POPULATION CHEZ LES TROIS ESPECES ETUDIEES.....	313
10. CALCUL DE LA CONCENTRATION SANS EFFET AU NIVEAU DE LA COMMUNAUTE D'INVERTEBRES BENTHIQUES	315
11. CONCLUSIONS DU CHAPITRE V.....	316
 CHAPITRE VI : DISCUSSION	 319
1. INTERET, CHAMP D'APPLICATION, VALIDATION ET LIMITES DE LA METHODE DE REPRESENTATION DE LA COMMUNAUTE NATURELLE PAR UNE BATTERIE D'ESPECES	320
1.1. Intérêts et champ d'application de la méthode.....	320
1.2. Validation de la méthode.....	324
1.3. Limites de la méthode et améliorations possibles	328
2. INTERETS, VALIDATION ET LIMITES DE NOS MODELES D'EVALUATION DES EFFETS AU NIVEAU DES INDIVIDUS	331
2.1. De la concentration externe en zinc aux effets toxiques : intérêts de nos modèles d'effets au niveau individuel	331
2.2. Validation de nos modèles d'effets au niveau individuel	332
2.3. Limites et améliorations possibles de nos modèles d'effet au niveau individuel ...	336
3. INTERET ET LIMITES DE NOS MODELES D'EVALUATION DES EFFETS AU NIVEAU DES POPULATIONS.....	340
3.1. Intérêt du changement d'échelle : de l'individu à la population dans le cadre de l'évaluation du risque	340
3.2. Limites et améliorations possibles de notre méthode de changement d'échelle.....	343
4. RELATIONS ENTRE LES TRAITS BIO/ECOLOGIQUES DE NOS TROIS ESPECES ET LEUR SENSIBILITE AU ZINC.....	349
4.1. Relations entre les capacités de bioaccumulation individuelles et les traits biologiques et écologiques chez nos trois espèces	349
4.2. Relations entre la réponse des populations au zinc et les traits biologiques et écologiques de nos trois espèces.	350
5. VALIDITE ET FAISABILITE DE NOTRE APPROCHE DANS LE CADRE DE L'EVALUATION DES EFFETS TOXIQUES.....	354
5.1. Pertinence de l'évaluation de la toxicité du zinc réalisée au niveau individuel par rapport aux résultats de laboratoire existants	355
5.2. Pertinence de l'évaluation de la toxicité du zinc réalisée au niveau de la communauté par rapport aux résultats de laboratoire existants	356
5.3. Pertinence de l'évaluation de la toxicité du zinc réalisée au niveau de la communauté benthique théorique par rapport à la sensibilité des communautés naturelles	357

5.4. Faisabilité de notre approche dans le cadre de l'évaluation des effets des substances chimiques	358
6. SYNTHESE ET PERSPECTIVES	360
REFERENCES	365
ANNEXES	387

LISTE DES ABREVIATIONS

ACC : augmentation des coûts de croissance

ACM : augmentation des coûts de maintenance

ANOVA : analyse de variance

AQUIRE : base de données écotoxicologiques proposée par l'agence américaine de protection de l'environnement

ASTM : société américaine pour les tests de toxicité

AVS/SEM : ratio entre les sulfates extractibles à l'acide et les métaux extraits simultanément

BCF : facteur de bioconcentration

CB-PEC : moyenne géométrique des concentrations « à risque » pour la faune aquatique

CB-TEC : moyenne géométrique des concentrations sans effet prédit pour la faune aquatique

CSE : concentration sans effet sur les individus

CSESP : concentration sans effet sur la population

DA : diminution de l'assimilation

DEB : théorie du budget énergétique dynamique

ECB : bureau européen des produits chimiques

CE_{x%} : concentration provoquant x% d'effets

EDTA : acide éthylènediaminotétraacétique

HC_{x%} : concentration dangereuse pour x% des espèces membres de la communauté

IC : intervalle de confiance

ICP-MS : spectrométrie de masse à couplage inductif

LOEC : plus faible concentration testée provoquant un effet significatif

MENVIQ : ministère de l'environnement du Québec

MTE : théorie métabolique en écologie

NOEC : concentration sans effet observé

OECD : organisation de coopération et développement économique

PEC : concentration prédite dans l'environnement

PEL : concentration « à risque » pour la faune aquatique

PNEC : concentration sans effet pour la communauté

SAR : relation structure activité d'un produit

SEP : concentration au-delà de laquelle la population est potentiellement menacée d'extinction

SFG : modèle "scope for growth"

SSD : distribution de la sensibilité des espèces

TEL : concentration sans effet pour la faune aquatique

UPGMA : méthode de classification hiérarchique basée sur l'étude de la moyenne des distances entre les éléments à regrouper

US ACE : corps des ingénieurs de l'armée américaine

US EPA : agence américaine de protection de l'environnement

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1. CONTEXTE DE L'ETUDE

1.1. Evaluation du risque des substances chimiques pour le milieu aquatique

L'objectif de l'évaluation du risque d'une substance est de déterminer les concentrations sans effet à long terme pour l'environnement. Cette évaluation comprend deux volets indépendants (ECB, 2003).

Le volet « exposition » sert à prévoir quels sont les compartiments des écosystèmes potentiellement touchés par le produit (milieu aquatique, terrestre, aérien) ainsi que les concentrations de la substance qui peuvent être retrouvées dans ces compartiments. Le niveau d'exposition des organismes vivant dans un compartiment donné est évalué grâce au calcul d'une concentration en toxique prédite dans l'environnement (PEC), qui prend en compte le tonnage auquel est produit la substance, son mode d'utilisation et sa dégradabilité.

Le volet « concentration-effets » sert à déterminer le danger de la substance aux concentrations environnementales pour les organismes qui vivent dans les compartiments exposés. La mesure des effets toxiques est réalisée au laboratoire grâce à des tests de toxicité sur des organismes vivants (bioessais). Ces tests consistent à exposer un nombre connu d'organismes d'une même espèce à une gamme de concentrations en produit chimique, pendant une durée connue et suffisante pour que ce produit atteigne une cible donnée. L'absorption du produit par l'organisme provoque une perturbation de son métabolisme, qui peut se traduire par le déclenchement d'effets biologiques tels qu'une altération du

comportement, une augmentation du taux de mortalité, une diminution des taux de croissance ou de reproduction. Le niveau de toxicité d'un produit peut donc être évalué en quantifiant ces effets biologiques au niveau de l'individu. Le paramètre biologique étudié, ainsi que la durée du bioessai, dépendent de l'espèce testée.

A l'issue du bioessai, nous disposons pour chaque concentration testée du nombre moyen d'individus affectés et d'une mesure de l'écart type autour de cette moyenne grâce aux réplicats. Le danger de la substance peut alors être caractérisé en calculant deux types de valeurs seuils pour les effets toxiques. En comparant statistiquement les effets observés dans les différentes concentrations testées par rapport aux témoins, nous pouvons déterminer une concentration en produit qui ne provoque pas d'effet significatif chez les organismes exposés (NOEC). Par ailleurs, il est possible de modéliser la relation concentration-réponse afin de calculer des concentrations en toxique provoquant x% d'effet sur les organismes exposés ($CE_{x\%}$). Par exemple, la CL_{50} correspond à la concentration qui provoque 50% de mortalité chez les individus exposés. Le nombre de valeurs seuil à acquérir pour évaluer l'effet d'une substance sur l'environnement est fixé de façon réglementaire en fonction du produit étudié (ECB, 2003) :

- pour les substances nouvelles¹, l'évaluation des effets est généralement basée sur un jeu de données dit « standard », qui repose sur la réalisation de bioessais mono-spécifiques à court terme sur une algue, un crustacé (la daphnie) et un poisson. Ce jeu de donnée peut être complété au besoin par des tests à long terme sur des espèces standards et des tests multi-espèces en mésocosmes ;
- pour les substances existantes¹, l'évaluation des effets est basée sur le jeu de données standard (plus ou moins complet lorsqu'il s'agit de substances introduites sur le marché il y a longtemps) et / ou sur l'utilisation éventuelle d'autres données existantes si celle-ci sont issues de tests réalisés suivant des protocoles standardisés (ou de qualité équivalente aux protocoles standardisés). Ces données existantes correspondent généralement à des résultats de tests à court terme sur des espèces « non standard », de tests à long terme chez des espèces standard ou non, et de tests multi-espèces en microcosmes² et / ou mésocosmes³;

¹ produits chimiques disponibles à la vente avant 1981 (à opposer aux substances nouvelles, mises sur le marché après 1981).

² écosystème expérimental de petite taille (par exemple, un aquarium) visant à recréer une chaîne trophique en laboratoire.

³ écosystème expérimental de grande taille (par exemple, une mare, une rivière artificielle ou un enclos dans un lac) visant à recréer une chaîne trophique dans le milieu naturel.

- pour les substances biocides, le jeu de données standard doit être complété par d'autres tests choisis en fonction des propriétés chimiques et de l'utilisation de la substance ;
- pour les substances bioaccumulables et / ou bioamplifiables, le jeu de données standard doit être complété par des tests de bioaccumulation dans les chaînes trophiques.

A partir des NOECs et $CE_{x\%}$ obtenues pour un produit donné, il faut alors calculer la concentration en dessous de laquelle il est improbable d'observer des effets à long terme sur l'environnement (PNEC). De nombreuses incertitudes interviennent dans le calcul de la PNEC. Elles sont principalement dues (ECB, 2003) :

- à la variabilité intra et inter laboratoires des résultats de tests de toxicité ;
- à la simplicité et à l'unicité des conditions de laboratoire par rapport à la diversité des conditions du terrain. En effet, les interactions entre l'espèce et son milieu, entre la substance et le milieu (biodisponibilité, autres produits, etc.) et entre les espèces qui cohabitent dans le milieu sont généralement ignorées au laboratoire dans un souci de faisabilité des essais ;
- au passage de quelques effets mesurés vers les divers effets observables à plus long terme ;
- à l'extrapolation des effets observés sur quelques espèces à l'ensemble des espèces composant la communauté.

Afin de tenir compte des incertitudes liées à ces extrapolations dans le calcul de la PNEC, il existe différentes méthodes dont l'utilisation dépend du type (NOEC ou $CE_{x\%}$) et du nombre de valeurs seuil disponibles.

La méthode la plus couramment utilisée consiste à diviser la plus faible NOEC ou $CE_{x\%}$ obtenue pour les différentes espèces testées par un facteur d'extrapolation. Ce dernier varie de 10 à 1000 selon le nombre et le type de valeurs seuil disponibles (ECB, 2003).

Pour les quelques substances pour lesquelles plus de dix NOECs issues de tests à moyen ou long termes sont disponibles, les évaluations d'effet sont réalisées grâce à une méthode d'extrapolation statistique (méthode SSD (species sensitivity distribution)). Dans cette méthode, nous supposons que la sensibilité des différentes espèces au toxique étudié suit une certaine loi de distribution statistique et que la batterie d'espèces testées au laboratoire représente un échantillon aléatoire de cette distribution. Les approches les plus utilisées supposent une distribution triangulaire (US EPA, 1995, citée par Bonnomet, 2002), log-

logistique (Aldenberg et Slob, 1993 ; Aldenberg et Jaworska, 2000) ou log-normale (Wagner et Lokke, 1991) des NOECs pour les différentes espèces aquatiques.

Cette approche permet de déterminer des concentrations dangereuses pour 5% des espèces vivantes ($HC_{5\%}$) et leurs des intervalles de confiance à 50%. Concrètement, la $HC_{5\%}$ est la concentration correspondant au 5^{ème} percentile de la distribution des logarithmes des NOECs obtenues grâce à différents bioessais. La $HC_{5\%}$ est alors divisée par un facteur d'extrapolation compris entre 1 et 5 afin d'obtenir une valeur de PNEC.

A l'issue de ces calculs, la concentration prédite dans l'environnement (PEC) est comparée à la concentration sans effet à long terme pour l'environnement (PNEC). Si la valeur de PEC est inférieure à la PNEC, la substance telle qu'elle est utilisée n'est pas considérée comme dangereuse pour l'environnement. Sinon, il faut réviser la quantité de substance produite et / ou son mode d'utilisation.

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous intéresserons seulement à l'étape d'évaluation des effets des substances chimiques en laboratoire, c'est à dire l'étape qui permet de calculer les PNECs. Dans le paragraphe suivant, nous allons voir quels sont les points qui font actuellement débat dans ces méthodes d'évaluation des effets.

1.2. Evaluation des effets toxiques : questions actuelles

L'utilisation des NOECs est actuellement remise en question pour différentes raisons. Ces raisons ont été explicitées depuis longtemps (Stephan et Rogers, 1985).

Sur le plan théorique, la NOEC constitue une concentration sans effet significatif sur les organismes exposés par rapport aux témoins. Cependant, l'absence d'effet significatif ne signifie pas l'absence d'effets. Ainsi, de nombreux auteurs ont souligné le fait que la NOEC est souvent interprétée à tort comme une concentration sans effet et qu'elle sous estime probablement les effets des toxiques (Chapman *et al.*, 1996 ; Crane et Newman, 2000 ; Isnard *et al.*, 2001).

Sur le plan pratique, les NOECs dépendent entièrement du plan d'expérience utilisé pour les essais. En effet, la NOEC obtenue pour une espèce et un toxique donné ne peut prendre que

l'une des valeurs de la gamme de concentrations testées (Crane et Newman, 2000 ; Vindimian, 2002).

En outre, elles dépendent généralement de la durée du test (sauf dans quelques cas où des mesures de cinétique du toxique ont été réalisées au cours du test). Ceci peut poser problème pour l'étude de composés très hydrophobes dont il est difficile de détecter les effets à court et moyen terme (ECB, 2003).

Le choix du critère d'effet étudié (survie, croissance ou reproduction) influence aussi la valeur de la NOEC obtenue (*loc.cit.*).

Par ailleurs, les NOECs dépendent du nombre de réplicats, du nombre d'individus par réplicats et du test statistique utilisé (Chapman *et al.*, 1996 ; Isnard *et al.*, 2001). En effet, la NOEC est déterminée à partir de tests de comparaison multiple de moyennes (ANOVA ou équivalents non paramétriques) dont la puissance dépend du nombre de données utilisées. Au vu du faible nombre de réplicats réalisés dans un test de toxicité (généralement trois ou cinq) et de la variance du critère d'effet observé (généralement élevée pour les critères d'effets sub-létaux), la puissance de ces tests statistiques est faible : il est donc difficile de mettre en évidence des différences significatives entre les concentrations testées et les témoins (Bonnomet, 2002). De ce fait, les NOECs obtenues par différents auteurs pour un même composé peuvent varier d'un facteur deux à dix (Chapman *et al.*, 1996). Cette variabilité peut conduire à des incohérences voire à des résultats contradictoires : ceci est flagrant dans le cadre de l'étude de calibration inter-laboratoires, présentée par Chapman *et al.* (1996). Les deux premiers auteurs de cet article, appartenant à des laboratoires différents, ont estimé la NOEC d'un même échantillon d'effluent d'usine de pâte à papier de façon indépendante, en utilisant le même protocole de test de toxicité et la même espèce test. Sur la base des NOECs obtenues dans ces tests, l'un des auteurs a déclaré que cet effluent était toxique alors que l'autre l'a déclaré non toxique. Ces auteurs ont donc conclu que les NOECs ne permettent pas de déterminer la toxicité d'un effluent de façon fiable.

Pour ces raisons, de nombreux auteurs [Pack (1993) ; Chapman *et al.* (1996) ; Kooijman et Bedaux (1996) ; Crane et Newman, 2000 ; Isnard *et al.*, (2001)] ont préconisé l'utilisation de $CE_{x\%}$ ou d'autres types de valeurs seuil non réglementaires pour l'évaluation des effets des substances chimiques.

Par ailleurs, certains problèmes se posent lors de l'extrapolation de la PNEC à partir des NOECs ou des $CE_{x\%}$. Cette extrapolation est réalisée sous l'hypothèse que la sensibilité

de l'écosystème dépend de la réponse des espèces les plus sensibles de la communauté, et que la protection de la structure de cette communauté (*i.e.* présence/absence et abondance relative des différentes espèces) permet de protéger aussi son fonctionnement (ECB, 2003). Concrètement, ceci indique que l'évaluation des effets est basée sur l'idée que la protection des espèces les plus sensibles devrait permettre de préserver la structure de la communauté et donc sa fonction. Ainsi, le choix des espèces utilisées pour les tests de toxicité est un problème crucial dans le cadre de l'évaluation des effets des substances chimiques.

Les tests de toxicité sont généralement réalisés seulement pour les espèces qui composent le jeu de données standard : une algue, la daphnie et un poisson. Cependant, Slooff *et al.* (1983a) ont montré que ces espèces ne sont pas représentatives de la gamme de sensibilité de 22 espèces aquatiques exposées à 15 contaminants différents. Ces résultats indiquent que cette batterie de tests standards ne regroupe pas les espèces les plus sensibles à l'ensemble des produits chimiques : elle ne permet donc pas de protéger efficacement la communauté pour l'ensemble des produits existants.

Le problème de la représentativité des espèces choisies lors des tests par rapport aux espèces composant la communauté a par ailleurs été soulevé dans le cadre des SSD. En effet, la forme des courbes obtenues dépend des groupes taxonomiques pris en compte : par exemple, lors de leur étude de la toxicité du fenitrothion (herbicide), Van den Brink *et al.* (2005) ont montré que la HC_{5%} obtenue peut varier d'un facteur 1000 en fonction des espèces prises en compte dans la distribution. Ceci s'explique par le fait que les effets d'une substance chez les différents groupes taxonomiques varient en fonction du temps d'exposition des organismes, ainsi que du mode d'action du produit (voir paragraphe 2.1.1. et ECB, 2003). Ainsi, l'évaluation des effets par l'approche SSD est actuellement réalisée en prenant en compte au moins huit groupes taxonomiques différents (*loc.cit.*).

Outre les critères taxonomiques, les lignes directrices (US EPA / US ACE, 1998 ; ECB, 2003) soulignent la nécessité de tenir compte de la diversité des espèces aquatiques concernant les caractéristiques du cycle de vie, les modes d'alimentation, le niveau trophique et l'habitat des organismes lors du choix des espèces à inclure dans les SSD. Cependant, il n'existe actuellement pas de méthode qui permette de s'assurer que cette exigence soit bien remplie.

Dans le cadre de ce travail, nous nous proposons d'utiliser des concepts et des outils différents de ceux qui sont actuellement utilisés pour l'évaluation des effets des substances chimiques afin d'améliorer :

- le choix des espèces tests pour les bioessais ;
- la pertinence des valeurs seuil issues des données de bioessais.

Dans les paragraphes suivants, nous proposons une étude bibliographique de différents travaux réalisés en marge des méthodes standards d'évaluation des effets, afin de caractériser la réponse biologique des organismes aux toxiques. Cette étude n'a pas pour but d'être exhaustive, mais plutôt de nous permettre de nous interroger quant aux différentes façons d'aborder la notion de réponse biologique en écotoxicologie, le choix des espèces pour les tests de toxicité en laboratoire et le calcul des valeurs seuil. Ceci nous permettra de justifier les concepts et outils utilisés au cours de ce travail de thèse.

2. EVALUATION DES EFFETS TOXIQUES : ETAT DE L'ART

2.1. Qu'est ce qui détermine la réponse biologique des organismes aux contaminants ?

L'absorption d'un contaminant par un organisme vivant provoque une perturbation de son métabolisme. Cette perturbation entraîne une réponse biologique, qui se traduit soit par un retour de la cellule à l'état non perturbé, soit par la manifestation d'effets toxiques.

La réponse biologique d'un organisme à un toxique peut être vue comme le résultat de l'interaction entre les propriétés intrinsèques du produit et celles de l'organisme exposé. Elle dépend des propriétés chimiques du contaminant (structure, activité et mode d'action) et des propriétés physiologiques, biologiques et écologiques qui caractérisent l'organisme au moment de sa vie où il est exposé à ce contaminant. Chaque espèce présente donc une réponse spécifique à chaque produit chimique. Afin de comprendre quelles sont les caractéristiques qui déterminent la réponse d'une espèce à un produit, nous allons étudier les effets d'un contaminant depuis son action sur la cellule jusqu'à son action sur la population.

2.1.1. La réponse biologique à l'échelle de la cellule

La manifestation d'une perturbation du fonctionnement de la cellule est le résultat de l'interaction entre les biomolécules cellulaires et les contaminants. Cette interaction est très spécifique : son occurrence et son intensité dépendent de la physiologie de l'organisme au moment où il est exposé et du mode d'action du produit toxique. Elle se mesure en étudiant la présence et la concentration de molécules qui ont pénétré dans la cellule ou qui sont produites en réaction à l'exposition ou à l'effet du produit chimique sur la cellule (biomarqueurs).

Le mode d'action du contaminant est déterminé par sa structure chimique (Parkerton et Konkel, 2000 ; Escher et Hermens, 2002 ; Tremolada *et al.*, 2004). Les polluants ont été classés en 4 catégories, sur la base de relations structure/activité (SARs) (Hermens, 1989). Les produits « inertes » (classe I) et « peu réactifs » (classe II) ont une action narcotique : ils réagissent de façon non sélective avec les membranes biologiques, modifiant ainsi leur

structure et leur fonctionnement. Leur effet dépend principalement de leur hydrophobie (Van Leeuwen et Van Der Zandt, 1992). Les composés « réactifs » (classe III) et les composés « à mode d'action spécifique » (classe IV) réagissent sélectivement ou non avec les biomolécules cellulaires. Une fois dans la cellule, ils sont généralement hydroxylés puis éventuellement conjugués à d'autres molécules afin d'être éliminés (*loc.cit.*). Cependant, les conjugués sont parfois plus toxiques que la substance initiale.

Pour une famille de contaminants possédant un mode d'action donné, la réponse de la cellule dépend de la présence et l'abondance des cibles du produit, de ses capacités métaboliques, ainsi que de ses capacités de réparation des dommages (Escher et Hermens, 2002). Ces propriétés physiologiques sont caractéristiques des espèces (*loc.cit.*). Par exemple, l'élimination active du contaminant par les cellules fait appel à différentes voies métaboliques dont les biomolécules sont inégalement présentes et abondantes entre les espèces (Calabrese, 1983 ; Bazzanti *et al.*, 1997 ; Ibrahim *et al.*, 1998) ou au sein d'une même espèce. D'autres propriétés physiologiques plus globales déterminent la réponse des cellules. Par exemple, De Pirro et Marshall (2005) ont montré que des différences phylogénétiques concernant le système sanguin (présence ou non d'hémocyanines dans le sang) permettent d'expliquer les différences de réponse au cuivre chez 4 espèces de mollusques appartenant à 2 sous-classes différentes (Pulmonés et Prosobranches). Ainsi, c'est principalement l'appartenance à un groupe taxonomique donné qui détermine la réponse d'une cellule donnée à un produit donné.

2.1.2. La réponse biologique à l'échelle de l'individu

La perturbation de la physiologie cellulaire peut se traduire par la manifestation d'effets sur le comportement, la survie, la croissance et la reproduction des individus. La façon dont la présence de contaminant dans les tissus se répercute sur ces variables individuelles dépend des caractéristiques biologiques et écologiques des espèces (Koeman, 1991), qui sont variables dans un même groupe taxonomique. Par exemple, Barata *et al.* (2001), ont montré que la sensibilité de cinq écotypes⁴ de *Daphnia magna* à l'éthyl-parathion (pesticide) peut varier d'un facteur 9 dans les mêmes conditions expérimentales.

⁴ Différentes formes phénotypiques de la même espèce résultant de la sélection naturelle dans un habitat donné.

Dans les paragraphes suivants, nous allons montrer que les caractéristiques biologiques et écologiques des organismes sont impliquées à toutes les étapes du processus de contamination et de réponse biologique : exposition, absorption, élimination, et compensation éventuelle des effets du produit.

Les caractéristiques biologiques et écologiques des espèces interviennent tout d'abord dans le niveau d'exposition des individus au contaminant. En effet, la durée de contact entre l'organisme et le milieu contaminé dépend du nombre et de la durée des stades aquatiques durant le cycle de vie, ainsi que de la présence de formes de résistance au cours de ce cycle (Spromberg et Birge, 2005). L'habitat et le mode d'alimentation déterminent le comportement de l'organisme et influencent son niveau d'exposition (Koivisto *et al.*, 1992).

Les caractéristiques biologiques et écologiques des espèces interviennent par ailleurs dans la cinétique de contamination de l'organisme (Escher et Hermens, 2002). En effet, la vitesse d'absorption d'un contaminant dépend de l'intensité des échanges entre l'organisme et son milieu. Cette vitesse d'absorption peut être décrite à partir de la vitesse d'assimilation de la nourriture (Canivet et Gibert, 2002) et de la surface d'échange entre l'organisme et le milieu. Cette surface d'échange est généralement représentée par le rapport entre la surface du corps et son volume (S/V) (Escher et Hermens, 2002). Dans ce ratio, la surface corporelle prend en compte les différentes voies d'absorption du toxique : le tégument, le tractus digestif et les surfaces respiratoires (Weiner *et al.*, 2004). Pour deux organismes de taille similaire, plus le ratio S/V est élevé, plus la cinétique d'absorption du toxique est rapide (Koivisto *et al.*, 1992). Concrètement, c'est donc principalement le mode d'alimentation et le système respiratoire (branchie ou tégument) qui interviennent dans la cinétique de contamination de l'organisme. Par ailleurs, la vitesse d'absorption du toxique dépend de la présence d'une structure de protection (coquille operculée, cuticule, etc.) et de régulations comportementales éventuelles : par exemple, Canivet et Gibert (2002) ont observé des réactions d'évitement du substrat contaminé chez le gastéropode *Niphargus rhenorhodanensis*.

Les caractéristiques biologiques et écologiques des espèces interviennent d'autre part dans leurs capacités d'élimination ou de stockage du contaminant sous forme non dangereuse. L'élimination passive du composé implique son excrétion ou son accumulation dans des compartiments inertes de l'organisme (par exemple, dans la cuticule chez les chironomes (Groenendijk *et al.*, 1999)). En outre, les tissus à forte teneur en lipides constituent un site de stockage important des contaminants chez la plupart des organismes. Les différences de présence et de volume de ces compartiments génèrent une forte variabilité interspécifique de réponse biologique aux toxiques, et en particulier aux produits organiques (Escher et Hermens, 2002). Ces différences sont liées à la taille relative des espèces : en effet, ce sont généralement les organismes les plus gros qui possèdent le plus de réserves lipidiques (Canivet et Gibert, 2002 ; Escher et Hermens, 2002).

En dernier lieu, les caractéristiques biologiques et écologiques des organismes sont impliquées dans les réponses de compensation des dommages causés par le toxique ou, au contraire, dans l'ampleur des processus d'aggravation de ces effets. Ceci a notamment été démontré pour la tolérance à la matière organique : chez la moule *Dreissena polymorpha*, l'eutrophisation du milieu engendre une aggravation des effets du produit tandis qu'elle permet une relative compensation de ces effets chez *Chironomus riparius* (Stuijzand *et al.*, 1999). Ces relations de compensation / aggravation des perturbations liées aux contaminants par l'alimentation n'existent pas chez toutes les espèces aquatiques (De Haas *et al.*, 2002). Pour les espèces chez qui elles existent, ces relations sont spécifiques de l'espèce et du produit étudié (*loc.cit.*).

Finalement, les caractéristiques biologiques et écologiques des espèces influencent les niveaux d'exposition, les voies et les cinétiques d'absorption des contaminants, ainsi que la réponse biologique à ces produits (Vaal *et al.*, 2002). Ces caractéristiques biologiques et écologiques sont déterminées et évoluent (dans la limite de la gamme de variation possible pour l'espèce) en fonction des propriétés de l'habitat occupé la population (Townsend et Hildrew, 1994). Ainsi, ce sont principalement les caractéristiques liées à l'utilisation de l'habitat et de la nourriture, ainsi que les caractéristiques liées à la stratégie d'histoire de vie des organismes, qui déterminent leur réponse aux contaminants au niveau individuel.

2.1.3. La réponse biologique à l'échelle des populations

La modification du comportement ainsi que la diminution des taux de survie, de croissance et de reproduction peut conduire à une modification de la dynamique de population, voire à la disparition de l'espèce dans l'habitat pollué (Caswell, 2001).

Pour une même perturbation au niveau individuel, l'effet sur la population est plus ou moins forte selon la stratégie d'histoire de vie des espèces (Spromberg et Birge, 2005). Concrètement, la stratégie d'histoire de vie est un ensemble d'informations qui regroupe :

- les paramètres biodémographiques de l'espèce dans un milieu donné (durée de vie, nombre de stades de développement, nombre de reproductions, fécondité, etc.) ;
- les relations entre ces paramètres (relation entre durée de vie et âge de première reproduction, relation entre taux de croissance et fécondité, etc.).

Chaque stratégie d'histoire de vie correspond à une co-adaptation des caractéristiques biologiques et écologiques de l'espèce en fonction des facteurs biotiques et abiotiques de son habitat. Ces caractéristiques peuvent être classées en deux catégories. Celles qui sont liées au cycle développement de l'organisme influencent surtout la probabilité de survie. Celles qui sont liées à la reproduction influencent surtout la fécondité.

Ainsi, le nombre de stades de développement et leur vulnérabilité en termes de probabilité de survie sont des déterminants majeurs de la résistance des populations aux perturbations (Spromberg et Birge, 2005). En effet, chez certains organismes, il existe des périodes ou des stades de développement critiques pendant lesquels la probabilité de survie des organismes est plus faible que pendant les autres stades (Koeman, 1991). Ces stades sont particulièrement vulnérables en cas de pollution. C'est par exemple le cas des périodes de mues larvaires chez les crustacés ou de nymphose chez les insectes (Koivisto *et al.*, 1992). Par ailleurs, la présence de stades colonisateurs, capables de se disperser au cours du cycle de vie, ainsi que de stades de résistance (dormances ou diapauses larvaires) influencent à la fois la résistance et la résilience⁵ des populations (Sheratt *et al.*, 1999 ; Bongers *et al.*, 2000).

⁵ capacité d'une population dont la dynamique a été modifiée par une perturbation à revenir à un état d'équilibre lorsque la perturbation a cessé.

En outre, les caractéristiques concernant la reproduction des organismes, en lien avec leur durée de vie, influencent fortement la réponse des populations aux contaminants (Calow *et al.*, 1997 ; Indeherberg *et al.*, 1999). En effet, le nombre de descendants produits par année dans une population dépend, d'après Spromberg et Birge (2005) :

- de l'âge de la maturité sexuelle par rapport à la durée de vie et au nombre de reproductions potentielles ;
- du nombre de reproductions par an ;
- de la fécondité des organismes ;
- de la vulnérabilité des œufs (plus le parent investit d'énergie dans un œuf, moins il est fécond, mais plus l'œuf puis le juvénile ont de fortes probabilités de survie) ;
- de l'existence de soins parentaux aux œufs et/ou aux jeunes.

En milieu non pollué, il n'existe pas de « bonne » ou de « mauvaise » stratégie en termes de persistance d'une population (Spromberg et Birge, 2005). En revanche, certaines stratégies sont plus « efficaces » que d'autres en termes de persistance lorsqu'une pollution vient se rajouter au régime normal de perturbation du milieu (Kammenga *et al.*, 1996). Par exemple, dans le cas d'une perturbation courte et passagère survenant pendant la saison de reproduction, les populations d'espèces qui peuvent se reproduire plusieurs fois au cours de la saison seront probablement moins affectées que celles qui ne se reproduisent qu'une seule fois (Calow *et al.*, 1997).

2.1.4. Bilan

D'après les observations précédentes, nous supposons que la réponse d'une cellule au contaminant résulte de l'interaction entre sa physiologie, sa fonction et son activité, et le mode d'action du contaminant auquel elle est soumise.

La réponse biologique d'un individu ou d'une population résulte de l'interaction entre les perturbations engendrées par le toxique au niveau cellulaire et les caractéristiques biologiques et écologiques des organismes. Ces caractéristiques sont principalement déterminées par les propriétés de l'habitat et la stratégie d'histoire de vie des organismes.

En conclusion, les facteurs qui déterminent la réponse biologique aux toxiques varient selon le niveau d'organisation biologique (cellule, individu ou population) considéré.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi de nous intéresser en particulier à la relation entre les traits biologiques et écologiques des organismes (étudiés à l'échelle de l'individu et de la population) et leur réponse aux contaminants.

2.2. Approches alternatives pour le choix des espèces tests

2.2.1. Méthodes de choix des espèces tests : critères communs

Afin d'être largement utilisables, les tests de toxicité doivent être simples, rapides, sensibles, répétables et peu chers (Giesy et Hoke, 1989). Les espèces utilisées lors de ces tests sont choisies afin de répondre au mieux à ces critères, qui se traduisent par les contraintes suivantes :

- le taxon est présent, abondant et facilement identifiable *in situ* (Marchese et Brinkhurst, 1996) ;
- sa distribution géographique est large (Bennett et Cabbage, 1992) ;
- il a un rôle important dans le fonctionnement de l'écosystème (Kosmala *et al.*, 1999) ;
- son élevage et sa manipulation sont simples (Taylor *et al.*, 1991) ;
- son cycle de vie est court (Chapman, 2001) ;
- il tolère de larges variations des facteurs abiotiques (Byrne et O'Halloran, 2001) ;
- son habitat naturel correspond au compartiment aquatique testé (Taylor *et al.*, 1991) ;
- il est sensible au produit testé (Mc Pherson et Chapman, 2000) ;
- il est possible d'étudier les effets aigus et chroniques du produit, et éventuellement sa bioaccumulation dans l'organisme (Chapman, 2001) ;
- il existe des protocoles d'élevage et de tests, voir des kits facilitant la réalisation du test et améliorant les performances du contrôle de qualité pour cet organisme (Davoren et Fogarty, 2004).

De nombreuses espèces sont susceptibles de satisfaire au moins partiellement ces critères. Ainsi, plus de 3500 espèces ont été l'objet de tests de toxicité depuis 1950 (US EPA, 2002).

Dans les paragraphes suivants, nous allons voir les différentes approches qui ont été utilisées afin de sélectionner les organismes pour les bioessais sachant que :

- l'utilisation de batteries regroupant plusieurs espèces constitue le seul recours expérimental fiable afin de représenter la gamme de sensibilité des espèces aquatiques à un produit donné (Thurston *et al.*, 1985 ; US EPA/US ACE 1998 ; Admiraal *et al.*, 2000 ; ECB, 2003) ;
- les contraintes évoquées précédemment s'appliquent aussi à la batterie de test : ainsi, d'après Férard et Ferrari (2005), une batterie de test doit être composée de tests simples, rapides, fiables, sensibles, si possibles standardisés et pertinents du point de vue écologique.
- les espèces composant la batterie doivent être choisies de façon à ce que leur combinaison représente au mieux la gamme de sensibilité aux toxiques des autres espèces composant la communauté (ECB, 2003).

2.2.2. Recherche des espèces les plus sensibles

Afin de pouvoir protéger la plus grande partie des espèces aquatiques, de nombreuses années de travail ont été consacrées à la recherche de quelques espèces qui seraient les plus sensibles au plus grand nombre de contaminants possible. Ainsi, des tests multi-espèces / multi-toxiques ont été réalisés sous l'hypothèse qu'il existe des espèces « généralement peu sensibles » et des « espèces généralement sensibles » aux toxiques. Par ailleurs, la sensibilité relative des espèces aux contaminants a été étudiée *via* l'analyse statistique de jeux de données construits en regroupant les résultats de tests indépendants (voir par exemple Vaal *et al.*, 1997a).

Ces études ont montré qu'il n'existe pas de règle générale permettant de classer une espèce comme « sensible » ou « peu sensible » : par exemple *C. riparius*, considéré comme « tolérant » à la pollution, s'est révélé beaucoup plus sensible au pentachlorophénol qu'*Ishnura elegans*, considérée comme un organisme « sensible » (Slooff *et al.*, 1983a). De même, *Ceriodaphnia dubia* est plus sensible aux métaux mais moins sensible aux effluents de papeterie que la moule *Anodonta imbecilis* (Masnado *et al.*, 1995).

Certaines études ont suggéré que *Daphnia magna* figure parmi les organismes les plus sensibles à de nombreux contaminants (Wogram et Liess, 2001 ; Von der Ohe et Liess, 2003), si bien que cet organisme est aujourd'hui le modèle le plus utilisé dans les tests de toxicité.

Cependant, *D. magna* est peu sensible à certaines familles de toxiques dont la présence dans l'environnement est très préoccupante (e.g. certains types de perturbateurs endocriniens, tels que les composés mimétiques oestrogènes (Sanchez et Tarazona, 2002)). De plus, la sensibilité de la daphnie n'a pas été démontrée pour l'ensemble des contaminants d'une même famille de toxiques (Mark et Solbe, 1998).

Ces résultats ont permis d'affirmer qu'il n'existe aucune espèce qui soit particulièrement sensible à l'ensemble des toxiques (Cairns, 1986). En conséquence, il est très difficile de construire une batterie de quelques organismes standards qui soient idéalement sensibles à l'ensemble des contaminants (Thurston *et al.*, 1985).

2.2.3. Sélection basée sur la taxonomie

Du fait des relations entre la physiologie des organismes et leur taxonomie (voir paragraphe 2.2.1.), la phylogénie a été utilisée comme base à la sélection d'espèces constitutives de batteries de tests.

La plupart des niveaux taxonomiques ont été pris comme référence [phylum (Hoekstra *et al.*, 1994), classe (Slooff *et al.*, 1983a), ordre (Wogram et Liess, 2001), famille (Van Wijngaarden *et al.*, 1998) et espèce (Le Blanc, 1984)]. A tous ces niveaux, des similitudes entre les sensibilités d'organismes appartenant à un même groupe taxonomique ont été mises en évidence pour des toxiques ayant le même mode d'action. Ces similitudes sont liées au fait que les structures biologiques cellulaires sont en général bien conservées au sein d'un groupe taxonomique. Ainsi, l'action du toxique sur sa cible est relativement similaire chez les différents membres d'un même groupe taxonomique (Escher et Hermens, 2002).

Cependant, les mécanismes impliqués dans le processus de toxicité à l'échelle supra-cellulaire, tels que les niveaux d'exposition, les voies et les cinétiques d'absorption des toxiques par les organismes, correspondent à des caractéristiques biologiques et écologiques plus ou moins plastiques⁶ (Vaal *et al.*, 2002). En effet, au sein d'un même groupe taxonomique, ces caractéristiques sont adaptées en fonction de l'habitat occupé par

⁶ se dit d'un trait d'histoire de vie dont la valeur fixée génétiquement peut être modifiée (dans une certaine gamme de variation propre au taxon) en fonction des propriétés du milieu.

l'organisme (Frainay, 1996). Ainsi, la sensibilité d'une espèce ne peut pas être prédite de façon fiable par son appartenance à un groupe taxonomique (Slooff *et al.*, 1986 ; Roman, 1996 ; Sverdrup *et al.*, 2002).

Les batteries basées sur la taxonomie permettent donc de répondre à des questions d'écotoxicologie *sensu stricto* (étude des relations entre le mode d'action des toxiques et la physiologie des organismes). En revanche, elles ne sont pas à tout coup adaptées à une utilisation dans le cadre de l'évaluation des effets toxiques, car elles ne rendent pas bien compte des différences inter-spécifiques pour les caractéristiques biologiques et écologiques, qui déterminent la réponse au toxique au niveau des individus et des populations.

2.2.4. Sélection basée sur la biologie et l'écologie des espèces

Certains travaux récents utilisent les caractéristiques biologiques et écologiques des taxa comme base pour la sélection des espèces tests. Par exemple, Sanchez et Tarazona (2002) proposent d'évaluer le danger de composés mimétiques des oestrogènes (toxiques qui perturbent potentiellement la reproduction) à l'aide d'une batterie de trois organismes (*D. magna*, *C. riparius* et *Lymnea peregra*) qui présentent des modes de reproduction différents : respectivement parthénogenèse, reproduction sexuée avec sexes séparés et reproduction sexuée avec hermaphrodisme.

Le fait que certains auteurs se basent sur les différences interspécifiques pour une caractéristique biologique ou écologique donnée pour construire des batteries de tests est justifié puisque certaines de ces caractéristiques sont impliquées dans le niveau d'exposition aux toxiques et dans les mécanismes d'effets sur les individus et les populations (Koeman, 1991 ; Escher et Hermens, 2002 ; voir aussi le paragraphe 2.1.). Ainsi, divers traits biologiques et écologiques ont déjà été utilisés comme base pour la construction de batteries de tests :

- stratégie d'histoire de vie (Sherratt *et al.*, 1999) ;
- taille (Koivisto *et al.*, 1992) ;
- degré de trophie⁷ (Stuijzand *et al.*, 1999) ;

⁷ indice qui permet de caractériser la tolérance d'un organisme à la concentration en phosphore total et en azote dans le milieu.

- nourriture et mode d'alimentation (De Haas *et al.*, 2002) ;
- niveau trophique (Canivet et Gibert, 2002) ;
- préférendum de substrat (US EPA/US ACE, 1998) ;
- habitat (Koivisto *et al.*, 1992).

Par ailleurs, l'étude *in situ* de la modification des combinaisons de traits biologiques et écologiques des taxa s'est révélée particulièrement efficace pour étudier les effets des toxiques au niveau des communautés d'invertébrés aquatiques (Charvet *et al.*, 1998 ; Usseglio-Polatera, 2000a ; Archaimbault, 2003). Par exemple, Korthals *et al.* (1998) ont montré que l'observation d'un changement de structure des communautés de nématodes est indicatrice d'une contamination du milieu par des métaux lourds. Ce principe de l'observation des changements de la structure des communautés est à la base des nombreux indices biologiques utilisés en écologie pour déterminer et suivre l'évolution de la qualité des milieux.

A partir de ces observations, Bongers *et al.* (2001) ont proposé d'utiliser plusieurs traits biologiques et écologiques qui définissent la structure des communautés de nématodes (caractère colonisateur/persistant et habitudes alimentaires) comme base pour la sélection des espèces dont ils ont étudié la réponse biologique au cuivre en laboratoire. L'avantage d'utiliser des combinaisons de traits par rapport à un trait unique pour sélectionner des espèces tests est de pouvoir tenir compte des relations de compensation entre ces traits et de leur co-évolution. En effet, chez le nématode, il existe une relation entre le caractère persistant/colonisateur de l'organisme et ce qu'il mange : les colonisateurs stricts et les persistants stricts ont un régime alimentaire très spécialisé, alors que les autres groupes de nématodes ont des régimes alimentaires plus larges. La prise en compte de cette relation entre les deux traits permet d'être plus réaliste vis-à-vis des différences biologiques et écologiques entre les espèces étudiées.

A l'issue de tests en laboratoire, Bongers *et al.* (2001) ont validé l'hypothèse que la réponse des espèces étudiées est significativement corrélée à la combinaison de ces deux traits biologiques et écologiques. Ils ont par ailleurs montré que le fait de choisir plusieurs taxa qui présentent différentes combinaisons de ces deux traits permet d'obtenir un gradient de réponse biologique au cuivre chez les espèces testées. La batterie de tests ainsi obtenue est donc au moins partiellement représentative de la gamme de sensibilité des communautés de nématodes au cuivre. De façon similaire, Koivisto *et al.* (1992) ont pu décrire partiellement la

gamme de sensibilité des cladocères au cuivre en choisissant 5 espèces pour les tests en fonction de leur habitat et de leur taille.

Ces études montrent que, dans un ordre ou dans une famille donnée, l'utilisation des combinaisons de traits biologiques et écologiques comme base pour le choix des espèces tests en laboratoire permet d'obtenir une gamme de réponse au toxique au moins partiellement représentative de la gamme de sensibilité dans la communauté étudiée.

Par ailleurs, les combinaisons de traits biologiques et écologiques permettent d'expliquer au moins partiellement la structure et le fonctionnement des communautés (Southwood, 1977, 1988 ; Townsend et Hildrew 1994, 1997 ; Usseglio-Polatera, 2000a). Or, ce sont ces propriétés qu'il faut protéger lors de l'évaluation des effets des produits chimiques.

Ainsi, l'étude des caractéristiques biologiques et écologiques des taxa constitue actuellement une des approches les plus pertinentes pour construire des batteries de tests utilisables dans le cadre de l'évaluation des effets des substances chimiques. Au cours de ce travail de thèse, nous avons donc choisi de nous baser sur la comparaison des caractéristiques biologiques et écologiques des organismes aquatiques afin de mettre au point une méthode rigoureuse de construction d'une batterie de tests.

2.3. Approches alternatives pour le calcul des valeurs seuil

Nous avons vu que les NOECs dépendent du plan d'expérience des tests de toxicité et du test statistique utilisés. Face à ces inconvénients, certains auteurs ont proposé d'abandonner la NOEC au profit d'autres types de valeurs seuil basées sur la modélisation de la courbe concentration-réponse. Dans les paragraphes suivants, nous discutons autour de ces approches alternatives pour l'évaluation des effets des substances chimiques.

2.3.1. $CE_x\%$

Les $CE_x\%$ sont calculées en réalisant une régression non linéaire sur les données du test de toxicité. Différents modèles de régression sont utilisables pour décrire les données : les plus utilisés sont les modèles logits et probits (Moore et Caux, 1997). Ces modèles permettent de linéariser une courbe sigmoïde, forme la plus classique de la courbe concentration-réponse « % effet = f (concentration) ».

D'après Pack (1993), Chapman *et al.* (1996), Crane et Newman (2000) et Isnard *et al.* (2001), les avantages des $CE_x\%$ par rapport aux NOECs sont les suivants :

- elles prennent en compte l'ensemble des résultats de la courbe de toxicité dans le calcul de la valeur seuil. Elles sont donc plus fiables que les NOECs ;
- elles ne correspondent pas une à des concentrations testées. Elles sont donc plus précises que les NOECs ;
- elles sont moins variables d'une étude à l'autre (pour une même espèce et un même produit) que les NOECs.

Par ailleurs, en étudiant 198 courbes concentration-réponse obtenues pour des toxiques et des espèces différentes, Moore et Caux (1997) ont mis en évidence que les $CE_{10\%}$ sont inférieures aux NOECs correspondantes dans 77% des cas. L'utilisation des $CE_x\%$ permet donc de réduire l'écart entre la valeur seuil pour les effets et la concentration sans effet du produit lorsque x est faible.

Le choix du modèle de régression implique de faire des hypothèses quant à la forme de la courbe concentration-réponse. Or, il n'existe aucun fondement biologique au choix du

modèle utilisé. Ainsi, le modèle utilisé est souvent choisi de façon arbitraire (De Bruijn et Van Leeuwen, 1996).

D'autre part, lorsque x est faible, la valeur de la $CE_{x\%}$ dépend beaucoup du modèle de régression utilisé (Moore et Caux, 1997 ; Isnard *et al.*, 2001) et l'incertitude autour de cette valeur augmente (Isnard *et al.*, 2001). En conséquence, afin d'obtenir des estimations de la $CE_{x\%}$ précises et concordantes d'un modèle de régression à l'autre, ce sont généralement les $CE_{50\%}$ qui sont calculées (Bonnomet, 2002). Cependant, les $CE_{50\%}$ correspondent par définition à un niveau d'effet important sur la population d'organisme testée : elles ne permettent donc pas d'estimer la concentration sans effet du toxique sur l'organisme de façon fiable. Dans ce contexte, le choix du pourcentage d'effet toléré dans le cadre de l'évaluation des effets toxiques pose question. Pouvons nous nous satisfaire d'une $CE_{50\%}$? Sinon, comment choisir entre les autres valeurs seuil proposées dans la bibliographie ($CE_{5\%}$, $CE_{10\%}$, $CE_{25\%}$) ?

Par ailleurs, une diminution de 5% de la croissance dans une population d'algue n'aura probablement pas autant d'impact sur la population qu'une mortalité de 5% dans une population de poissons (De Bruijn et Van Leeuwen, 1996). Ainsi, l'utilisation de pourcentage d'effet similaires en fonction du critère d'effet étudié (survie, croissance, ou reproduction) et de l'espèce testée ne permet pas de rendre compte de l'impact de la réponse biologique sur la population de façon fiable (*loc.cit.*).

Finalement, les $CE_{x\%}$ constituent des valeurs seuil statistiquement plus fiables que les NOECs. Cependant de nombreuses questions restent posées quant à leur utilisation dans le cadre de l'évaluation des effets des substances chimiques.

2.3.2. Concentrations sans effet

Nous avons vu que les NOECs et les $CE_{x\%}$ pour lesquelles x est grand ne permettent pas d'estimer la concentration sans effet du toxique sur l'organisme de façon fiable. Afin de répondre à ce problème, Kooijman et Bedaux (1996) ont proposé de modéliser directement cette concentration sans effets à partir des données de tests de toxicité grâce à des modèles à fondement biologique.

Cette approche permet d'éviter les problèmes statistiques inhérents à l'estimation de la NOEC : en effet, les concentrations sans effet (CSEs) ne dépendent pas de la gamme de concentration testée et elles sont accompagnées d'un intervalle de confiance.

Par ailleurs, ces CSEs sont calculées à partir des concentrations externes en toxique grâce à un modèle qui prend en compte la cinétique du composé. Elles sont donc indépendantes de la durée de l'essai. En conséquence, l'exposition des organismes à des concentrations inférieures à la CSE pendant des durées plus longues que la durée du test ayant servi à calibrer le modèle n'entraînera pas d'effet sur l'organisme (Kooijman et Bedaux, 1996). Ceci constitue le principal avantage de la CSE par rapport à la $CE_{x\%}$.

Du fait de ces propriétés, les CSEs sont plus fiables et plus facilement comparables entre elles d'une expérience à l'autre (pour une même espèce) ainsi que d'une espèce à l'autre, que les NOECs et les $CE_{x\%}$ (Cardoso *et al.*, 2001).

Ainsi, dans le cadre de la thèse, nous avons choisi d'analyser les données issues des tests de toxicité grâce à des modèles d'effets à fondement biologique, qui permettent de déterminer des concentrations sans effet sur les individus.

2.3.3. Concentration sans effet au niveau de la population

Comme les NOECs et les $CE_{x\%}$, les CSEs dépendent du critère d'effet étudié lors du test de toxicité. En effet, de nombreux critères d'effets sont utilisés en écotoxicologie. Par exemple, la toxicité au stade embryo-larvaire chez le poisson peut être évaluée d'après le poids ou la taille de l'embryon, la présence d'œdèmes, d'hémorragies, de malformations, etc. (Frayse *et al.*, 2005). Ces critères se caractérisent par une sensibilité et une variabilité propres (Forbes et Calow, 1999), si bien que le choix du critère d'effet conditionne la mesure de la réponse biologique.

Dans le cadre de l'évaluation des effets des substances chimiques, il est recommandé d'étudier le critère d'effet le plus sensible parmi les différents paramètres du cycle de vie de l'espèce étudiée (survie, croissance et reproduction) (ECB, 2003). Cependant, ce paramètre varie selon l'espèce et le toxique étudié. Par ailleurs, les concentrations sans effet mesurées sur le trait d'histoire de vie le plus sensible ne reflètent pas directement la vulnérabilité de l'espèce au toxique (Kammenga *et al.*, 1996). En effet, l'importance relative des paramètres

biodémographiques (taux de survie, de croissance et de reproduction) dans la dynamique de population varie selon les espèces en fonction de leur stratégie d'histoire de vie. Dans ce contexte, les paramètres biodémographiques les plus affectés par le polluant au niveau individuel ne sont pas forcément ceux qui auront beaucoup d'impact en terme de dynamique de population pour une espèce donnée.

Afin d'évaluer la réponse biologique d'une espèce à un toxique de façon plus fiable que par les méthodes existantes, il faut donc prendre en compte, d'après Kammenga *et al*, (1996):

- l'ensemble des effets observés sur les traits d'histoire de vie individuels ;
- les relations entre ces traits, décrites par la stratégie d'histoire de vie des organismes.

L'ensemble de ces informations doit pouvoir être intégré en un seul paramètre d'effet commun, défini à un niveau d'organisation biologique supérieur à l'individu (Jager *et al.*, 2004).

L'étude des effets toxiques à l'échelle des populations permet de répondre à toutes ces exigences. Par ailleurs, il est généralement admis que la population constitue le niveau d'organisation biologique qui permet d'obtenir la mesure la plus pertinente de l'impact écologique d'un polluant (Forbes et Calow, 2001). Ainsi, dans le cadre de notre travail, nous avons choisi d'étudier la réponse biologique des organismes au niveau des populations plutôt qu'au niveau des individus.

I.3. PROBLEMATIQUE

La question posée dans cette thèse est la suivante : pouvons-nous améliorer la pertinence des méthodes actuelles d'évaluation des effets toxiques en utilisant les connaissances disponibles sur les traits biologiques et écologiques des taxa et la dynamique de population afin de mieux sélectionner la batterie de tests et d'accroître la pertinence des valeurs seuil issues des bioessais réalisés au laboratoire ?

Dans ce contexte, nous avons étudié les effets d'un toxique de référence sur les communautés d'invertébrés benthiques rencontrées en zone aval de cours d'eau ou de lac.

Nous avons choisi d'étudier les communautés inféodées au sédiment car :

- les produits chimiques introduits dans les eaux de surface à l'état de traces s'accumulent dans les sédiments, où ils se retrouvent parfois à des concentrations élevées ;

- les sédiments servant d'habitat et de source de nourriture à une vaste gamme d'organismes benthiques et épibenthiques, l'accumulation de substances toxiques dans ce compartiment constitue un risque pour ces organismes ;

- ces organismes sont impliqués dans le cycle des éléments biogéochimiques, les processus naturels d'épuration des rivières et servent de source de nourriture aux poissons. En conséquence, une altération du fonctionnement des communautés benthiques représente une menace pour la santé des écosystèmes aquatiques, donc un danger pour les produits de la pêche et, *de facto*, une menace potentielle pour la santé humaine.

Nous nous sommes focalisés sur les sédiments fins observés en zone lenticles, telles que l'aval des cours d'eau et les lacs, car ce sont principalement dans ces milieux que les substances chimiques s'accumulent dans le substrat.

I.4. DEMARCHE SCIENTIFIQUE

Dans le cadre de l'évaluation des effets des substances chimiques, le niveau d'organisation biologique que l'écotoxicologue cherche à préserver correspond à une communauté qui vit dans un milieu donné. La complexité des communautés vivantes ainsi que de leur milieu de vie en termes de diversité et de fonctionnement sont telles qu'il est difficile de les appréhender complètement. Afin d'évaluer les effets des substances chimiques sur les communautés naturelles, il est donc nécessaire de représenter de façon très simplifiée à la fois la structure et le fonctionnement de la communauté ainsi que les propriétés de l'habitat. Cette simplification implique des changements d'échelle biologique (de la communauté à un niveau d'organisation biologique plus simple), ainsi qu'un changement de milieu (du terrain au laboratoire).

Lors de cette thèse, nous avons pris comme exemple l'étude des effets du zinc sur une communauté de macroinvertébrés benthiques de zone aval de cours d'eau ou de lac, observable sur le terrain en Europe de l'Ouest. La figure 1 présente la démarche que nous avons utilisée afin de simplifier la représentation de cette communauté, puis d'évaluer les effets du zinc sur les populations d'espèces qui la compose.

Nous avons tout d'abord cherché à obtenir une représentation simplifiée de la communauté naturelle. Ainsi, nous avons défini une communauté théorique qui permette de représenter au laboratoire la structure et le fonctionnement de la communauté naturelle.

En second lieu, nous représenté la communauté théorique par une sélection de quelques espèces dont les traits biologiques et écologiques peuvent expliquer son fonctionnement. Cette approche rejoint celle de Attrill et Depledge (1997), qui suggèrent que l'évolution du fonctionnement de la communauté peut être suivie de façon efficace en étudiant la dynamique de la population de quelques espèces « sentinelles ».

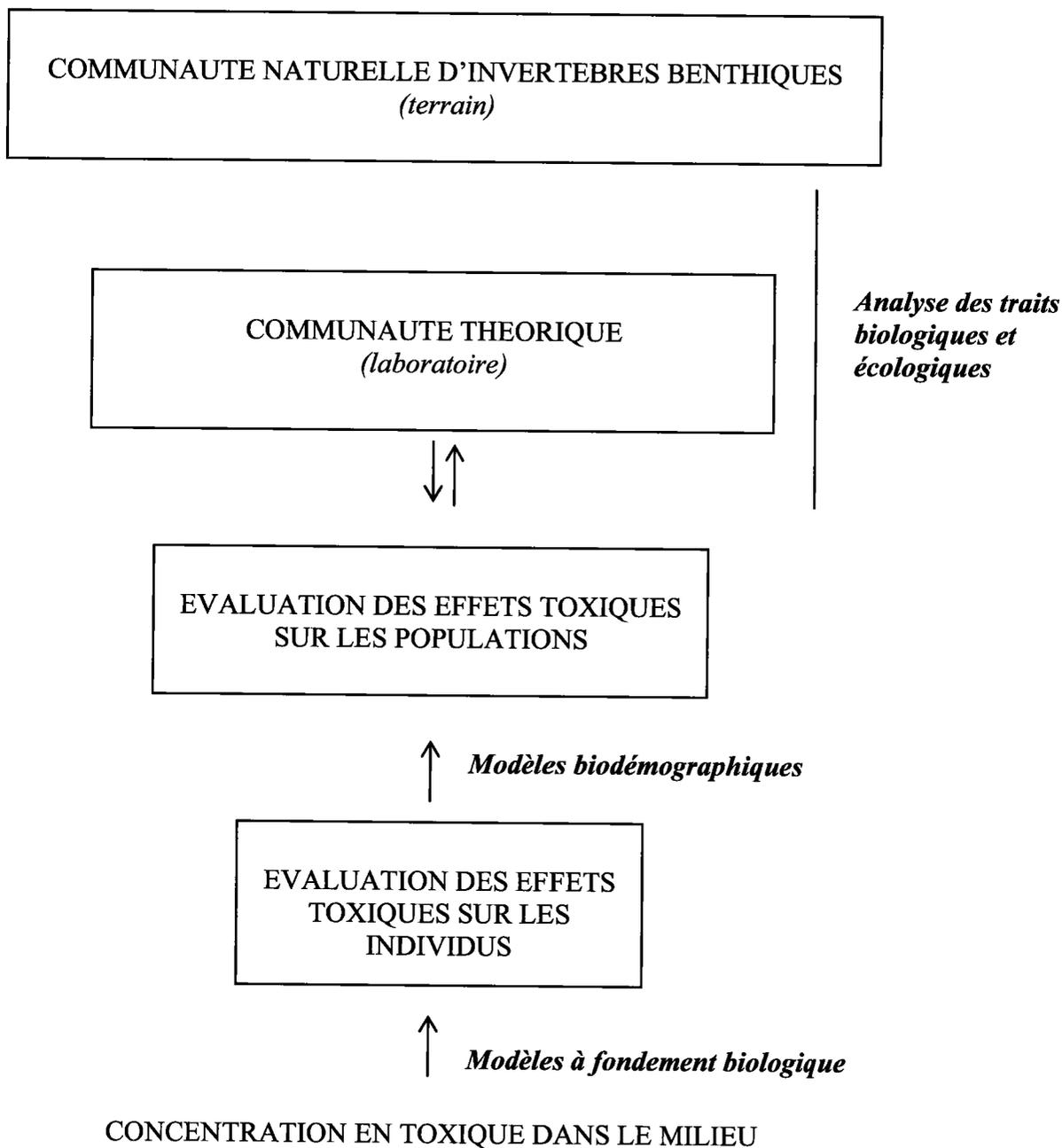


Figure 1. Niveaux d'organisation biologique étudiés et outils utilisés pour réaliser le changement d'échelle entre ces niveaux.

En dernier lieu, nous avons évalué les effets du zinc sur les espèces composant la batterie de tests. Dès lors se pose le problème de la mesure de la sensibilité des organismes vivants. En effet, nous avons vu aux paragraphes 2.1.4. et 3.3.3. que :

- la mesure de la réponse biologique varie selon l'échelle à laquelle nous l'étudions, de la cellule à la population ;

- le niveau de mesure le plus pertinent du point de vue écologique est la population, car c'est le niveau d'organisation dont la complexité se rapproche le plus de celle de la communauté.

Cependant, pour des raisons pratiques, il est impossible d'étudier expérimentalement les effets de substances chimiques en laboratoire sur une population aquatique. Là encore, nous avons donc dû opérer un changement d'échelle biologique. Les tests de toxicité en laboratoire ont été réalisés au niveau de l'individu. Les données issues de ces tests ont été interprétées avec des modèles permettant :

- de faire le lien entre la concentration en zinc dans le milieu et dans la cellule ;
- de prédire les effets sur la survie, la croissance et la reproduction des individus à partir des concentrations internes.

Les effets observés au niveau individuel ont ensuite servi de base à la prédiction des effets attendus au niveau de la population. Cette extrapolation a été réalisée en couplant les modèles d'effets sur les individus, qui permettent de décrire comment les paramètres de la matrice sont affectés en fonction de la concentration en toxique dans le milieu, avec des modèles biodémographiques qui permettent de décrire la dynamique de population des espèces.

Chacun de ces changements d'échelle repose sur l'utilisation des traits biologiques et écologiques. En effet, le changement d'échelle de la communauté naturelle à la communauté théorique a été réalisé en exploitant les relations statistiques qui existent entre les traits biologiques et écologiques des espèces et les propriétés (structure et fonctionnement) d'une communauté dans une zone typologique⁸ donnée.

L'évaluation des effets du zinc au niveau de l'individu repose sur des modèles mécanistiques basés sur l'hypothèse que les traits biologiques et écologiques déterminent à la fois le niveau d'exposition, les capacités d'absorption et la sensibilité des espèces aux toxiques. L'évaluation des effets attendus sur la population à partir des effets observés sur les individus repose sur des modèles biodémographiques basés sur l'étude du cycle de vie des organismes. La relation entre les caractéristiques biologiques et écologiques des espèces d'invertébrés benthiques et leur réponse aux toxiques est donc le concept porteur de ce travail de thèse. La modélisation mécanistique est l'outil privilégié dans le cadre de ce travail.

⁸ Zonation piscicole proposée par Huet (1949), basée sur l'étude de la largeur, de la profondeur et de la pente du cours d'eau.

I.5. ORGANISATION DU MANUSCRIT

Les connaissances fondamentales et les hypothèses biologiques qui soutiennent notre approche, ainsi que le matériel et les méthodes utilisés, sont présentées de manière progressive au fil des changements d'échelle successivement réalisés au cours de la thèse

Le chapitre I nous a permis de présenter le contexte de l'étude, de définir la problématique ainsi que la démarche scientifique adoptée en vue de répondre à cette problématique.

Le chapitre II expose la méthode que nous avons utilisée afin de représenter le fonctionnement d'une communauté benthique naturelle par une batterie d'espèces tests. Cette méthode est notamment basée sur la répartition des taxa qui composent la communauté au sein de groupes fonctionnels (groupes qui rassemblent des taxa sur la base de la similarité de leurs combinaisons de traits biologiques et écologiques). Nous exposons par ailleurs, la biologie et l'écologie des taxa composant notre batterie, pour la plupart mal connus en écotoxicologie. En dernier lieu, nous discutons de la représentativité des taxa que nous avons sélectionné par rapport aux caractéristiques biologiques et écologiques de leur groupe fonctionnel.

Le chapitre III présente le matériel et les méthodes utilisés pour le prélèvement, l'acclimatation et l'élevage des espèces dont nous ne disposions pas en routine au laboratoire avant le début de ce travail. Il précise les conditions expérimentales des bioessais réalisés durant la thèse. Il expose le matériel et les méthodes (bioessais et modèles) utilisés pour caractériser le cycle de vie de chacune des espèces étudiées dans ces conditions expérimentales. En dernier lieu, nous présentons une description détaillée des caractéristiques du cycle de vie et des modèles associés pour chacune des espèces étudiées, ainsi qu'une synthèse comparative des paramètres du cycle de vie impliqués dans la dynamique de population des ces espèces.

A l'issue de ce chapitre nous connaissons le cycle de vie au laboratoire des organismes en conditions témoin, et nous sommes capables de le modéliser.

Le chapitre IV explique pourquoi nous avons choisi le zinc comme toxique de référence et donne des informations sommaires sur son mode d'action. Par ailleurs, ce chapitre présente le matériel et les méthodes relatifs aux bioessais réalisés afin de caractériser les effets du zinc sur chacune des espèces étudiées au zinc, ainsi que les modèles d'effets utilisés pour interpréter les données obtenues au niveau individuel. Nous proposons ensuite une étude comparative de la cinétique et des effets du zinc sur la survie, la croissance et la reproduction des différentes espèces étudiées.

A l'issue de ce chapitre, nous disposons donc de concentrations sans effet du zinc sur chacun des paramètres du cycle de vie pour chacune des espèces étudiées, ainsi que de modèles qui permettent de relier les effets attendus sur la survie, la croissance et la reproduction des organismes à la concentration en zinc dans le sédiment.

Le chapitre V présente la méthode que nous avons utilisé pour déduire les effets du zinc sur les populations de chacune des espèces étudiées, à partir des effets modélisés au niveau des individus. Nous proposons par ailleurs une comparaison de la sensibilité au zinc des populations étudiées.

A l'issue de ce chapitre, nous sommes capables de fournir des concentrations en zinc sans effet sur les populations de chacune des espèces étudiées. Nous en déduisons une concentration sans effet sur la communauté d'invertébrés benthiques de zone avale de cours d'eau et de lacs.

Le chapitre VI a pour objectif de replacer les méthodes utilisées ainsi que les résultats obtenus dans le contexte de l'évaluation des effets des substances chimiques.

Dans ce chapitre, nous discutons aussi de la pertinence écologique de notre batterie de tests ainsi que de sa représentativité par rapport à la gamme de sensibilité au zinc (évaluée au laboratoire et sur le terrain) des invertébrés benthiques.

Nous y abordons en outre les avantages, les limites et les améliorations possibles des outils que nous avons mis au point et/ou utilisés pour réaliser les différents changements d'échelle (de la concentration en zinc dans le sédiment aux effets sur la population des espèces qui représentent la communauté benthique).

Nous concluons sur une synthèse de nos résultats ainsi que sur nos perspectives.

CHAPITRE II

CONSTRUCTION D'UNE BATTERIE D'INVERTEBRES BENTHIQUES BASEE SUR L'ETUDE DES TRAITS BIOLOGIQUES ET ECOLOGIQUES

Nous avons vu au chapitre I que le but des méthodes d'évaluation des effets des substances chimiques est de préserver la structure et le fonctionnement de la communauté exposée au contaminant étudié. Ceci est actuellement réalisé en utilisant une batterie d'espèces choisies sur des critères de sensibilité potentielle aux toxiques et de taxonomie.

Nous avons montré les limites de ces critères, et nous avons vu que l'étude des traits biologiques et écologiques des organismes est un moyen alternatif pertinent pour sélectionner des espèces dont la réponse aux toxiques soit au moins partiellement représentative de la gamme de réponses biologiques dans une communauté donnée. Dans ce contexte, nous avons vu que la construction de batteries basées sur l'étude des traits se fait généralement à partir de un ou deux traits seulement et qu'il n'existe actuellement pas de méthode rigoureuse qui permette de prendre en compte plus de deux traits pour le choix des espèces tests.

Dans ce chapitre, nous proposons d'utiliser les combinaisons de 11 traits biologiques et 9 traits écologiques comme base pour construire une batterie d'espèces tests représentative du fonctionnement des communautés naturelles. Cette démarche est appliquée aux invertébrés inféodés aux sédiments de zones aval des cours d'eau et de lacs en Europe de l'Ouest.

1. TRAITS BIOLOGIQUES & ECOLOGIQUES ET DIVERSITE FONCTIONNELLE DES COMMUNAUTES

1.1. Définitions

On appelle traits biologiques et écologiques l'ensemble des informations qualitatives et quantitatives associées à la biologie et à l'écologie des organismes. Ces traits correspondent à une adaptation des organismes aux propriétés biotiques et abiotiques de leur habitat, ainsi qu'à sa variabilité spatiale et temporelle (Townsend et Hildrew, 1994). Dans une communauté aquatique, la gamme de traits observée dépend donc de la mosaïque d'habitats composant l'écosystème.

La diversité fonctionnelle d'une communauté peut être définie à partir de l'ensemble des combinaisons de traits rencontrées dans la communauté (Usseglio-Polatera *et al.*, 2000a) et impliquées dans la modification des propriétés biotiques et abiotiques de l'habitat (Gerino, *et al.*, 2003). Les modifications du milieu par les invertébrés benthiques concernent principalement les propriétés du substrat (*via* leur comportement d'enfouissement et de bioturbation) et le recyclage de la matière organique (*via* leur activité trophique). A partir de ces deux critères, les invertébrés benthiques peuvent être classés en différents groupes (*e.g.* nageur, benthique, épibenthique, etc., pour la relation au substrat ; filtreurs, détritivores, racleurs, brouteurs, etc., pour l'activité trophique). Ces groupes d'espèces ayant un rôle ou un comportement similaire pour un processus écologique donné, indépendamment de leur appartenance taxonomique, sont dits « groupes fonctionnels » (Grime, 1979). La répartition des espèces au sein des groupes fonctionnels dépend directement de leurs traits biologiques et écologiques. Ces groupes rassemblent donc les taxa qui présentent les combinaisons de traits les plus similaires (Usseglio-Polatera *et al.*, 2000a). Concrètement, la diversité fonctionnelle représente donc une traduction numérique de la diversité des traits biologiques et écologiques observés dans la communauté. Son étude se base sur la répartition des organismes de la communauté en groupes fonctionnels.

1.2. Pourquoi utiliser les traits biologiques et écologiques comme critère de sélection des organismes composant une batterie de tests ?

Nous avons vu au chapitre I que les traits biologiques et écologiques influencent le niveau d'exposition et les voies d'absorption du toxique par les organismes, ainsi que leur réponse aux contaminants. Ainsi, ces traits déterminent au moins partiellement la réponse biologique des espèces au niveau individuel et populationnel (Vaal *et al.*, 1997a, 1997b, 2000 ; Wogram et Liess, 2001 ; Escher et Hermens, 2002). L'étude des traits biologiques et écologiques constitue donc un moyen pertinent pour obtenir une batterie de tests qui soit au moins partiellement représentative de la gamme de sensibilité des organismes composant cette communauté.

Par ailleurs, les caractéristiques biologiques et écologiques ont servi de base de réflexion pour de nombreux concepts écologiques visant à décrire la structure et le fonctionnement des communautés naturelles.

Tout d'abord, Vannote *et al.* (1980) ont tenté de décrire de façon simple le fonctionnement d'un cours d'eau : ce dernier est considéré comme une mosaïque d'habitats offrant un continuum de conditions physiques, chimiques et hydrauliques auquel correspond un continuum des propriétés biotiques des communautés autochtones (« river continuum concept »).

Southwood (1988) propose alors l'hypothèse que ce sont les propriétés abiotiques de l'habitat qui déterminent la valeur des traits biologiques et écologiques des organismes inféodés à cet habitat et guident l'évolution de la valeur de ces traits.

En 1994, la « river habitat templet theory » (Townsend et Hildrew) fait le lien entre la variabilité spatio-temporelle d'un habitat et les caractéristiques biologiques et écologiques du peuplement autochtone : la variabilité environnementale, et plus particulièrement la fréquence et l'intensité des perturbations sont considérées comme les facteurs majoritairement responsables de la structure et du fonctionnement des communautés. Cette théorie reliant les traits d'histoire de vie des espèces aux gradients de la variabilité environnementale a été testée (Resh, *et al.*, 1994 ; Townsend *et al.*, 1997) et appliquée par de nombreux auteurs pour l'étude de différentes communautés (voir Bornette *et al.* (1994) pour les communautés de macrophytes, Bournaud (1994) pour les communautés d'oiseaux, Usseglio-Polatera (1994) et Statzner *et al.*, (1997) pour les communautés d'Insectes, Richoux (1994) pour les

communautés de Coléoptères, et Usseglio-Polatera et Tachet (1994) pour les communautés de Plécoptères et d'Ephéméroptères).

Ces études ont permis de mettre en évidence deux résultats importants.

Premièrement, les traits biologiques et écologiques des organismes permettent de représenter la structure taxonomique et le fonctionnement d'une communauté dans un habitat donné (Usseglio-Polatera *et al.*, 2000a).

Deuxièmement, les combinaisons de traits biologiques et écologiques répondent aux perturbations du milieu, dont la pollution fait partie (Charvet *et al.*, 1998 ; Usseglio-Polatera *et al.*, 2000a ; Archaimbault, 2003). Au cours de la thèse, nous supposons donc que la sélection d'organismes sur la base de leurs combinaisons de traits permet probablement d'isoler une palette de taxa représentative de la structure et du fonctionnement d'une communauté dans un habitat donné, ainsi que de la gamme de sensibilité des organismes composant cette communauté.

2. CONSTRUCTION D'UNE BATTERIE D'INVERTEBRES BENTHIQUES : DEMARCHE & OUTILS

Le but de notre démarche de construction de batteries de tests est de représenter la typologie de traits biologiques et écologiques rencontrés dans une communauté naturelle grâce à quelques taxa. Cette représentation nécessite deux étapes. Premièrement, les taxa appartenant à la communauté sont regroupés sur la base de la similarité de leurs combinaisons de traits biologiques et écologiques. Dans un second temps, et pour chaque groupe obtenu, une seule espèce est sélectionnée afin de représenter les caractéristiques moyennes de son groupe. L'ensemble des espèces retenues constitue alors la batterie de tests. La typologie de traits biologiques et écologiques caractérisant la communauté est donc schématisée par les caractéristiques biologiques et écologiques des espèces formant cette batterie.

2.1. Support et caractérisation de l'information biologique et écologique utilisée

Différentes bases de données correspondant à différentes zones biogéographiques⁹ mondiales ou, pour une même zone, à différents niveaux de précision taxonomique, sont actuellement en développement. Les caractéristiques biologiques et écologiques des espèces aquatiques ont été obtenues à partir de la base proposée par Usseglio-Polatera (1994) et enrichie par Tachet *et al.* (2000) car :

- elle contient une grande quantité d'information. Elle rassemble en effet des données relatives à 22 variables biologiques et écologiques pour 479 taxa observables en Europe de l'Ouest (zones biogéographiques 2, 4, 8 et 13a et 13b définies par Illies et Botosaneanu (1963)).
- cette information est pertinente par rapport à nos objectifs. En effet, la combinaison de 9 des 11 traits écologiques renseignés dans cette base permet de décrire de façon pertinente les relations entre les traits biologiques et écologiques des taxa et les caractéristiques de leur habitat (Resh *et al.*, (1994) ; Usseglio-Polatera, 1994). Par

⁹ unité d'espace dont la limite repose sur des critères de climat, de présence et de répartition des espèces animales et végétales

ailleurs, chacun des 11 traits biologiques étudiés est en lien avec la réponse biologique des organismes aux toxiques.

Les traits biologiques étudiés sont présentés dans le tableau I. Ils décrivent :

- l'histoire de vie des taxa (taille maximale, durée du cycle de vie, nombre de générations par an, stades aquatiques durant le cycle de vie) ;
- les capacités de résilience du taxon (formes de résistance, capacité et mode de dispersion) ;
- les caractéristiques liées à l'exposition du taxon, définie par son comportement dans le milieu (mode de reproduction, mode d'alimentation, type de nourriture ingérée, mode de locomotion et relation au substrat) et son anatomie (mode de respiration).

Les traits écologiques étudiés (présentés dans le tableau II) décrivent la distribution longitudinale et altitudinale des taxa, leurs degrés de trophie et de saprobie¹⁰, leurs préférences de salinité, de température, de vitesse de courant et de substrat.

Chacun des traits étudiés se décline en différentes modalités. Une modalité correspond à une classe de la variable « trait » (e.g. broyeur, filtreur, détritivore, etc., pour la variable « mode d'alimentation »). Les modalités des traits sont présentées dans les tableaux I et II.

L'affinité du taxon pour chacune des modalités du trait étudié est codée sous la forme d'une note. Les notes attribuées aux taxa dans la base de données ont été publiées par Tachet *et al.* (2000), référence communément utilisée en écologie (Usseglio-Polatera *et al.*, 2000b). Elles ne sont donc pas précisées dans ce manuscrit.

Ces notes sont comprises entre 0 (représentant l'absence d'affinité du taxon pour la modalité) et 5 (représentant une forte affinité). Un calcul simple permet d'obtenir les fréquences relatives de chaque modalité pour le trait et le taxon étudié, sachant que la somme des fréquences relatives des notes d'affinité pour un trait est égale à 1. Un exemple de calcul est fourni au tableau III. Le profil de tolérance du taxon pour les différentes modalités du trait est représenté par la distribution des fréquences relatives des notes d'affinité du taxon pour les différentes modalités du trait.

¹⁰ indice qui permet de caractériser la tolérance d'un organisme à la quantité d'oxygène dissout

Tableau I. Modalités et poids statistique des traits biologiques étudiés.

Le principe des pondérations de modalités est présenté au paragraphe 2.2.2. Les modalités pondérées « 0 » ne sont pas caractéristiques des taxa inféodés au sédiment de zone aval de cours d'eau. Les modalités pondérées « 1 » ne représentent ni un avantage ni un désavantage sélectif pour les organismes benthiques. Les modalités pondérées « 2 » correspondent à des exigences biologiques strictes pour les invertébrés benthiques. Chaque pondération est justifiée en bas de page.

Trait biologique	Code de la modalité	Poids et nature de la modalité	Trait biologique	Code de la modalité	Poids et nature de la modalité
Taille maximale (mm)	1	1. <5	Mode de reproduction	1	1. ovoviviparité + soins aux jeunes
	2	1. 5 - 10		2	1. œufs isolés, libres
	3	1. 10 - 20		3	1. œufs isolés, fixés
	4	1. 20 - 40		4	1. pontes cimentées ou fixées
	5	1. 40 - 80		5	1. pontes libres
	6	1. >80		6	1. pontes endophytiques ou terrestres
				7	1. reproduction asexuée
Durée du cycle de vie	1	1. ≤ 1 an		1	2. sédiments fins et micro-organismes,
	2	1. ≥ 1an		2	2. débris < 1mm
Nombre de générations / an	1	1. <1	Type de nourriture ²	3	1. débris végétaux > 1mm
	2	1. 1		4	1. microphytes vivants
	3	1. >1		5	1. macrophytes vivants
Stades aquatiques	1	1. oeuf		6	1. animaux morts > 1mm
	2	1. larve		7	0. invertébrés vivants
	3	1. nymphe		8	0. vertébrés
	4	1. adulte			
Respiration	1	2. tégument	Mode d'alimentation ²	1	1. absorption tégumentaire et
	2	2. branchies		2	mangeur de sédiments fins
	3	0. respiration aérienne		3	1. broyeur
Dispersion	1	1. aquatique passive		4	1. racleur/broueur
	2	1. aquatique active		5	1. filtreur
	3	1. aérienne passive		6	0. perceur/prédateur/ parasite
	4	1. aérienne active			
Température ¹		0. psychrophile (<15°C)	Formes de résistance	1	1.œufs/gemmules/statoblastes
	1	1. thermophile (>15°C)		2	1.cocons
	2	1. euritherme		3	1. diapause ou dormance
	3			4	1. aucune

¹. Les organismes retrouvés dans les zones aval de cours d'eau sont généralement tolérants à des températures relativement élevées.

². Nous désirons éviter de travailler avec des organismes se nourrissant de matière vivante, pour des questions de contrôle de la quantité et de la qualité de la nourriture apportée dans le milieu d'essai

Tableau II. Modalités et poids statistique des traits écologiques étudiés.

Le principe des pondérations de modalités est présenté au paragraphe 2.2.2. Les modalités pondérées « 0 » ne sont pas caractéristiques des taxa inféodés au sédiment de zone aval de cours d'eau. Les modalités pondérées « 1 » ne représentent ni un avantage ni un désavantage sélectif pour les organismes benthiques. Les modalités pondérées « 2 » correspondent à des exigences biologiques strictes pour les invertébrés benthiques. Chaque pondération est justifiée en bas de page.

Trait écologique	Code de la modalité	Poids et nature de la modalité	Trait écologique	Code de la modalité	Poids et nature de la modalité
Distribution longitudinale ¹	1	0. crénon	Mode de locomotion et relation au substrat ²	1	0. nageur
	2	0. épirhithron			
	3	1. métarhithron			
	4	1. hyporhithron			
	5	2. épipotamon			
	6	2. métapotamon			
	7	0. estuaire			
	8	1. hors hydrosystème fluvial			
Température ²	1	0. psychrophile (<15 °C)	Degré de saprobie ²	1	0. xénosaprobe
	2	1. thermophile (>15°C)			
	3	1. eurytherme			
Salinité ²	1	1. eau douce	4	5	2. alpha mésosaprobe
	2	0. eau saumâtre			
Altitude ²	1	1. plaine + collinéen (<1000m)	Préferendum de substrat ²	1	0. dalles, blocs, pierres, galets
	2	0. montagnard (<1000-2000m)			
	3	0. alpin (>2000m)			
Courant ²	1	1. nul	6	7	0. macrophytes, algues filamenteuses
	2	1. lent (<25 cm/s)			
	3	0. modéré (25-50 cm/s)			
	4	0. rapide (50 cm/s)			
Degré de trophie ²	1	0. oligotrophe	8	9	0. litière
	2	1. mésotrophe			
	3	1. eutrophe			
					1. vase

¹. Le crénon et l'épirhithron sont éliminés car ces habitats sont situés dans la zone tout à fait amont du cours d'eau. L'estuaire est éliminé du fait de ses particularités physico-chimiques (e.g. salinité).

². Les modalités éliminées correspondent à des caractéristiques abiotiques qui ne sont généralement pas observées dans les zones aval de cours d'eau.

Tableau III. Exemple de note d'affinité pour les modalités du trait « preferendum de substrat » chez *Corbicula fluminea* (d'après Tachet et al., 2000) et de calcul du profil de tolérance

<i>Modalité du trait</i>	<i>Note d'affinité de C. fluminea à la modalité</i>	<i>Fréquence relatives des modalités¹ (%)</i>
macrophytes	0	0
microphytes	0	0
racines	0	0
litière	0	0
blocs/pierres/cailloux	1	7,7
gravier	2	15,4
limon	2	15,4
vase	3	23,1
sable	5	38,5

¹ F = note pour la modalité étudiée × 100 / somme des notes d'affinité

Ce système de codage, dit « codage flou », est détaillé dans Chevenet *et al.* (1994) et a été validé par de nombreuses études (voir le volume 31 du journal *Freshwater Biology*, 1994). Ce système permet de s'affranchir de l'attribution obligatoire d'une seule modalité du trait à un taxon, méthode menant à une caractérisation imprécise des profils biologiques et écologiques des taxa (Chevenet *et al.*, 1994). L'analyse de la distribution des notes d'affinité du taxon aux modalités du trait pour chaque trait étudié permet donc de caractériser les taxa par un profil bio/écologique réaliste (Castella et Speight, 1996).

2.2. Définition d'une communauté benthique théorique

Nous avons choisi de nous restreindre à l'étude des communautés benthiques inféodées aux sédiments de zone aval de cours d'eau. Or, la base de donnée regroupe des informations pour une grande variété de taxa, inféodés aux différents types d'habitats rencontrés dans les cours d'eau Ouest-européens. La première étape du travail consiste donc à éliminer de la matrice de données tous les taxa qui ne sont ni benthiques, ni épibenthiques. Ces éliminations peuvent être réalisées sur la base des relations entre les taxa et les propriétés

abiotiques des différents types d'habitats aquatiques (Usseglio-Polatera, Comm. Pers.). Les espèces conservées constituent alors une communauté benthique théorique.

2.2.1. Fondements théoriques

La construction de la communauté théorique est basée sur l'étude des relations entre les combinaisons de traits biologiques et écologiques des taxa et les propriétés abiotiques des différents types d'habitats aquatiques. Le raisonnement utilisé est le suivant. Un cours d'eau peut être grossièrement divisé en habitats de faciès lotiques et lentiques. Les caractéristiques de l'habitat (en particulier le régime de perturbation : fréquence, rudesse et prévisibilité des événements) varient selon le faciès du cours d'eau (Townsend et Hildrew, 1994). Ces caractéristiques correspondent à des pressions évolutives qui définissent et modifient les combinaisons des traits observées chez les organismes aquatiques (*loc.cit.*).

Les traits biologiques et écologiques des espèces étant liés aux caractéristiques de leur habitat, il est possible de trier les taxa présents dans la base de données en fonction de leur habitat en se basant sur leurs combinaisons de traits biologiques et écologiques.

Pour ce faire, nous avons défini une combinaison théorique de traits (sur la base de données bibliographiques), qui dresse l'inventaire des modalités habituellement observées chez les taxa inféodés aux sédiments de zone avale de cours d'eau. Les taxa de la base de données n'ayant pas ou peu d'affinité pour les modalités décrites par cette combinaison théorique de traits sont identifiés, puis exclus de la communauté benthique théorique.

2.2.2. Méthode

Afin de construire la combinaison théorique de traits, les informations biologiques et écologiques issues de la littérature sont transposées en valeurs numériques. Cette transposition est réalisée en pondérant les modalités des traits en fonction des exigences biologiques et écologiques des taxa.

Un poids de 0 est affecté aux modalités ne correspondant pas aux caractéristiques biologiques et écologiques des organismes benthiques (*e.g.* modalité « nageur » pour la variable « locomotion »). Ces modalités sont donc rejetées de la combinaison théorique de traits.

Un poids de 2 est affecté aux modalités correspondant à des exigences biologiques et écologiques strictes pour les invertébrés benthiques (e.g. modalités « épibenthique » et « benthique » pour la variable « locomotion »). Ces modalités ont donc une forte contribution dans la combinaison théorique de traits.

Un poids de 1 est affecté aux modalités neutres, qui ne représentent ni un avantage ni un désavantage sélectif pour les organismes benthiques (e.g. « rampant » pour la variable « locomotion »). Ces modalités ont ainsi une faible contribution à la combinaison théorique de traits, sans être toutefois rejetées.

Cette pondération assure une relative souplesse concernant la contribution des variables biologiques et écologiques à la combinaison théorique de traits, et améliore ainsi le réalisme de cette combinaison théorique par rapport aux contraintes abiotiques s'exerçant *in situ* sur les organismes. Les poids que nous avons affecté à chaque modalité de chaque variable sont présentés dans les tableaux II.1 et II.2.

Ces pondérations effectuées, les taxa présents dans la base de donnée sont successivement acceptés ou rejetés de la communauté théorique en comparant leur combinaison de traits à la combinaison théorique.

Cette étape nécessite le calcul, pour chaque taxon et chaque trait, du rapport (R) entre :

- la somme pondérée (S) des notes d'affinité pour les modalités ayant un poids de 1 ou 2,
- et la somme de S et des notes d'affinités pour les modalités ayant un poids de 0.

Un exemple de calcul est fourni au tableau IV.

Le paramètre R constitue ainsi une mesure de la fréquence des modalités correspondant à la combinaison théorique pour le taxon et le trait étudié. R varie entre 0 (les caractéristiques du taxon pour le trait étudié ne correspondent pas du tout à celles d'un invertébré vivant dans le sédiment) et 1 (les caractéristiques du taxon pour le trait étudié correspondent parfaitement à celles d'un invertébré vivant dans le sédiment).

Nous calculons ensuite la moyenne des valeurs de R précédemment obtenues pour chaque taxon. Cette moyenne constitue une mesure de l'affinité globale du taxon à la combinaison théorique de traits. Cette procédure est réalisée de façon indépendante pour les traits biologiques et les traits écologiques.

Les taxa présentant une valeur moyenne de R supérieure à 0,5 pour les traits biologiques et les traits écologiques sont inclus dans la communauté benthique théorique. Ceci implique que

seuls les taxa dont la combinaison de traits présente au moins 50% d'homogénéité à la combinaison théorique sont acceptés dans notre communauté benthique théorique. La valeur de R a été fixée à 0,5 dans l'optique d'un compromis entre le nombre de taxa composant la communauté théorique (*i.e.* diversité fonctionnelle de la communauté) et la représentativité des taxa inclus dans cette communauté par rapport aux traits théoriques des macroinvertébrés benthiques.

Tableau IV. Exemple de calcul de la fréquence des modalités du trait « *preferendum de substrat* » correspondant à la combinaison théorique pour *Corbicula fluminea*

<i>Modalité du trait</i>	<i>Note d'affinité de C. fluminea pour la modalité</i>	<i>Poids de la modalité</i>
macrophytes	0	0
microphytes	0	0
racines	0	0
litière	0	0
blocs/pierres/cailloux	1	0
gravier	2	0
limon	2	2
vase	3	1
sable	5	2

$$R = \frac{2 \times 2 + 3 \times 1 + 5 \times 2}{2 \times 2 + 3 \times 1 + 5 \times 2 + 1 + 2} = 0,85$$

2.3. Typologie des traits biologiques et écologiques rencontrés dans cette communauté : construction des groupes fonctionnels.

2.3.1. Fondements théoriques

L'étude de la typologie des traits biologiques et écologiques rencontrés dans notre communauté théorique repose sur la répartition des taxa qui composent cette communauté en groupes fonctionnels (*i.e.* groupes d'organismes qui présentent des combinaisons de traits biologiques et écologiques similaires)(Usseglio-Polatera *et al.*, 2000b). Ces groupes

représentent les différents types d'adaptation des invertébrés benthiques à la vie dans le sédiment, en termes d'utilisation de l'habitat et de stratégie d'histoire de vie.

2.3.2. Méthode de construction des groupes fonctionnels

La construction des groupes fonctionnels repose sur l'analyse statistique des traits biologiques et écologiques des taxa, ainsi que des relations existant entre ces traits. Les différentes étapes de cette analyse, ainsi que les outils statistiques utilisés, sont présentés en figure 2. Les calculs et les graphiques ont été réalisés grâce à la bibliothèque de programmes ADE-4 (Chessel et Dolédec, 1992), avec la collaboration de Philippe Usseglio-Polatera (Laboratoire Biodiversité et Fonctionnement des Ecosystèmes, Université de Metz).

La première étape consiste en l'étude de la diversité des traits biologiques au sein de la communauté théorique, ainsi que des relations entre ces traits. Le problème à résoudre ici est le suivant : comment comparer les valeurs de variables biologiques qualitatives à celles de variables quantitatives, et comment comparer entre elles les valeurs des variables quantitatives caractérisées par des unités différentes ? La solution consiste à construire un plan factoriel à partir de toutes ces variables de natures différentes. Le plan factoriel est composé de deux axes factoriels, qui correspondent à des combinaisons de tous les traits biologiques étudiés. En choisissant les deux axes factoriels qui représentent le mieux la diversité des traits biologiques, nous disposons d'un plan, le premier plan factoriel, qui permet de représenter au mieux les relations statistiques entre ces traits.

Les axes factoriels sont obtenus en procédant à une analyse multivariée de la matrice des traits biologiques (tableau de distribution de notes d'affinité associant 109 taxa à 11 variables biologiques). La méthode d'analyse factorielle des correspondances (AFC) a été choisie pour réaliser ce travail car cette technique, très utilisée en écologie, est particulièrement adaptée à l'étude des relations entre une liste d'espèces et les différentes modalités des variables quantitatives et qualitatives caractérisant un habitat (Usseglio-Polatera *et al.*, 2000b ; Chessel *et al.*, 2003). Les principes ainsi que le mode opératoire d'une AFC sur une matrice en codage flou sont détaillés dans Chevenet *et al.* (1994).

	Maximal size (mm)					
	<2.5	2.55	5-10	10-20	20-40	40-80 >80
<i>Sperganophilus taraxis</i>	-	-	-	-	-	3
<i>Dendrobena subrubicunda</i>	-	-	-	-	3	-
<i>Eseniella tetrascha</i>	-	-	-	-	3	-
<i>Enchytraeidae</i>	-	-	3	3	-	-
<i>Brachycaerus harrisiella</i>	-	-	-	-	3	-
'''	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudocrotia complanata</i>	-	-	-	-	-	3
<i>Anodonta</i>	-	-	-	3	-	-
<i>Ulixia</i>	-	-	-	-	-	3
<i>Nais</i>	2	3	3	2	-	-
<i>Dero+Allophonus</i>	-	3	3	3	3	-
<i>Uchinois uncinata</i>	-	-	1	3	-	-
<i>Figulusella blanzi</i>	-	-	3	3	-	-
<i>Vejditskyella</i>	-	-	3	3	-	-
<i>Potamotritix moldaviensis</i> (SSC)	-	-	-	1	1	3
<i>Paranis</i>	-	3	3	2	-	-

Matrice 109 taxa × 11 traits biologiques

	Feeding habits				
	log absorber	diapet feeder	shredder	scrappers	plower
<i>Sperganophilus taraxis</i>	-	2	-	-	-
<i>Dendrobena subrubicunda</i>	1	3	-	-	-
<i>Eseniella tetrascha</i>	1	3	-	-	-
<i>Enchytraeidae</i>	1	3	-	-	-
<i>Brachycaerus harrisiella</i>	-	-	-	2	2
'''	-	1	-	-	3
<i>Pseudocrotia complanata</i>	-	-	-	-	3
<i>Anodonta</i>	-	-	-	-	-
<i>Ulixia</i>	-	-	-	-	3
<i>Nais</i>	-	3	2	-	-
<i>Dero+Allophonus</i>	-	3	1	-	-
<i>Uchinois uncinata</i>	-	3	1	-	-
<i>Figulusella blanzi</i>	1	3	1	-	-
<i>Vejditskyella</i>	-	3	1	-	-
<i>Potamotritix moldaviensis</i> (SSC)	1	3	-	-	-
<i>Paranis</i>	-	3	1	-	-

Matrice 109 taxa 9 traits écologiques

I. Structuration indépendante des données dans les deux matrices

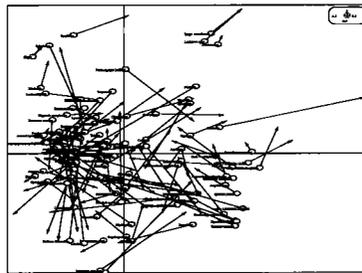
Méthode : Analyse Factorielle des Correspondances (Chevenet *et al.*, 1994)

II. Test de l'existence d'une co-structure entre les deux matrices

Méthode ; test de permutation (Kazi-Aoual *et al.*, 1995)

III. Fabrication d'un plan factoriel permettant de séparer les taxa sur la base de leurs combinaisons de traits biologiques et écologiques

Méthode : Analyse de Co-Inertie (Dolédec et Chessel, 1994)



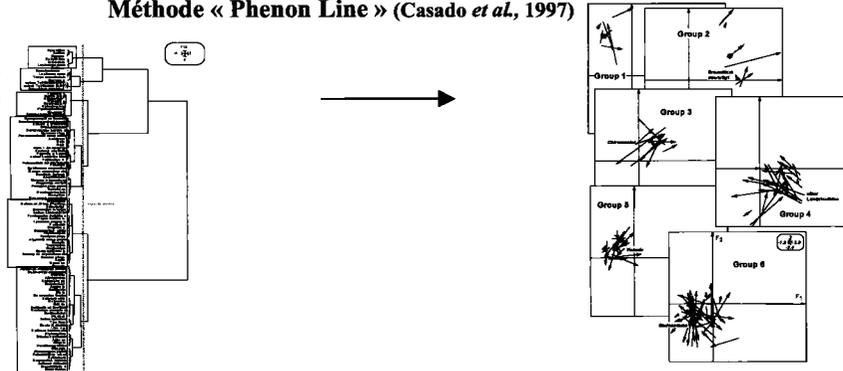
Projection des taxa dans le plan factoriel

IV. Classification des taxa sur la base de leurs distances euclidiennes

Méthode : Ward (Ward, 1963) / UPGMA (Sokal & Michener, 1958) / Lien complet (Sorensen, 1948)

V. Choix de la distance de troncature (déterminant le nombre de groupes)

Méthode « Phenon Line » (Casado *et al.*, 1997)



Dendrogramme

Projection des groupes fonctionnels dans le plan factoriel

Figure 2. Etapes de construction des groupes fonctionnels et outils statistiques utilisés.

Une analyse similaire est réalisée sur la matrice des traits écologiques (tableau de distribution de notes d'affinité associant 109 taxa à 9 variables écologiques). A la fin de cette étape, nous disposons donc de 2 plans factoriels différents : l'un représente l'information biologique, et l'autre l'information écologique.

La seconde étape consiste au regroupement des espèces en fonction de leurs similitudes biologiques et écologiques. La difficulté tient ici au fait que la fabrication des groupes fonctionnels implique de prendre en compte simultanément les traits biologiques et écologiques des taxa. Cette exigence soulève deux questions méthodologiques. Les corrélations entre traits biologiques et traits écologiques sont-elles suffisamment robustes pour servir de base statistique au regroupement des taxa ? Par ailleurs, comment regrouper les taxa dans un seul plan factoriel, sachant que les informations concernant les traits biologiques et écologiques des taxa qui servent à ce regroupement sont stockées dans deux matrices différentes (auxquelles correspondent deux plans factoriels différents) ?

La méthode d'analyse de co-inertie est basée sur l'étudier les relations entre les caractéristiques biologiques et les caractéristiques écologiques des taxa. Elle permet de tenir compte non seulement de l'ensemble des traits des espèces, mais de leur relations de compensation et de co-évolution lors de la fabrication des groupes fonctionnels

Concrètement cette méthode permet de construire des plans factoriels basés sur la covariance entre les traits biologiques et écologiques des taxa. Les axes factoriels correspondent donc à des combinaisons des traits biologiques et écologiques covariants. La similitude entre les combinaisons de traits biologiques et écologiques des différents taxa se traduit par leur proximité sur le plan factoriel. Les coordonnées des taxa dans ce plan servent ainsi de base pour construire les groupes fonctionnels.

Le principe ainsi que le mode opératoire d'une analyse de co-inertie sur matrice en codage flou sont détaillés dans Dolédec et Chessel (1994). Nous ne noterons ici que trois remarques méthodologiques importantes.

Premièrement, cette analyse est basée sur l'existence co-structure (mesurée par la covariance) entre la structure des données biologiques et la structure des données écologiques (précédemment déterminées grâce à l'AFC). La significativité de la co-structure est testée grâce à un test des permutations (Kazi-Aoual *et al.*, 1995). Cette significativité est fondamentale puisqu'elle constitue la condition *sine qua non* pour que la projection des traits

biologiques et écologiques des taxa dans les plans factoriels issus de l'analyse de co-inertie soit statistiquement fiable.

Deuxièmement, les modalités ne sont pas pondérées lors de l'analyse de co-inertie (alors qu'elles l'étaient pour la construction de la communauté théorique) : chaque modalité des différents traits étudiés a donc un poids statistique équivalent lors de la construction des groupes fonctionnels.

Le niveau de résolution de la séparation des taxa dans le plan factoriel pour un trait donné se mesure par un indice appelé rapport de corrélation (Chevenet *et al.*, 1994). La valeur relative de cet indice pour les différents traits étudiés nous renseigne sur leur pouvoir discriminant, c'est à dire leur capacité à différencier les taxa présents dans la communauté. Plus sa valeur est proche de 1, plus le trait étudié est discriminant. Cet indice nous renseigne sur la structure des données utilisées pour construire les groupes fonctionnels, permettant ainsi de détecter les traits pour lesquels les organismes seront le mieux séparés dans ces différents groupes. Notons que cet indice ne correspond pas à un coefficient de corrélation, puisqu'il ne décrit pas la contribution absolue de chaque variable à la fabrication des axes factoriels.

La projection des taxa dans les plans factoriels issus de l'analyse de co-inertie permet de les représenter en tenant compte à la fois de leurs caractéristiques biologiques et écologiques. En effet, chaque taxon est représenté dans ce plan par un vecteur dont l'origine correspond à sa combinaison de traits biologiques et l'extrémité correspond à sa combinaison de traits écologiques. Chaque taxon possède donc 2 couples de coordonnées dans ce plan. Il est possible de repérer visuellement les taxa qui présentent des similarités biologiques et écologiques : ces taxa constituent un regroupement de vecteurs de même orientation, de même norme et localisés dans une même zone du plan factoriel.

Toutefois, l'observation du plan factoriel ne suffit pas à définir la composition taxonomique des groupes fonctionnels. Afin de pouvoir regrouper les taxa de façon rigoureuse, il est nécessaire de quantifier leurs différences en terme de combinaisons de traits biologiques et écologiques.

Ces différences correspondent la distance (euclidienne) entre les taxa dans le plan factoriel, calculée sur la base de leurs coordonnées. Les taxa sont alors regroupés selon leurs distances relatives en utilisant un algorithme de classification hiérarchique, qui identifie pas à pas les paires de taxa les plus proches et les associe.

Nous avons utilisé plusieurs procédures de classification hiérarchique, qui diffèrent par leurs règles d'agrégation des taxa : méthode de Ward (Ward, 1958), méthode UPGMA (Sokal et Michener, 1958) et lien complet (Casado *et al.*, 1997). L'utilisation de plusieurs méthodes de classification permet de valider les regroupements obtenus en évaluant leur stabilité et de pouvoir identifier les taxa isolés (« outliers »). Ces derniers sont représentés par des vecteurs qui se situent aux frontières du groupe fonctionnel, et / ou possèdent une orientation différente des autres vecteurs composant le groupe. Ils correspondent à des organismes dont l'appartenance à un groupe fonctionnel varie selon la méthode de classification utilisée. Leur combinaison de traits biologiques et écologiques ne peut donc être représentée de façon pertinente par aucun des groupes fonctionnels obtenus.

Les regroupements obtenus sont représentés graphiquement sous formes de dendrogrammes : schéma en forme d'arbre qui permet de visualiser les degrés de similarité entre taxa après classification en fonction de la similarité de leurs combinaisons de traits biologiques et écologiques. Ces dendrogrammes permettent d'établir le nombre de groupes fonctionnels possibles ainsi que leur composition taxonomique.

Le nombre de groupes fonctionnels possibles est évalué en traçant une ligne verticale dans le dendrogramme à différents niveaux de similarité entre les groupes. Ces niveaux sont définis grâce une échelle horizontale, sur laquelle 0 détermine la base de l'arbre, c'est à dire le niveau d'homogénéité des combinaisons de traits intra-groupes le plus faible (Casado *et al.*, 1997).

Plus le niveau de similarité auquel nous plaçons la ligne est élevé, plus le nombre de groupes obtenus est grand, et plus ces groupes sont homogènes en termes d'information biologique et écologique.

Afin de décrire au mieux la typologie de combinaisons de traits rencontrées dans la communauté, il faut maximiser l'homogénéité intra-groupes (*i.e.* maximisation de la variance inter-groupes). Ceci implique de différencier de nombreux groupes fonctionnels, et donc d'inclure de nombreuses espèces dans la batterie de tests. Cependant, une batterie de tests n'est pas utilisable en routine si elle comporte trop d'espèces. Ainsi, le choix du niveau de troncature résulte d'un compromis entre la taille de la batterie de tests et la finesse de la représentation de la typologie des combinaisons de traits rencontrés dans la communauté.

En dernier lieu, les caractéristiques moyennes de chaque groupe fonctionnel précédemment défini sont calculées pour chaque trait biologique et écologique. Pour chaque modalité d'un trait, la moyenne des notes d'affinité est calculée en considérant l'ensemble des

taxa appartenant au groupe étudié. Le profil moyen du groupe pour le trait en question correspond alors à la distribution des notes d'affinité moyennes calculées pour les différentes modalités du trait. Ces caractéristiques moyennes représentent une synthèse de la diversité des traits biologiques et écologiques contenue dans chaque groupe fonctionnel. Elles sont représentées sur le plan factoriel par un seul vecteur par groupe, dont les coordonnées correspondent à la moyenne des coordonnées des vecteurs représentant les taxa appartenant au groupe étudié. Ce vecteur constitue ainsi le centre de gravité du groupe dans le plan factoriel.

2.4. Sélection de représentants des groupes fonctionnels : construction de la batterie de tests

Afin de constituer une batterie de tests, des représentants sont choisis pour chacun des groupes fonctionnels. Lorsque le contaminant étudié possède un mode d'action non spécifique, il n'y a pas de relation claire entre la taxonomie des espèces et leur sensibilité à l'échelle de la cellule (voir chapitre I). Ce critère ne peut donc pas servir de base pour le choix du représentant d'un groupe. En revanche, la sensibilité au niveau individuel et populationnel est liée aux traits biologiques et écologiques qui définissent les voies et les niveaux d'exposition des organismes, ainsi que leur stratégie d'histoire de vie (*loc. cit.*). Afin de représenter au mieux ces caractéristiques dans notre batterie de tests, il faut rechercher, au sein de chaque groupe fonctionnel, le taxon dont la combinaison de traits ressemble le plus possible à la combinaison moyenne du groupe.

Ainsi, nous réalisons un classement des taxa par ordre de similarité décroissante avec les caractéristiques moyennes du groupe. Ce degré de similarité est évalué en mesurant la distance entre le vecteur représentant le taxon et le vecteur représentant le groupe dans le plan factoriel.

Le meilleur représentant potentiel étant identifié, il est nécessaire de vérifier la faisabilité de l'acclimatation en laboratoire, de l'élevage et des bioessais pour cette espèce. Il n'existe pas de méthode quantitative permettant de réaliser cette étape. Nous nous basons donc sur la littérature afin de vérifier :

- la possibilité de prélever les organismes sur le terrain. La détermination à l'espèce doit être possible. Le taxon doit être présent sur le terrain et suffisamment abondant pour permettre des prélèvements réguliers. Les organismes peuvent par ailleurs être obtenus *via* un autre laboratoire, lorsque des élevages existent déjà ;
- la possibilité de réaliser leur élevage au laboratoire. Les organismes pour lesquels il n'existe pas d'exemple d'élevage dans la littérature ne sont pas forcément refusés. Il convient alors de vérifier que les exigences écologiques de l'espèce sont bien connues et qu'il est possible de les satisfaire en laboratoire. Nous admettons que ces conditions sont remplies lorsque l'organisme parvient à se reproduire régulièrement en captivité ;
- la possibilité de réaliser tout type d'essai visant à évaluer la toxicité aiguë et chronique d'une substance, ainsi que sa bioaccumulation. Il doit être possible d'exposer chaque stade de développement de l'organisme au toxique, puis de doser la concentration interne en produit. Ceci nécessite que l'organisme présente une taille suffisante (> 0,5 mm) dès les stades précoces du cycle de vie. Par ailleurs, le développement des œufs issus d'une même ponte doit être synchrone afin de pouvoir travailler sur des cohortes d'organismes dont l'âge est connu lors des essais.

Dans le cas où deux taxa présentent des similarités équivalentes aux caractéristiques moyennes d'un même groupe, nous retenons le taxon pour lequel la littérature est la plus abondante.

3. CONSTRUCTION D'UNE BATTERIE D'INVERTEBRES BENTHIQUES : RESULTATS

3.1. Construction de la communauté benthique théorique

A l'issue du tri des organismes de la base de donnée en fonction de leurs combinaisons de traits biologiques et écologiques, 109 taxa sur 479 sont retenus (soit 23% des taxa initialement présents dans la base de données). La liste des taxa composant la communauté théorique est présentée en Annexe 1. Tous les groupes taxonomiques d'invertébrés aquatiques sont représentés dans cette sélection, sauf les Diploblastiques (peu ou pas inféodés au sédiment) et les Plécoptères (inféodés aux parties amont des cours d'eau : donc éliminés par les variables courant et distribution longitudinale).

Les Oligochètes (18,5 % de la richesse spécifique), les Mollusques (16,6%), les Trichoptères (16,6%), les Diptères (13,9%), les Crustacés (8,3%), les Odonates (8,3%), les Epheméroptères (7,4%) et les Coléoptères (5,6%) sont les groupes taxonomiques les plus fréquemment représentés dans notre communauté théorique. Les Achètes (0,9%), les Polychètes (0,9%), les Nématocères (0,9%), les Mégaloptères (0,9%) et les Hétéroptères (0,9%) y sont peu représentés.

La composition taxonomique de la communauté théorique au niveau de la classe est représentative de la composition taxonomique observée dans les communautés benthiques naturelles des fleuves européens où les Diptères, les Mollusques et les Oligochètes sont les groupes dominants [*e.g.* pour le Rhône (Berrahou, 1993 ; Franquet, 1999), la Meuse (Usseglio-Polatera et Beisel, 2002), le Rhin (Van den Brink *et al.*, 1990 ; Admiraal *et al.*, 1993), le Danube (Russev, 1972 ; Sporcka et Nagy 1998) et la Volga (Mordukhai-Boltovskoi, 1979 ; Tarasov, 1998 ; Slynko *et al.*, 2002)].

3.2. Groupes fonctionnels obtenus

La structure des traits biologiques et des traits écologiques dans notre communauté benthique a été étudiée en réalisant deux AFC indépendantes : l'une sur les 109 taxa et les 11 traits biologiques et l'autre sur les 109 taxa et les 9 traits écologiques. Les premiers plans factoriels issus de ces AFC permettent de représenter respectivement 33% de l'inertie totale des données biologiques et 30 % de l'inertie totale des données écologiques. L'analyse de co-inertie est basée sur cette information.

Le test de permutation indique une co-structure significative entre les traits biologiques et écologiques des taxa ($p < 0.0001$). Les combinaisons de traits biologiques et écologiques constituent donc une base robuste pour le regroupement des taxa par l'analyse de co-inertie.

Les deux premiers axes factoriels obtenus lors de l'analyse de co-inertie (F1 et F2), caractérisés par les valeurs propres $\lambda_1 = 26,2$ et $\lambda_2 = 19,0$ forment le plan factoriel dans lequel la fraction projetée de la covariance entre traits biologiques et écologiques est maximale (45,2 % de la covariance totale). En effet, la part des autres axes factoriels de l'analyse de co-inertie est toujours inférieure à 12%, permettant ainsi de représenter au mieux 23 % de la covariance totale pour les axes F3 et F4 (Fig. 3a). Les groupes fonctionnels sont ainsi construits sur la base des coordonnées des taxa dans le plan factoriel F1 \times F2.

Les valeurs des rapports de corrélation (tableaux V. a. & b.) sont très faibles. Ce résultat est relativement classique lors de l'analyse de notes d'affinité en codage flou par la méthode de co-inertie (Usseglio-Polatera, Comm. Pers.). Il indique que la structure des données utilisées pour la co-inertie est faible.

L'étude de leurs valeurs relatives permet toutefois d'identifier les traits biologiques et écologiques les plus discriminants dans notre analyse. La stratégie de reproduction, le nombre de reproductions par an ainsi que le mode d'alimentation des taxa sont les traits biologiques qui participent le plus à la différenciation des taxa. La relation au substrat, la distribution transversale, la saprobie, et le préférendum de température sont les traits écologiques les plus discriminants. Les variables les plus discriminantes de notre analyse correspondent donc aux traits liés à la répartition des taxa dans les micro-habitats sédimentaires, à leurs habitudes alimentaires et à leur stratégie d'histoire de vie. Ce résultat est mis en évidence en projetant

les modalités de traits biologiques et écologiques sur le premier plan factoriel issu de l'analyse de co-inertie (figures 3b. et 4.).

Tableau V.a. Rapports de corrélation entre les traits biologiques et les axes principaux du premier plan factoriel issu de l'analyse de co-inertie (109 taxa × 20 traits biologiques et écologiques)

<i>Traits biologiques</i>	<i>Axes factoriels</i>	
	F1	F2
Reproduction	0,0154	0,0156
Mode d'alimentation	0,0149	0,0040
Nombre de reproductions/an	0,0132	0,0047
Taille maximale	0,0084	0,0048
Forme de résistance	0,0073	0,0045
Dispersion	0,0072	0,0067
Locomotion	0,0066	0,0089
Nourriture	0,0041	0,0044
Stades aquatiques	0,0032	0,0011
Durée du cycle de vie	0,0023	0,0036
Respiration	0,0019	0,0027

Tableau V.b. Rapports de corrélation entre les traits écologiques et les axes principaux du premier plan factoriel issu de l'analyse de co-inertie (109 taxa × 20 traits biologiques et écologiques)

<i>Traits écologiques</i>	<i>Axes factoriels</i>	
	F1	F2
Distribution transversale	0,0123	0,0135
Distribution longitudinale	0,0092	0,0092
Altitude	0,0035	0,0006
Preferendum de substrat	0,0172	0,0050
Preferendum de courant	0,0002	0,0045
Degré de trophie	0,0065	0,0075
Preferendum de salinité	0,0003	0,0051
Preferendum de température	0,0116	0,0029
Degré de saprobie	0,0083	0,0016

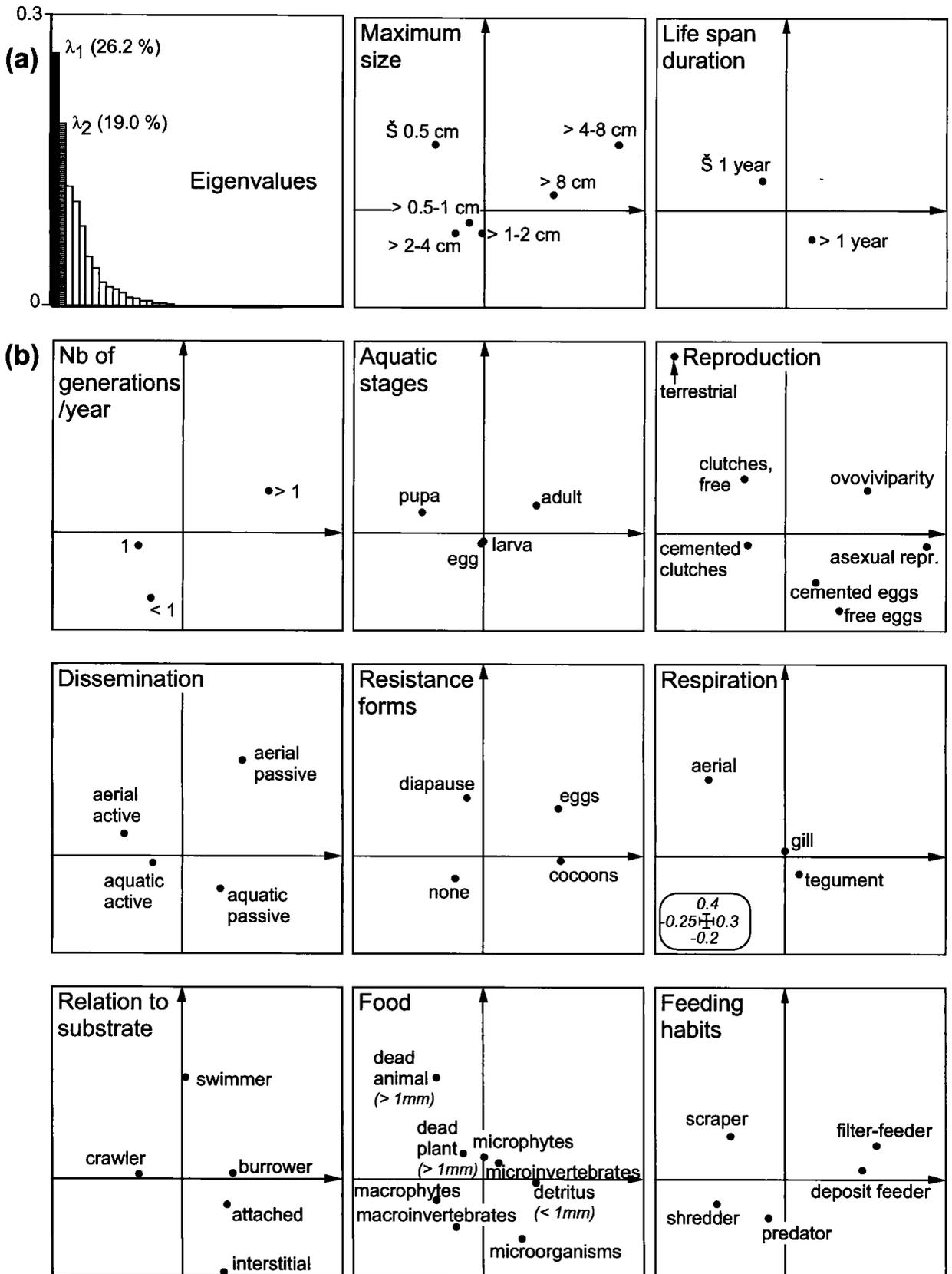


Figure 3. Ordination des traits biologiques sur le premier plan factoriel issu de l'analyse de co-inertie (109 taxa \times 20 traits biologiques et écologiques). (a) Histogramme des valeurs propres (b) Distribution des modalités moyennes de traits biologiques sur le plan factoriel

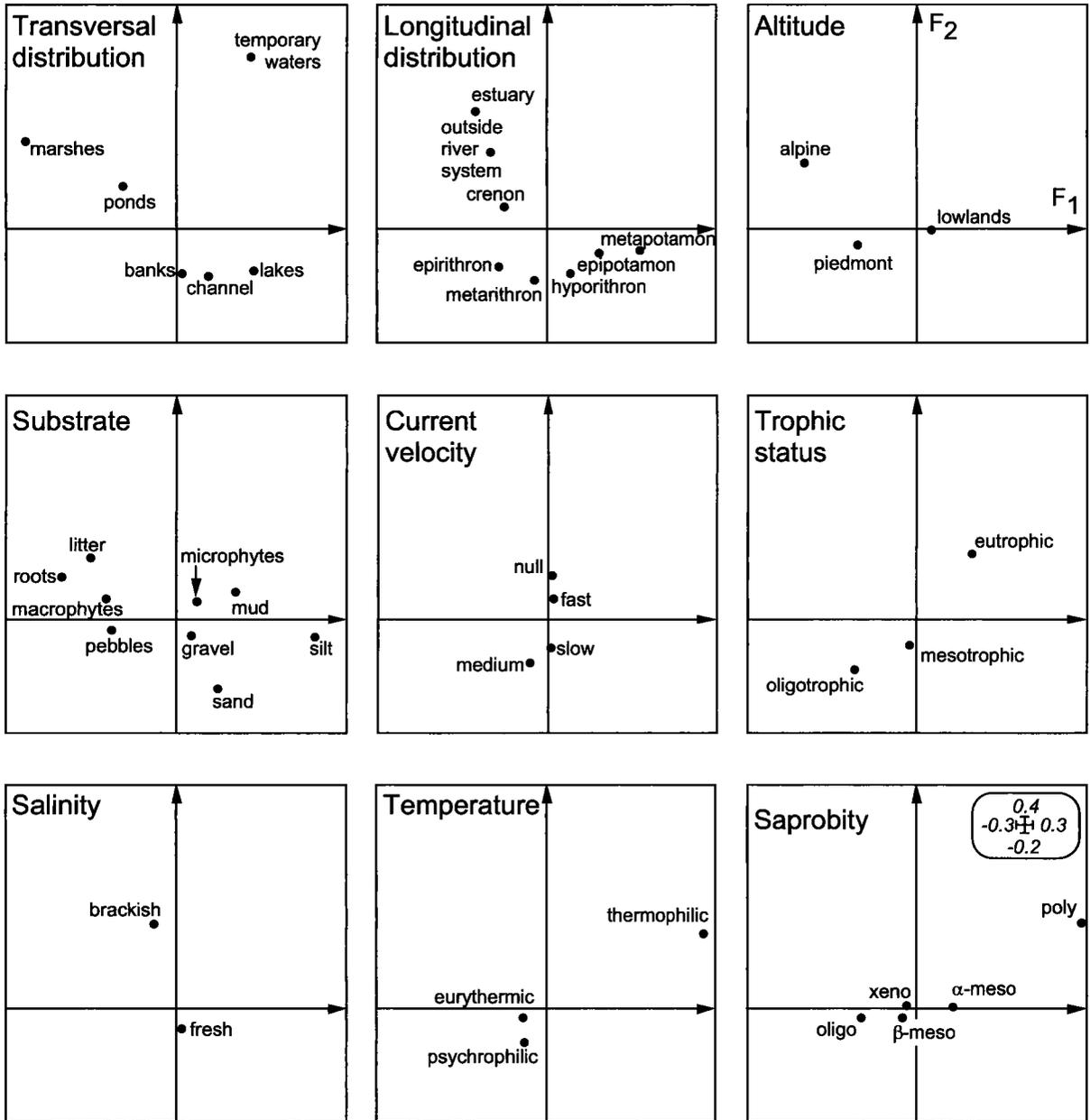


Figure 4. Ordination des traits écologiques sur le premier plan factoriel issu de l'analyse de covariance (109 taxa × 20 traits biologiques et écologiques) : distribution des modalités moyennes de traits écologiques sur le plan factoriel.

Six groupes fonctionnels ont été obtenus à partir de la classification des taxa selon la méthode de Ward (Fig. 5 et Annexe 1. pour la composition taxonomique).

Le dendrogramme obtenu selon la méthode UPGMA (présenté en Annexe 2.) fournit une classification globalement similaire à la précédente. Il permet par ailleurs de mettre en évidence la présence de sous-groupes correspondant aux relations phylogénétiques entre taxa. En effet, les organismes appartenant à une même classe sont en général regroupés dans un même groupe fonctionnel (sauf pour les Diptères qui se répartissent dans les groupes 1 (43%), 3 (22%), 5 (26%) et 6 (9%)). A l'intérieur de ces sous-groupes, nous pouvons distinguer des groupes d'organismes appartenant à la même famille. Les relations taxonomiques entre les taxa sont donc prises en compte dans nos groupes fonctionnels, bien que la taxonomie ne fassent pas partie des critères servant de base à la classification des taxa.

La méthode de lien complet (dendrogramme présenté en Annexe 3.) permet de détecter la présence de 12 taxa isolés (sur 109 taxa). Sept de ces taxa forment le groupe fonctionnel 1. Ce groupe rassemble des organismes semelpares dont la plus grande partie du cycle de vie s'opère en milieu aérien ou terrestre (stades pupe et adulte, reproduction et dissémination de l'espèce). Ce petit groupe est majoritairement constitué de Coléoptères (57%). Ces organismes présentent des caractéristiques relativement différentes de la combinaison théorique de traits caractérisant les organismes inféodés aux sédiments de zone aval de cours d'eau, notamment pour les variables distribution longitudinale, relation au substrat et respiration.

Les groupes 2 et 4 présentent de larges effectifs. Ils rassemblent les organismes itéropares à cycle de vie long (> 1 an), sans diapause. Les œufs, protégés par un cocon, peuvent constituer un stade de résistance aux stress environnementaux. Ces organismes sont fousseurs et se nourrissent uniquement de débris organiques fins en décomposition dans le sédiment (détritivores stricts). Ils diffèrent principalement des autres groupes par leur grande taille et par leur mode de reproduction (possibilité de reproduction asexuée fréquente dans le groupe 4). Ces groupes comprennent principalement des Oligochètes, le groupe 2 comportant l'ensemble de la famille des Tubificidae et le groupe 4 comportant l'ensemble des Lumbriculidae et de nombreux représentants de la famille des Naididae.

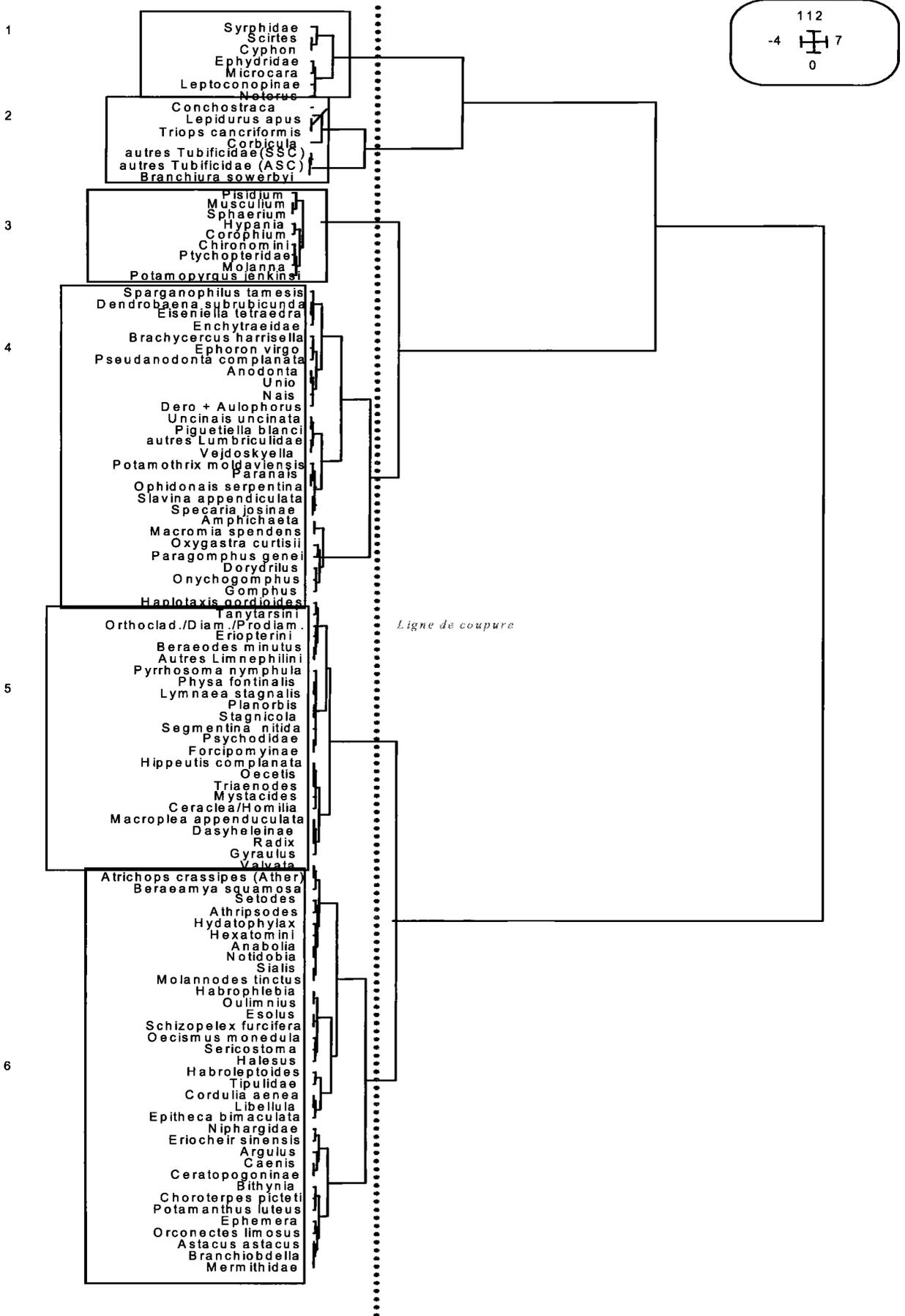
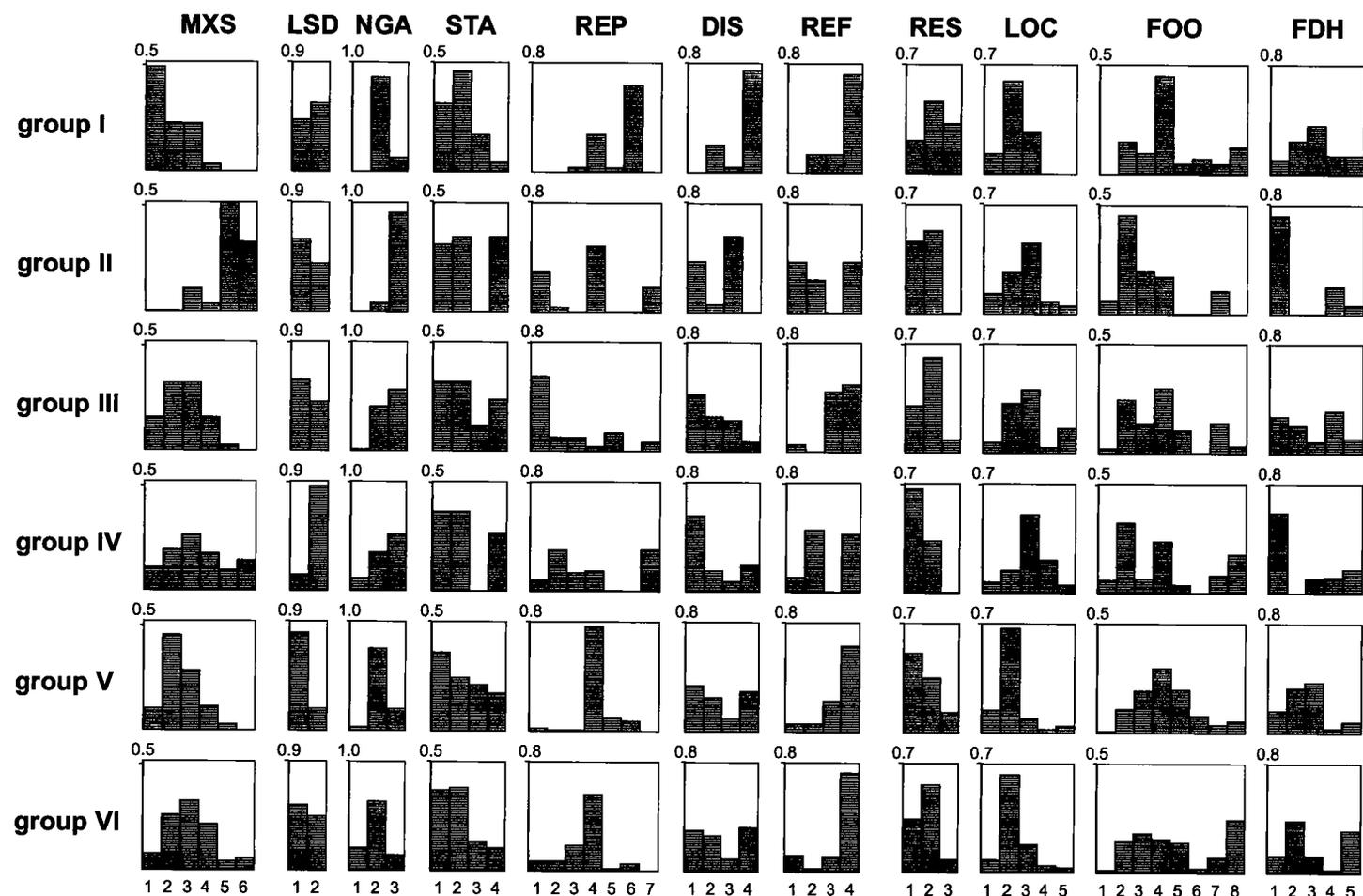


Figure 5. Dendrogramme présentant les six groupes fonctionnels obtenus à partir de la classification des taxa selon la méthode de Ward (109 taxa × 20 traits biologiques et écologiques)

Les groupes 3 (7 taxa) et 5 (20 taxa + la sous-famille des Limnephilini) rassemblent les organismes semelpares à cycle de vie court (≤ 1 an), épibenthiques ou fouisseurs. Ces organismes sont généralement détritivores, filtreurs, brouteurs ou broyeurs. Leur reproduction est généralement sexuée, avec ponte d'œufs délivrés dans le milieu sous forme de masses gélatineuses (cas d'ovoviviparité dans le groupe 3). Ces organismes ne possèdent généralement aucune forme de résistance sauf dans le cas des Diptères (22% du groupe 3 et 26% du groupe 5) qui peuvent occasionnellement entrer en dormance à l'état larvaire. Ils se caractérisent notamment par leur mode d'alimentation : leur régime varié les distingue des détritivores stricts type Oligochètes des groupes 2 et 4. Cependant, ces organismes ne se nourrissent pas de particules organiques ou végétales de grande taille, contrairement aux taxa du groupe 6. Ces groupes sont principalement représentés par des Mollusques (43% et 39 % respectivement), les Bivalves étant rassemblés dans le groupe 3 et les Gastéropodes dans le groupe 5.

Le groupe 6 présente la plus grande richesse et diversité spécifique. Il rassemble principalement des Insectes : Trichoptères (31%), Ephéméroptères (14%), Odonates (9%) et Diptères (9%). Ces organismes sont majoritairement semelpares. Leur cycle de vie court (< 1 an) ne comporte pas de stade de résistance ni de diapause. Leur reproduction est généralement sexuée avec production d'œufs pondus en masses gélatineuses. Les particularités de ce groupe touchent en premier lieu le régime alimentaire : ce groupe rassemble des détritivores (régime large comprenant des débris de toutes tailles) ainsi que des déchetteurs (régime composé surtout de micro- et de macrophytes). Ces organismes se distinguent en outre par leur faible tolérance à la charge organique dans le milieu (mésotrophes stricts).

Les caractéristiques biologiques et écologiques moyennes des groupes fonctionnels sont présentées respectivement en figures 6 et 7. Nous remarquons que la diversité des modalités représentées dans chacun des groupes fonctionnels obtenus est élevée : les groupes sont « recouvrants ». En revanche, la modalité du trait la plus fréquente varie selon les groupes étudiés. Afin d'éliminer le « bruit de fond » lié au grand nombre de modalités représentées à faible fréquence dans chaque groupe, le représentant du groupe devra posséder une forte affinité pour la modalité la plus fréquente dans son groupe (voir paragraphe 4.4 pour une comparaison entre les traits biologiques et écologiques des représentants et les traits moyens de leur groupe).



MXS : Taille maximale

LSD : Durée du cycle de vie

NGA : Nombre de générations par an

STA : Stades aquatiques

REP : Mode de reproduction

DIS : Capacités de dispersion

REF : Stades de résistance

RES : Respiration

LOC : Mode de locomotion

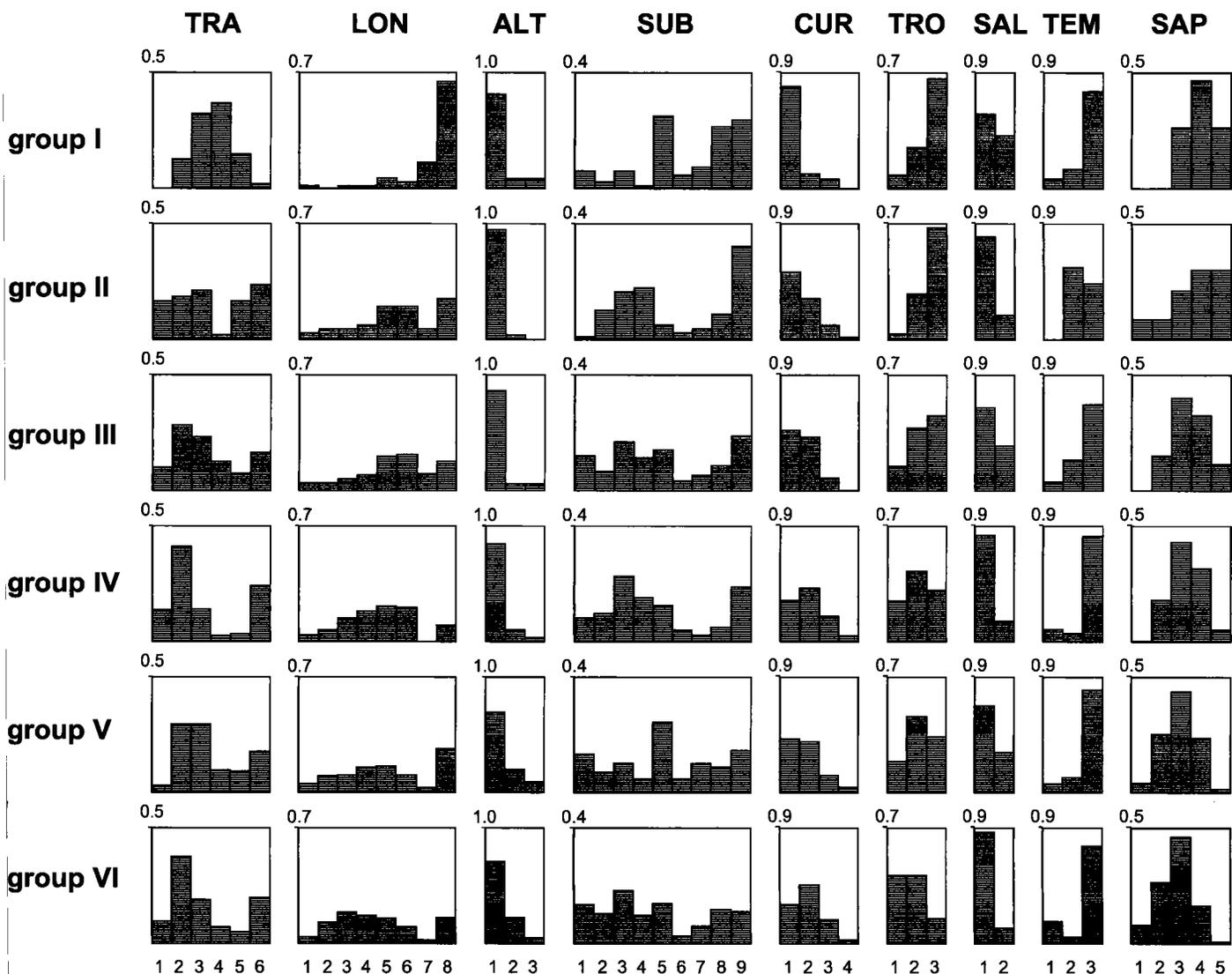
FOO : Régime alimentaire

FDH : Mode d'alimentation

Les codes des modalités sont représentées en abscisses (voir tableau I pour leur intitulé).

La fréquence des notes d'affinité des taxa pour chaque modalité est portée en ordonnées.

Figure 6. Caractéristiques biologiques moyennes des groupes fonctionnels (exprimées par la distribution moyenne des fréquences relatives des notes d'affinité des taxa pour chaque modalité des 11 traits biologiques étudiés) - (109 taxa × 20 traits biologiques et écologiques)



TRA : Distribution transversale

LON : Distribution longitudinale

ALT : Preferendum d'altitude

SUB : Preferendum de substrat

CUR : Preferendum de courant

TRO : Degré de trophie

SAL : Preferendum de salinité

TEM : Preferendum de température

SAP: Degré de saprobie

Les codes des modalités sont représentées en abscisses (voir tableau II pour leur intitulé).

La fréquence des notes d'affinité des taxa pour chaque modalité est portée en ordonnées.

Figure 7. Caractéristiques écologiques moyennes des groupes fonctionnels (exprimées par la distribution moyenne des fréquences relatives des notes d'affinité des taxa pour chaque modalité des 9 traits écologiques étudiés) - (109 taxa × 20 traits biologiques et écologiques)

3.3. Caractérisation synthétique des groupes fonctionnels obtenus

Les principales différences biologiques et écologiques entre les groupes fonctionnels obtenus sont explicitées dans le tableau VI.

Tableau VI. Principales différences observées au niveau des profils biologiques et écologiques moyens des groupes fonctionnels obtenus selon la classification de Ward

	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4	Groupe 5	Groupe 6
Taille	Petite (<0,5 cm)	Grande (>4 cm)	Moyenne (0,5 - 2 cm)	Grande (2 - 4 cm)	Petite (0,5 - 1 cm)	Moyenne (1 - 2 cm)
Durée du cycle de vie	>1an	>1an	≤ 1 an	>1an	≤ 1 an	≤ 1 an
Patron de cycle de vie	Semelpares	Itéropares	Semelpares	Itéropares	Semelpares	Semelpares
Stratégie de reproduction	Sexuée	Sexuée	Sexuée	Asexuée	Sexuée	Sexuée
Type de pontes	Cimentées ¹	Cimentées ¹	Ovoviviparité ou cimentées ¹	Oeufs isolés	Cimentées ¹	Cimentées ¹
Formes de résistance ou diapause	Aucune	Œufs	Diapause larvaire	Œufs	Aucune	Aucune
Dispersion Locomotion	Aérienne active	Aquatique passive	Aérienne active	Aquatique passive	Aquatique passive	Aérienne active
Mode d'alimentation	Racleur, Déchiqueteur	Détritivore SS	Détritivore SL ou brouteur, filtreur	Détritivore SS	Brouteur, racleur, broyeur	Brouteur, racleur, broyeur
Amplitude du régime alimentaire	Réduite (Microphytes)	Réduite (Détritus <1mm)	Large ²	Réduite (Détritus <1mm)	Réduite (Microphytes)	Large ²
Relation au substrat	Terrestre	Fouisseur	Fouisseur	Fouisseur	Epibenthique	Epibenthique
Degré de trophie	Eutrophes	Eutrophes	Eutrophes	Eutrophes	Eutrophes	Mésotrophes

¹. Par pontes cimentées, on entend un regroupement d'œufs sous forme de masses gélatineuses, par opposition aux œufs isolés.

². Par large, on entend, un régime alimentaire mixte (dépendant de la saison et de la disponibilité des éléments nutritifs), constitué de détritus de toute taille (état de décomposition variable), d'algues, de biofilm, de micro- et éventuellement macrophytes.

La plupart des différences s'observent pour des traits qui ont majoritairement contribué à la répartition des taxa dans les différents groupes. Ceci montre que la diversité fonctionnelle de notre communauté théorique a bien été « répartie » entre les groupes fonctionnels.

En relation avec le tableau VI, nous pouvons caractériser chaque groupe par quelques mots clés traduisant leurs principales différences de combinaisons de traits biologiques et écologiques :

Groupe 1 : Nombreux stades terrestres ou aériens ;

Groupe 2 : Itéropares fouisseurs de grande taille avec reproduction sexuée ;

Groupe 4 : Itéropares fouisseurs de grande taille avec reproduction asexuée ;

Groupe 3 : Semelpares, eutrophes à large spectre alimentaire et stade de résistance éventuel ;

Groupe 6 : Semelpares oligo à mésotrophes, à large spectre alimentaire et absence de stade de résistance;

Groupe 5 : Semelpares méso à eutrophes à spectre alimentaire restreint et absence de stade de résistance.

3.4. Sélection de représentants des groupes fonctionnels

Pour chacun des groupes, les distances relatives entre chaque taxon et les caractéristiques moyennes du groupe sont représentées en figure 8. Plus les taxa se ressemblent du point de vue biologique et écologique, plus :

- la position dans le plan de l'origine de leurs vecteurs, qui représente les caractéristiques écologiques moyennes, est proche ;
- la position dans le plan de l'extrémité de leurs vecteurs, qui représente les caractéristiques biologiques moyennes, est proche ;
- l'orientation et la norme de leurs vecteurs, qui traduisent les relations entre traits biologiques et traits écologiques, sont similaires.

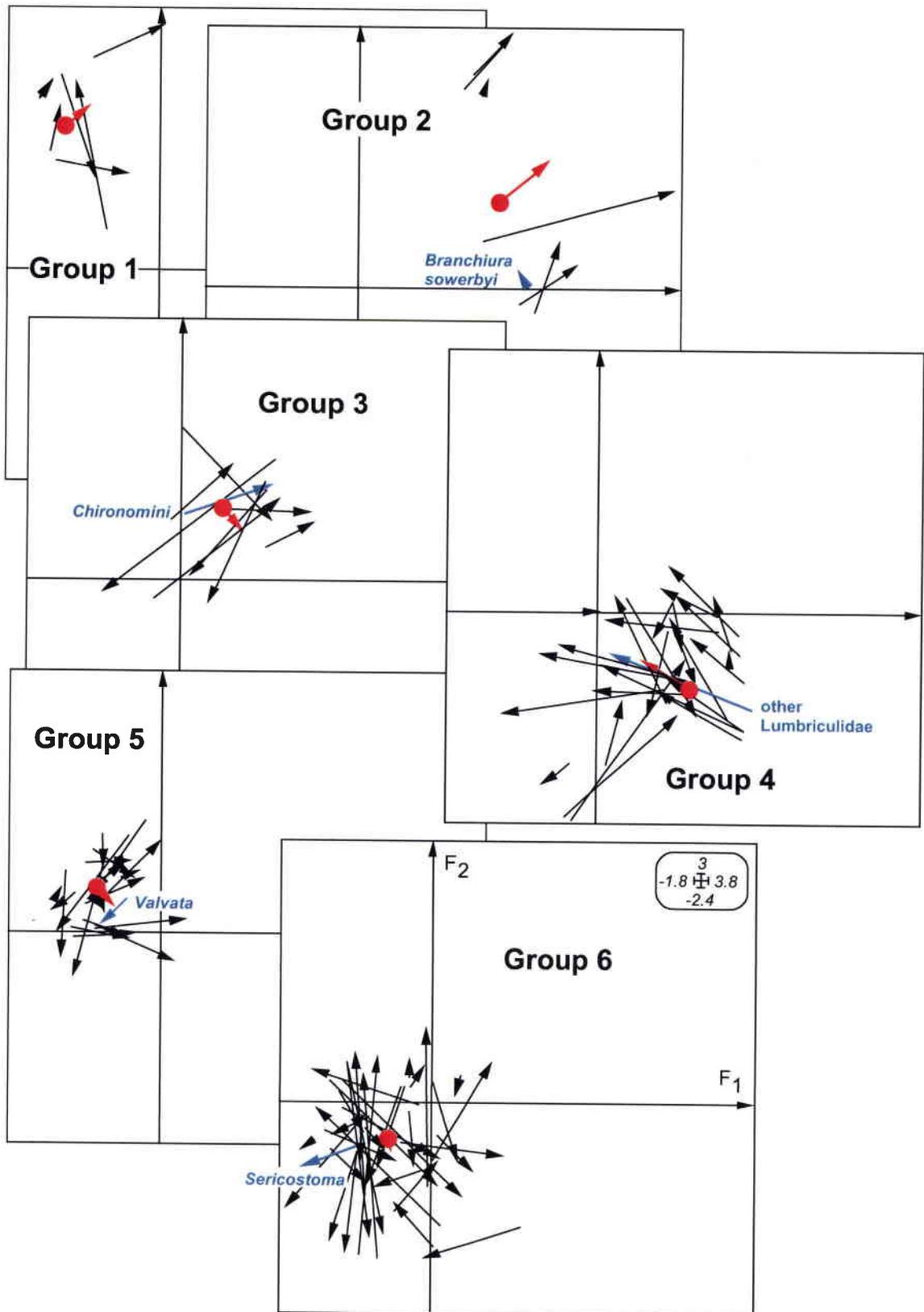


Figure 8.
Projection des taxa par groupes fonctionnels dans le premier plan factoriel de l'analyse de co-inertie : mise en évidence des distances relatives entre taxa et positionnement des traits moyens du groupe (109 taxa × 20 traits biologiques et écologiques)

-  Caractéristiques moyennes du groupe
-  Caractéristiques du représentant du groupe
-  Caractéristiques des autres taxa du groupe

Les organismes du groupe 1 présentent des caractéristiques relativement différentes de la combinaison théorique de traits caractérisant les organismes inféodés aux sédiments de zone aval de cours d'eau. Nous n'avons donc pas inclus d'organisme de ce groupe dans notre batterie de tests.

Le taxon le plus proche des caractéristiques biologiques et écologiques moyennes du groupe 2 est *Corbicula fluminea*. Cependant, cet organisme ne se reproduit pas en laboratoire. Le second représentant possible pour le groupe 2 est *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta : Tubificidae). Cet organisme est facilement identifiable de part ses filaments branchiaux postérieurs (Drewes et Zoran, 1989). Il est largement distribué dans le monde et abonde dans les sédiments (Carroll et Dorris, 1972 ; Wang et Matisoff, 1997 ; Raburu, et al., 2002). Bien que peu de littérature soit encore disponible quant à ce taxon, *B. sowerbyi* a récemment éveillé l'attention des écotoxicologues : il existe quelques références rapportant des bioessais (Casellato et al., 1992; Marchese et Brinkhurst, 1996 ; Egeler et al., 1999). Les organismes utilisés lors de ces essais sont généralement prélevés sur le terrain. Il n'existe aucun protocole d'élevage en laboratoire pour ce taxon, mais son élevage a déjà été réalisé en pisciculture. Son élevage et son utilisation pour les tests de toxicité en laboratoire étant possibles, nous avons donc choisi *B. sowerbyi* comme représentant du groupe 2.

Le taxon le plus proche des caractéristiques biologiques et écologiques moyennes du groupe 3 est un amphipode du genre *Corophium*. Une seule espèce est présente en France (dans le bassin de la Saône et le Rhin) : *Corophium curvispinum* (Tachet et al., 2000). Du fait de notre incapacité à le déterminer (proche du gammare, dont il existe plusieurs espèces dans nos régions), nous n'avons pas retenu cet organisme comme représentant du groupe 3.

Le second représentant possible pour le groupe 3 est *Chironomus riparius* (Diptera : Chironomidae). Cette espèce est largement utilisée en écotoxicologie : elle fait partie des espèces recommandées pour l'évaluation de la toxicité de sédiments par les instances européennes et américaines (US EPA, 1994 ; OECD, 2000). Les méthodes d'élevage ainsi que le cycle de vie en laboratoire de cet organisme sont connus. *C. riparius* constituera donc le représentant du groupe 3.

Les taxa les plus proches des caractéristiques biologiques et écologiques moyennes du groupe 4 sont les Lumbriculidae *Dendrobaena subrubicunda* et *Eiseiniella tetraedra*, ainsi que le groupe des Enchytraeidae. Cependant, les deux espèces de Lumbriculidae sont plus

ripicoles que sédimentaires et les Enchytraeidae sont des organismes nageurs, ayant peu ou pas d'affinité pour le sédiment (Tachet *et al.*, 2000). De plus, là encore, nous nous heurtons à des problèmes d'identification de ces espèces.

D'après leur position sur le plan factoriel, les autres Lumbriculidae constituent potentiellement de bons représentants du groupe 4. Nous choisissons *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta : Lumbriculidae) en tant que représentant de ce groupe, car, comme *C. riparius*, cette espèce est très déjà utilisée en écotoxicologie : son élevage et son utilisation pour les tests de toxicité sont possibles et la littérature concernant ce taxon est abondante.

Les taxa les plus proches des caractéristiques biologiques et écologiques moyennes du groupe 5 sont les gastéropodes : *Radix sp.*, *Gyraulus sp.*, *Physa fontinalis* et *Stagnicola sp.* Le planorbe (*Gyraulus sp.*) est facilement identifié mais sa collecte sur le terrain est fastidieuse (Tachet *et al.*, 2000). L'identification des physes (*Physa fontinalis*) est relativement difficile (*loc.cit.*). Les deux autres espèces appartiennent à la famille des Lymnaeidae : ce sont des organismes pulmonés, de grande taille. Ceci rend leur utilisation difficile pour les tests de toxicité (J. Mouthon, Comm. Pers.).

D'après sa position sur le plan factoriel, le cinquième taxa le plus proche des caractéristiques biologiques et écologiques moyennes du groupe correspond au genre *Valvata*. Au sein de ce genre, *Valvata (Cincinna) piscinalis* (Gastropoda : Valvatidae) est commun en Europe et en Amérique, où il domine le peuplement benthique de certains lacs (Cleland, 1954 ; Falniowski *et al.*, 1988). Il est facilement identifiable, grâce à la forme et à l'ornementation de sa coquille (Russell-Hunter, 1961 ; Binder, 1967). Il peut être acclimaté au laboratoire (Tsikhon-Lukanina, 1961a et b). D'après ces arguments, nous avons retenu *V. piscinalis* comme représentant du groupe 5. Notons toutefois qu'il n'existe encore aucun protocole d'élevage pour cet organisme, et qu'il n'a jamais été utilisé dans le cadre de tests de toxicité (aucune référence recensée dans la base de données écotoxicologiques AQUIRE (US EPA, 2005).

Le taxon le plus proche des caractéristiques biologiques et écologiques moyennes du groupe 6 est un mégaloptère (*Sialis sp.*) dont le cycle de vie s'étale sur deux à trois ans et comporte dix stades larvaires (larves prédatrices). Cet organisme présente un cycle de vie trop long et trop complexe pour être facilement élevé au laboratoire.

Le second représentant possible pour le groupe 6 est *Sericostoma personatum* (Trichoptera : Sericostomatidae). Cet organisme est abondant en Europe de l'Ouest (Dangles et Guerold, 2001 ; Friberg *et al.*, 2002). Il peut être identifié au niveau du genre à l'état larvaire grâce à

l'aspect de son fourreau, à la forme de sa capsule céphalique ainsi qu'au nombre et à la position des soies capillaires (Tachet *et al.*, 2000). Son identification au niveau spécifique est plus difficile : les jeunes stades larvaires de *S. personatum* et *S. flavicorne* ne sont pas discernables (Waringer et Graf, 1997). Cet organisme n'est pas élevé de façon permanente en laboratoire, mais généralement prélevé sur le terrain. Cependant, la reproduction en laboratoire a déjà été observée (Wagner, 1990). Quelques études ont été réalisées afin de mieux connaître son écologie (Williams et Williams, 1998 ; Friberg et Jacobsen, 1999) et son cycle de vie (Wagner, 1990, 1991). Cet organisme a par ailleurs été récemment utilisé pour des tests de toxicité *in situ* (Wood *et al.*, 2005). D'après ces arguments, nous avons retenu *S. personatum* comme représentant du groupe 6. Notons toutefois qu'aucun test de toxicité en laboratoire n'a encore été réalisé sur cette espèce.

Finalement, notre batterie de tests regroupe les taxa suivants : *B. sowerbyi*, *C. riparius*, *L. variegatus*, *V. piscinalis* et *S. personatum*.

B. sowerbyi, *V. piscinalis* et *S. personatum* ne sont pas communément utilisées en écotoxicologie. Le prélèvement, l'acclimatation et la mise au point de méthodes d'élevage et d'essai pour ces organismes représente un travail considérable. Faute de temps, seuls 3 taxa sur les 5 taxa composant la batterie de tests ont pu être étudiés dans le cadre de cette thèse. Ces trois taxa ont été retenus pour des raisons pratiques : nous avons choisi *C. riparius* car nous disposions déjà d'élevages au laboratoire et de connaissances toxicologiques pour cet organisme. Par ailleurs, nous avons choisi *V. piscinalis* et *B. sowerbyi*, car nous avons pu collaborer avec des spécialistes de la biologie et de l'écologie des Mollusques (Jacques Mouthon, Laboratoire de Diagnose des Ecosystèmes, Cemagref) et des Oligochètes (Michel Lafont, Laboratoire de Diagnose des Ecosystèmes, Cemagref) afin de nous aider à trouver des sites de prélèvement *in situ* pour ces organismes.

Nous nous sommes interrogés sur la perte de représentativité occasionnée par le fait de ne pas prendre en compte *L. variegatus* et *S. personatum* dans la suite de notre étude. *L. variegatus* représente les organismes itéropares fouisseurs de grande taille à reproduction asexuée. La combinaison de traits « itéropare fouisseur de grande taille » est aussi représentée par *B. sowerbyi*. Ainsi, la batterie réduite à trois espèces permet bien de représenter les organismes itéropares fouisseurs de grande taille, mais elle ne permet pas de représenter les organismes qui se reproduisent de façon asexuée.

S. personatum représente les organismes semelpares, oligo à mésotrophes, à spectre alimentaire restreint (broyeur de débris végétaux) et absence de stade de résistance. Or la combinaison de traits « semelpare, mésotrophe, sans stade de résistance » est aussi représentée par *V. piscinalis*. Ainsi ce caractère est bien représenté dans la batterie réduite à trois espèces. En revanche, cette batterie réduite ne permet pas de prendre en compte les organismes oligotrophes, avec un régime alimentaire strict basé sur la consommation de végétaux (*i.e.* organismes vivant dans la litière et se nourrissant principalement en broyant des détritiques végétaux).

4. BIOLOGIE ET ECOLOGIE DE NOS ESPECES MODELES

Dans ce sous chapitre, nous proposons un résumé des connaissances sur la biologie et l'écologie des trois espèces étudiées au cours de la thèse : *Chironomus riparius*, *Branchiura sowerbyi* et *Valvata (Cincinna) piscinalis*. Par ailleurs, nous comparons la combinaison moyenne de traits biologiques et écologiques des ces trois espèces par rapport celle du groupe fonctionnel qu'elles représentent.

4.1. *Chironomus riparius*

4.1.1. Taxonomie et importance écologique

Le genre *Chironomus* [Diptera : Chironomidae] représente plus de 15000 espèces (Cranston, 1995). Son aire de répartition est vaste : il est communément rencontré dans les cours d'eau et les lacs méso-eutrophes à eutrophes, aux latitudes tempérées de l'hémisphère Nord. *C. riparius* est fréquemment observé au sud et à l'ouest de l'Europe (Ali, 1995) ainsi qu'en Amérique du Nord (Rasmussen, 1984). Cette espèce est opportuniste : elle est parmi les premiers invertébrés à coloniser le milieu aquatique durant les périodes d'eutrophisation ou d'enrichissement organique (Armitage *et al.*, 1995).

La plus grande partie du cycle de vie du chironome se déroule au contact du sédiment. Les larves, fouisseuses, constituent une biomasse benthique considérable : les ruisseaux de taille moyenne peuvent abriter jusqu'à 90000 individus par m² au printemps, représentant entre 50% et 80% du benthos total (Berg et Hellenthal, 1992). Par le jeu des chaînes alimentaires, cette abondance leur confère un rôle fonctionnel important dans les écosystèmes aquatiques. En effet, ces larves peuvent consommer jusqu'à 89% de la quantité de débris présents dans le substrat (Shieh *et al.*, 2002). Cette activité intervient dans la dynamique de la couche superficielle du sédiment (partie « active » de ce compartiment) en modifiant les équilibres physico-chimiques et la biodisponibilité d'éléments naturels ou contaminants (Burton et Scott, 1992). Contrairement à d'autres détritivores aquatiques (par exemple *B. sowerbyi*), les bactéries présentes dans le sédiment ne constituent pas une source de nourriture importante pour les chironomes (Baker et Bradnam, 1976). Par ailleurs, les larves de

chironomes représentent une ressource importante dans le régime alimentaire des poissons et des oiseaux d'eau (Berg et Hellenthal, 1992). En jouant le rôle de vecteurs du contaminant, elles peuvent être à la base de phénomènes de bioamplification le long de la chaîne alimentaire.

4.1.2. Eléments de morphologie

La phase larvaire comprend quatre stades distincts, différenciables par la taille de la capsule céphalique (Day *et al.*, 1994). En effet, cette capsule grandit rapidement lors de la mue larvaire, mais cesse de grandir pendant les périodes d'inter-mues. Les stades larvaires se différencient aussi par la couleur du corps, de blanc laiteux à rouge vif, en liens avec l'acquisition progressive d'hémoglobine. Les antennes, les mandibules, 3 segments thoraciques et 9 segments abdominaux sont observables dès le premier stade larvaire (Fig. 9). Les branchies apparaissent au second stade larvaire. Le dimorphisme sexuel est observable dès le quatrième stade larvaire, les mâles pesant en moyenne 30% de moins que les femelles à ce stade.

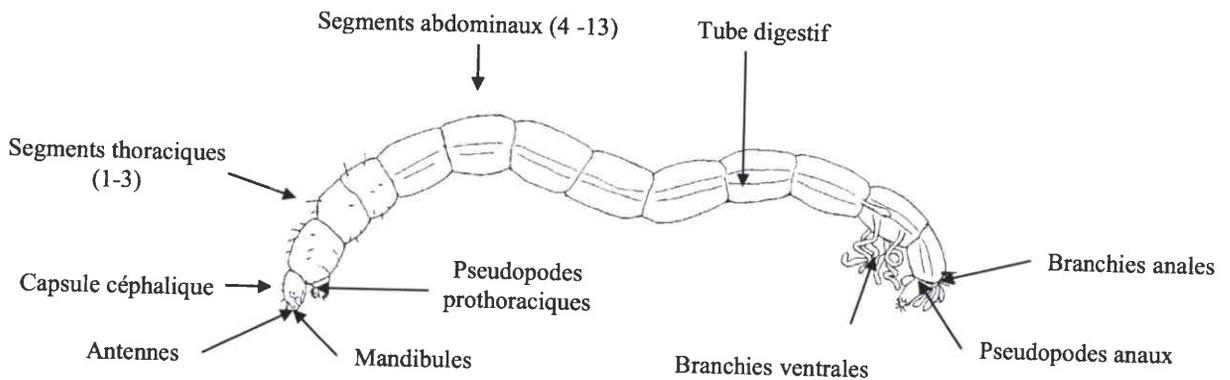


Figure 9. Morphologie simplifiée des larves de chironome (d'après Tachet et al., 2000)

La nymphe (Fig.10) possède des organes respiratoires thoraciques qui apparaissent comme une touffe de filaments blancs, situés derrière la tête. Des organes liés à la nage, ainsi que des étuis pour les futures ailes, pattes et yeux sont nettement observables (Townsend *et al.*,1981).

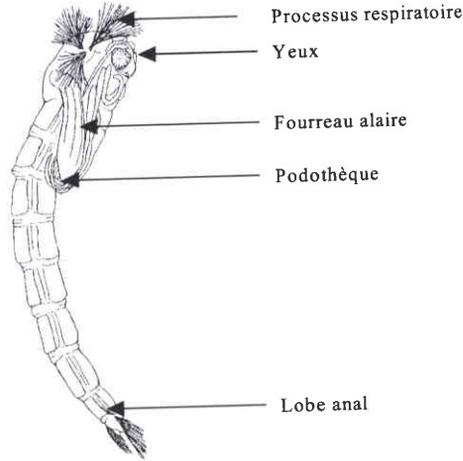


Figure 10. Morphologie simplifiée des nymphes de chironome (d'après Tachet et al., 2000)

L'imago (Fig. 11) ressemble aux moustiques en taille et en apparence, mais il est dépourvu d'appareil piqueur. Le dimorphisme sexuel est très net : les mâles se distinguent des femelles par leurs antennes plumeuses et par leur abdomen mince, qui porte à son extrémité postérieure une paire de pinces génitales (Townsend *et al.*,1981). La femelle, plus foncée, est environ deux fois plus grosse que le mâle. Ses œufs représentent environ 30% de sa masse.

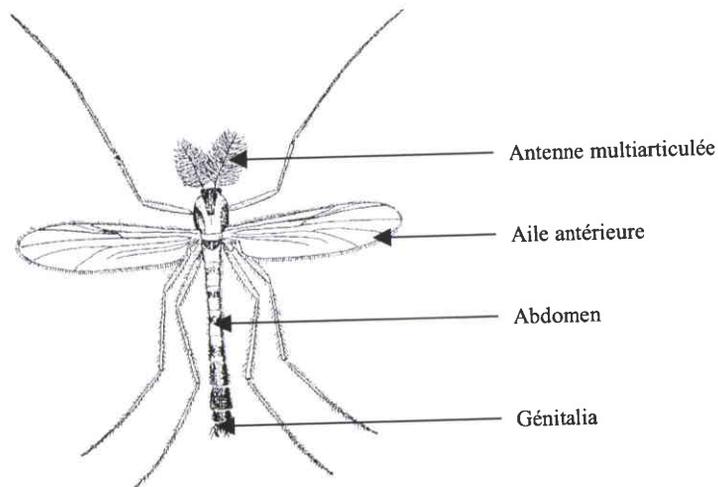


Figure 11. Morphologie simplifiée des adultes de chironome (d'après Tachet et al., 2000)

4.1.3. Cycle de vie *in natura*

En milieu naturel, le cycle biologique est principalement rythmé par les variations saisonnières de température et par la disponibilité des éléments nutritifs (Ristola *et al.*, 1999). En lien avec ces variables locales, et selon son aire de répartition géographique, cette espèce est univoltine (une génération par an) ou multivoltine (plusieurs générations annuelles).

Le cycle de vie (Fig. 12) se caractérise par 4 phases se déroulant dans des compartiments différents du milieu.

Les œufs sont pondus par paquets en eaux douces, à la surface de la tranche d'eau ou fixés sur les macrophytes, formant une masse gélatineuse en forme de C. L'éclosion survient quelques jours après la ponte (variable selon la température du milieu).

Les larves de premier stade sont planctoniques et se nourrissent de la masse nutritive qui entourait les œufs. Les larves de deuxième, troisième et quatrième stades vivent dans la couche superficielle des sédiments, à l'abri de fourreaux constitués de sédiments fins, et de débris (Rasmussen, 1984).

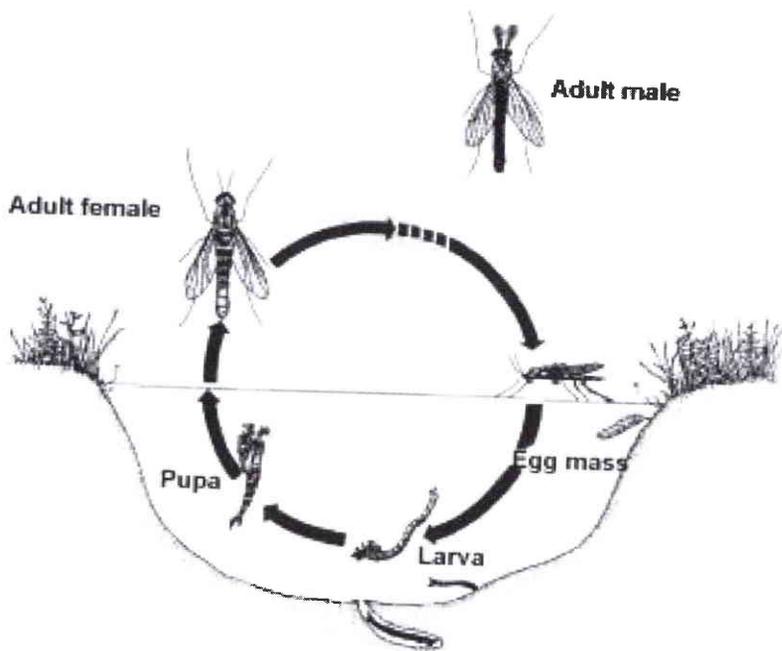


Figure 12. Schéma simplifié du cycle de vie de *Chironomus riparius* (d'après Ali, 1992).

Ces fourreaux protègent les larves des prédateurs (Baker et Bradnam, 1976) et des contaminants présents dans la colonne d'eau (Halpern *et al.*, 2002). Il est possible d'observer

des larves en croissance d'avril à octobre, date à laquelle elles entrent en diapause hivernale (Goddeeris *et al.*, 2001). Cette diapause permet la synchronisation du cycle de vie des organismes nés durant l'été.

Une fois leur croissance terminée, les chironomes procèdent à une métamorphose holométabole, qui se déroule à la surface de l'eau (Benoit *et al.*, 1997).

L'émergence des nymphes est bimodale, plus précoce chez les mâles que chez les femelles. Les imagos survivent 4 à 11 jours, période pendant laquelle ils se dispersent et se reproduisent. Contrairement aux mâles, chaque femelle ne se reproduit qu'une seule fois, puis meurt (Downe, 1973). La reproduction s'étend sur toute la saison estivale.

4.2. *Valvata (Cincinna) piscinalis*

4.2.1. Taxonomie et importance écologique

Les Valvatidae (Mollusques, Gastéropodes) forment un petit groupe d'espèces à aire de répartition très large dans la zone tempérée (Cleland, 1954 ; Bodon *et al.*, 2001). Ils partagent la même niche écologique que les pulmonés. Ce groupe d'espèces est caractérisé par de nombreuses modifications morphologiques par rapport aux autres Prosobranches, concernant la position et la structure des organes alimentaires, excréteurs et respiratoires. Ils possèdent aussi un système génital plus complexe que les autres Prosobranches, du fait de leur reproduction hermaphrodite (Cleland, 1954 ; Binder, 1967). Ils constituent ainsi la famille la plus évoluée de cette sous-classe (Ellis 1926, cité par Cleland, 1954), et donc la plus proche des Pulmonés (Young, 1975).

Valvata (Cincinna) piscinalis est une espèce très ancienne (fossiles datant de l'oolithique) et relativement polymorphe. Les écotypes se reconnaissent à l'ornementation et à la forme et de la coquille (Russell-Hunter, 1961 ; Binder, 1967 ; Falniowski *et al.*, 1988). Ce taxon est très commun en Europe et en Amérique du Nord (Oughton, 1938 ; Falniowski, 1988). Il domine le peuplement de nombreux lacs et cours d'eau méso-eutrophe à eutrophes (Fretter et Graham, 1978 ; Van den Brinck *et al.*, 1994 ; Mouthon, 2001). Cette espèce est localement abondante dans les habitats propices à son développement : en bord de rives de

rivière ou lacs, on peut observer jusqu'à 5000 individus / m² dans les zones à macrophytes (Van den Berg *et al.*, 1997). La densité de population est généralement corrélée avec la densité du couvert végétal qui constitue :

- une protection contre la prédation par les poissons ;
- une source de nourriture directe : les débris végétaux sont collectés dans le sédiment durant la saison froide ;
- une source de nourriture indirecte : les organismes se nourrissent du périphyton (algues, diatomées, bactéries) fixés à leur surface (Van den Berg *et al.*, 1997).

Le spectre alimentaire de ce gastéropode est large : il se nourrit de particules en suspension par filtration ou de microorganismes et de débris organiques qu'il racle sur les macrophytes ou dans le sédiment.

La présence de cet organisme dans l'écosystème est importante, puisqu'il constitue une source de nourriture importante pour les salmonidés, modifie la qualité des couches superficielles de sédiment *via* son activité alimentaire et produit des fèces riches en mucoprotéines qui constituent une nourriture abondante et facilement assimilable pour les organismes détritvovores du sédiment (Mouthon, 1982).

4.2.2. Eléments de morphologie

La morphologie de *V. piscinalis* a été entièrement décrite par Cleland (1954). Cet organisme présente une coquille à tours convexes et peu nombreux (Bernard, 1890 ; voir aussi Fig. 13). L'ouverture est circulaire, et présente l'opercule corné caractéristique des Prosobranches. Cet opercule peut se rétracter très profondément dans la coquille, protégeant ainsi l'organisme contre les agressions externes. Cette coquille, translucide, laisse apparaître le manteau de couleur jaunâtre ainsi que la présence d'œufs, visibles dans le dernier tour de spire au moment de la reproduction.

L'appareil reproducteur consiste en une glande hermaphrodite divisée en une partie femelle et une partie mâle, plus interne (Cleland, 1954). La maturation du sperme est plus précoce que celle des ovocytes, mais les deux types de gamètes sont présents chez l'adulte. Ces gastéropodes se reproduisent par fécondation croisée.

L'appareil respiratoire consiste en une branchie filamenteuse, bipectinée, en forme de plumet. En avant du corps, la présence d'un tentacule palléal, très long et plat, permet de

générer un courant d'eau dirigé vers la branchie. Ce courant facilite la respiration et l'excrétion, en évacuant les fèces de la cavité mantellaire.

Le tentacule palléal, ainsi qu'une paire de tentacules céphaliques, permettent à l'organisme d'explorer le substrat à la recherche de nourriture et de sites de pontes.

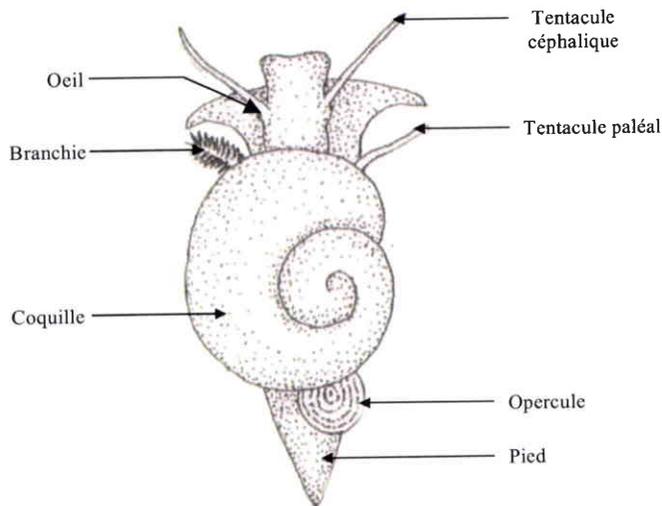


Figure 13. Morphologie simplifiée de Valvata (Cincinna) picinalis (d'après Tachet et al., 2000)

La morphologie des juvéniles est similaire à celle des adultes, si ce n'est que leur coquille est plate puisque constituée d'une seule spire (Fig. 14)

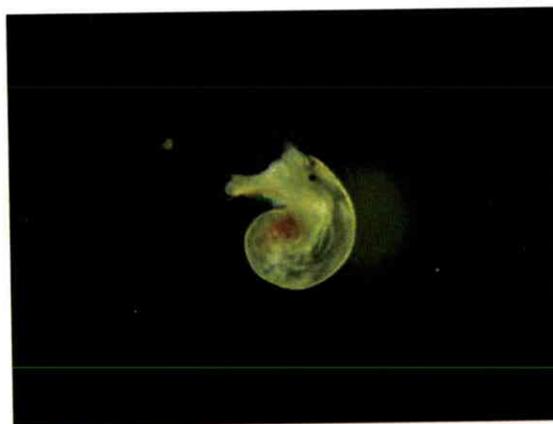


Figure 14. Morphologie du juvénile de Valvata (Cincinna) picinalis.

4.2.3. Cycle de vie *in natura*

Le cycle de vie (Fig. 15), de type annuel, a été complètement décrit par Cleland (1954), Russel-Hunter (1961) et Fretter et Graham (1978).

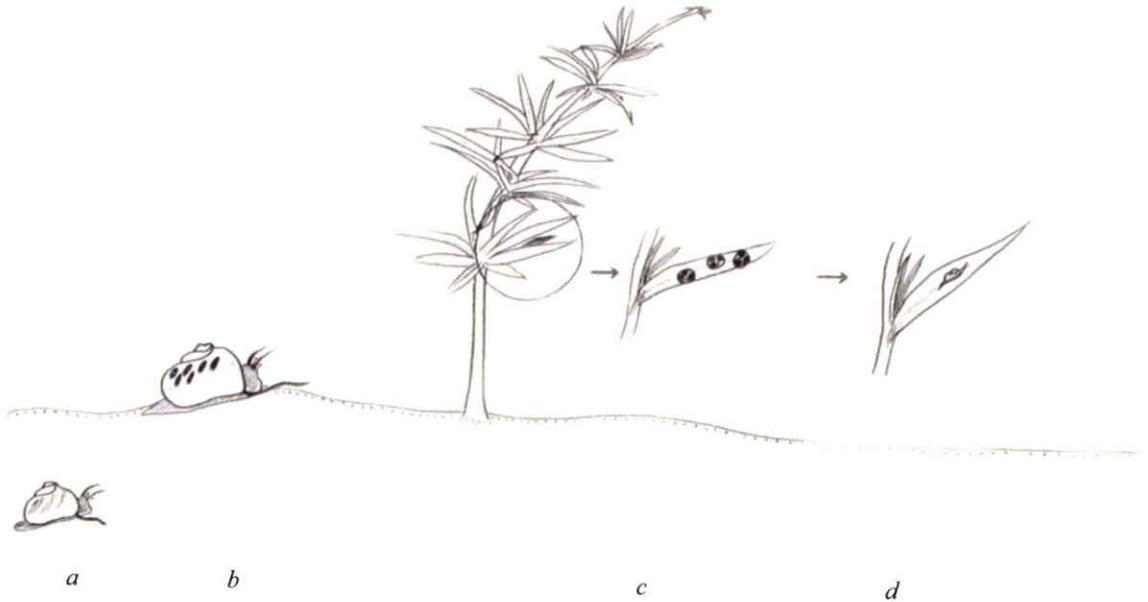


Figure 15. Schéma simplifié du cycle de vie de Valvata (Cincinna) piscinalis.
a : juvénile, b : adulte ovigère, c : capsules contenant les oeufs, d : nouveau-nés

Ce cycle se cale sur le développement printanier des macrophytes d'eau douce. En effet, le gastéropode vit dans le sédiment fin ou la vase en automne et en hiver. Au printemps, les individus pubères migrent du sédiment vers les macrophytes afin de se reproduire. Cette migration est guidée par un mécanisme de chémo-tactisme (Rittschof *et al.*, 2002). Elle n'est pas orientée vers un type de macrophytes en particulier (Heard, 1963).

Les pontes s'étalent d'avril à août avec un maximum en juin. Elles se présentent sous forme de capsules rigides et adhérentes, renfermant en moyenne une quinzaine d'œufs ellipsoïdes, verdâtres, organisés en chaînettes (Heard, 1963)(Fig. 16). La reproduction d'un individu comprend généralement 2 à 3 séries de pontes séparées de quelques semaines (*loc.cit.*).

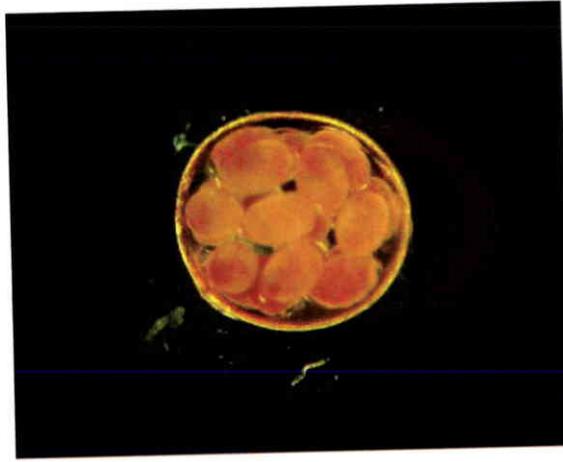


Figure 16. Capsule renfermant les œufs de Valvata (Cincinna) piscinalis.

Les adultes meurent entre la fin de l'été et le printemps suivant, après avoir donné naissance en moyenne à 150 juvéniles. Les juvéniles sont libérés de la capsule 12 à 30 jours après la ponte. Ils restent à la surface de la plante pendant 1 à 2 semaines, se nourrissant du biofilm, puis migrent dans le sédiment. Ils atteignent la maturité sexuelle au début de l'été suivant.

Hors période de reproduction, adultes et juvéniles sont observés dans les premiers centimètres de sédiments fins de la zone à macrophytes. Leur croissance est continue durant l'hiver (pas de dormance pendant la saison froide). Du fait de l'étalement des pontes durant tout l'été et de la survie d'une partie des adultes pendant l'hiver suivant la reproduction, la population présente des individus de chaque classe d'âge tout au long de l'année. Toutefois, les adultes qui se sont déjà reproduits sont facilement reconnaissables à leur taille et au rembrunissement de leur coquille.

4.3. *Branchiura sowerbyi*

4.3.1. Taxonomie et importance écologique

Branchiura sowerbyi (Oligochaeta, Tubificidae), unique espèce du genre, a été introduite en Amérique du Nord ainsi qu'en Europe à la fin du 19^{ème} siècle depuis la région sino-indienne (Beddard, 1892 ; Timm, 1980). Elle est aujourd'hui largement distribuée à travers le monde, aussi bien aux latitudes tempérées qu'en régions tropicales, dans une grande palette d'habitats benthiques (Carroll et Doris, 1972). Cet organisme thermophile s'observe surtout en bords de rivières et de lacs, et peut proliférer jusqu'à une densité avoisinant plusieurs milliers d'individus par m² de sédiments dans les zones riches en matières organiques. En régions tropicales, cet oligochète représente souvent l'espèce dominante du peuplement benthique des lacs, pouvant atteindre jusqu'à 60 % de la biomasse totale (Raburu *et al.*, 2002). La densité maximale observée est de 8850 individus au m² (Kikuchi et Kurihara, 1977). Un individu adulte pesant 33 mg en moyenne (poids humide, mesure *in vivo* (Bonacina *et al.*, 1994)), cet organisme représente biomasse importante dans les habitats favorables à son développement. En région tempérée, la densité maximale relevée avoisine les 600 individus par m² (Wang et Matisoff, 1997), mais les individus adultes sont beaucoup plus gros (jusqu'à 250 mg / individu).

De par son activité alimentaire, *B. sowerbyi* constitue un élément clé de la dynamique des couches superficielles de sédiment (Matisoff *et al.*, 1999). Le corps de l'animal est orienté verticalement dans le sédiment : il vit à l'intérieur d'une galerie creusée dans le substrat. La partie postérieure, portant le rectum, dépasse de 0,5 à 1 cm au-dessus de la surface du sédiment (Fig. 17). L'organisme ainsi placé ingère sélectivement les particules sédimentaires de faible diamètre (limons et argiles), se nourrissant de la matière organique et de la microflore fixée sur ces particules (Brinkhurst et Chua, 1969). Ce comportement alimentaire implique le transport d'une quantité importante de sédiment des zones « profondes » de la couche superficielle du substrat (40 cm) vers la surface. Ce transport a pour effet une modification physico-chimique du sédiment ainsi qu'une modification de la microflore sédimentaire.

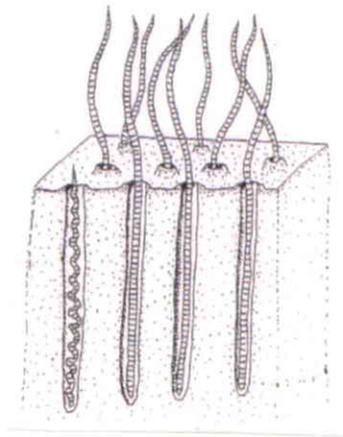


Figure 17. Groupe de Branchiura sowerbyi dans le sédiment (d'après Tachet et al., 2000)

Les principales conséquences de la présence de *B. sowerbyi* dans le substrat sont, d'après Kikuchi et Kurihara (1977) et Fukuhara *et al.* (1980) :

- une augmentation de la porosité du substrat, qui facilite les échanges ioniques entre l'eau porique et la colonne d'eau superficielle ;
- une remontée de nutriments favorisant la croissance des bactéries aérobies et du plancton ;
- une accélération du cycle du carbone (*via* le recyclage de la matière organique) ainsi que de l'azote (la modification du gradient d'oxydoréduction dans les sédiments favorisant les processus de nitrification et de dénitrification dans le substrat, selon Chatarpaul *et al.* (1980)).

4.3.2. Eléments de morphologie

La morphologie de *B. sowerbyi* a été entièrement décrite par Beddard (1892). Cet organisme se distingue des autres groupes d'oligochètes aquatiques de part sa taille (jusqu'à 15 cm pour 250 mg en moyenne chez les adultes de nos latitudes), ses appareils reproducteur et respiratoire, et la présence d'une cuticule (Fig. 18).

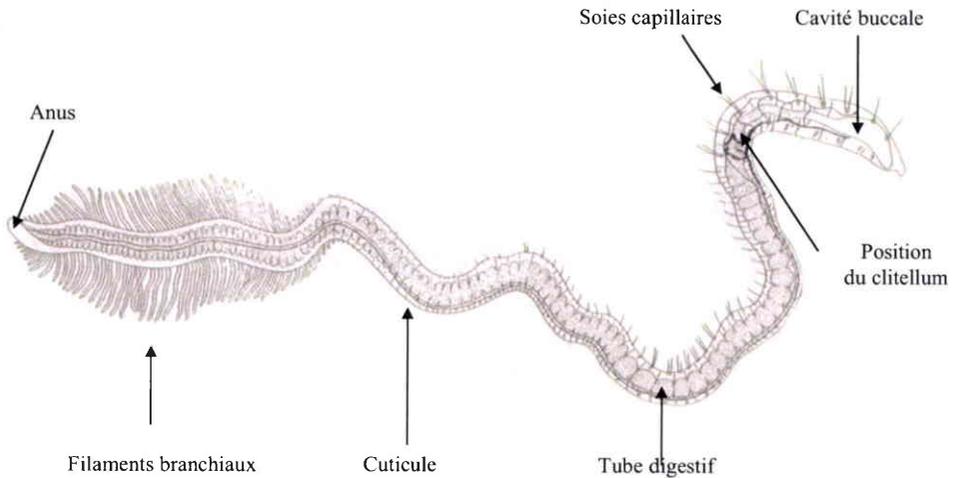
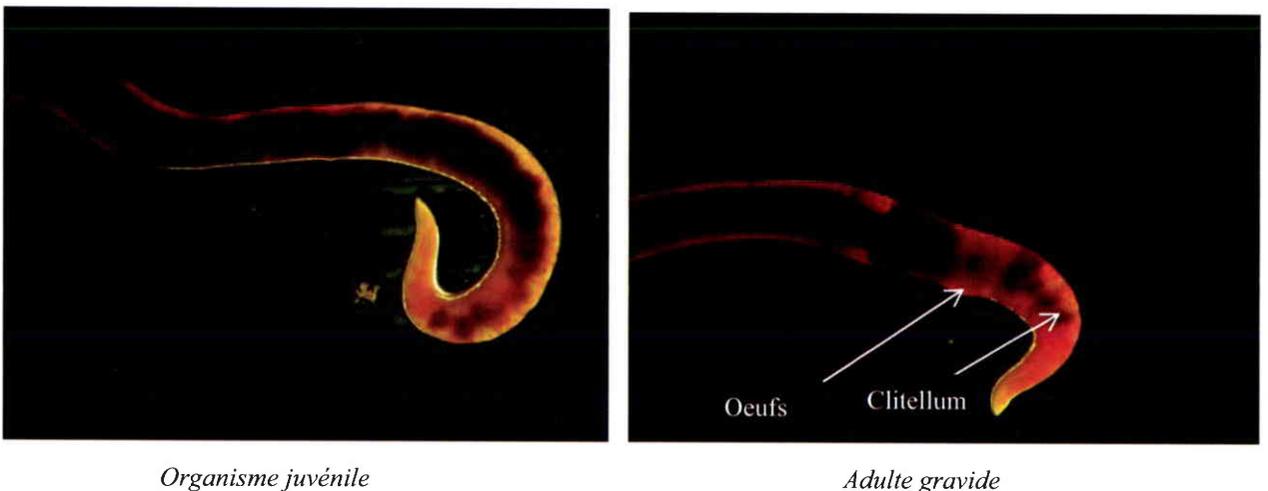


Figure 18. Morphologie simplifiée de *Branchiura sowerbyi* (d'après Beddard, 1892).

L'appareil reproducteur, de structure complexe, présente à la fois une partie mâle (segment 10) et une partie femelle (segment 11). La reproduction asexuée est possible mais exceptionnelle (M. Lafont, Comm. Pers.). Les organismes pubères sont facilement identifiables grâce à la présence du clitellum, un bourrelet de couleur blanchâtre situé au niveau des segments 10, 11 et 12. Ce bourrelet porte les orifices génitaux mâle et femelle (Beddard, 1892 ; Casellato *et al.*, 1987 ; voir aussi Fig. 19). De même, les individus gravides sont facilement reconnaissables grâce à la présence d'œufs, observables par transparence sous la peau dans les segments situés dans la région postérieure au clitellum.



Organisme juvénile

Adulte gravide

Figure 19. Comparaison de la partie antérieure chez l'individu immature et mature pour *Branchiura sowerbyi*.

Comme chez les autres Tubificidae, on note une régression partielle de l'appareil sexuel entre les périodes de reproduction de l'organisme (Lafont, 1989). Lorsque l'appareil sexuel a régressé, il existe une forte similarité morphologique et anatomique entre les adultes et les jeunes (Casellato *et al.*, 1987).

L'appareil respiratoire étant particulièrement adapté à la vie en milieux eutrophes, les organismes peuvent survivent et se reproduire sous des pressions partielles en oxygène de l'ordre de 20 % (Aston, 1973). *B. sowerbyi* se caractérise par la présence de filaments branchiaux caudaux recouvrant environ un tiers de sa longueur. Ces filaments sont richement vascularisés, la présence de branchies sanguines étant exceptionnelle chez les oligochètes (Drewes et Zoran, 1989 ; Tachet *et al.*, 2000). Leur présence permet d'identifier facilement ce taxon dès les plus jeunes stades de développement (Fig. 20) (Aston, 1968), alors que la plupart des oligochètes ne peuvent pas être identifiés *in vivo*. La partie postérieure de l'animal, portant les branchies, ondule hors du sédiment (Kawaguti, 1936 ; Zoran et Drewes, 1988). Ce comportement rend l'organisme facilement repérable pour les poissons, dont il constitue une source de nourriture abondante : les premiers protocoles d'élevage de *B. sowerbyi* ont ainsi été développés en vue d'une utilisation en pisciculture (Aston, 1982 et 1984).

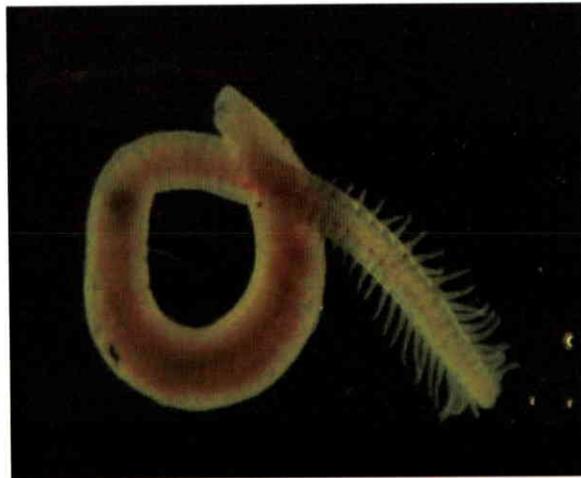


Figure 20. Morphologie du juvénile de Branchiura sowerbyi

4.3.3. Cycle de vie *in natura*

Le cycle de vie en milieu naturel a été totalement décrit par Carroll et Dorris (1972) et Yanling (1984). Ce cycle de vie (Fig. 21) est généralement annuel mais peut s'étendre jusqu'à 4 ans selon les conditions environnementales (Poddubnaya, 1980). La température et le contenu du sédiment en matières organiques ont un rôle prépondérant sur le développement de cet organisme (*loc.cit.*).

Le cycle de vie ne présente pas de période de diapause ou de quiescence hivernale permettant, comme chez le chironome, de synchroniser le développement des individus nés durant la même saison de reproduction. Ainsi, des prélèvements réalisés au printemps dans notre région permettent d'isoler :

- des juvéniles de grande taille (6 à 7 cm), qui atteindront la puberté en avril pour pondre en mai-juin ;
- des juvéniles de petite taille (3 à 5 cm), qui n'atteindront leur maturité sexuelle qu'en juillet, pour pondre en septembre.

L'effectif des nouveau-nés est plus restreint en septembre qu'en juin. En effet, 90% des femelles sont gravides en avril et se reproduisent au début de l'été. Cette proportion varie d'une population à l'autre selon la température et de la ressource trophique.

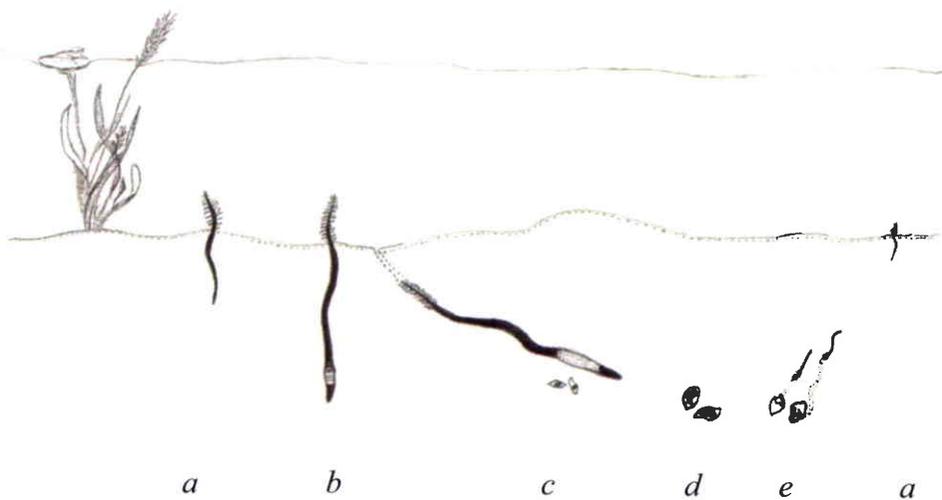


Figure 21. Schéma simplifié du cycle de vie de *Branchiura sowerbyi*. a : juvénile, b : adulte, c : adulte ovigère, d : cocons, e : nouveau-nés

B. sowerbyi se reproduit de façon sexuée. Chacun des organismes du couple, formé uniquement au moment de la reproduction, produit plusieurs cocons translucides contenant 1 à 5 œufs (ronds, jaunâtres et très gros : de l'ordre de 2 mm de diamètre, Fig. 22). Les juvéniles issus de ces cocons grandissent durant l'automne et l'hiver, et se reproduisent au printemps suivant. Les adultes s'étant reproduits meurent dans l'automne ou dans l'hiver.



Figure 22. Cocon de *Branchiura sowerbyi*.

Il est important de souligner que les conditions environnementales jouent un rôle clé dans la dynamique de population de cet organisme au cycle de vie très adaptable (Poddubnaya, 1980).

En cas de conditions environnementales défavorables, une acquisition de la maturité sexuelle trop tardive ne permet pas aux adultes de se reproduire durant l'été. On note alors une régression des organes génitaux durant l'automne, la reproduction étant différée à l'année suivante (cycle bi-annuel).

En cas de conditions environnementales favorables, les juvéniles nés au début de l'été peuvent se reproduire 4 mois après leur naissance. On observe alors deux cohortes d'organismes lors d'une même saison de reproduction (Carroll et Dorris, 1972).

Dans les régions tropicales, les conditions de température étant très favorables tout au long de l'année (température minimale nécessaire dans l'eau pour obtenir une reproduction : 10°C), nous ne pouvons plus distinguer de saison de ponte privilégiée (Raburu *et al.*, 2002).

4.4. Comparaison des traits biologiques et écologiques de nos espèces modèles par rapport aux caractéristiques moyennes de leur groupe fonctionnel.

Nous avons vu dans le paragraphe 3.2 qu'afin d'éliminer le « bruit de fond » lié au grand nombre de modalités représentées à faible fréquence dans chaque groupe fonctionnel, le représentant du groupe doit posséder une forte affinité pour la modalité la plus fréquente dans son groupe. Nous proposons donc ici une comparaison entre les traits biologiques et écologiques des représentants et les traits moyens de leur groupe.

Pour ce faire, nous avons décrit leurs profils biologique et écologique selon la méthode présentée au chapitre II. L'information dont nous disposons dans notre base de données est hétérogène du point de vue taxonomique. Le profil de *C. riparius* est obtenu en étudiant les traits au niveau de la tribu (*Chironomini*), celui de *V. piscinalis* est obtenu en étudiant les traits au niveau du genre (*Valvata*) et celui de *B. sowerbyi* est obtenu en étudiant les traits à l'espèce.

Les principales différences relevées entre les caractéristiques d'un groupe et celles de son représentant sont les suivantes :

- le spectre alimentaire du chironome est plus réduit que le spectre moyen de son groupe, bien qu'il reste dans la gamme de variation du groupe ;
- le spectre alimentaire du gastéropode est plus large que le spectre moyen de son groupe, bien qu'il figure lui aussi dans la gamme de variation du groupe.

La source de nourriture préférée de nos représentants est bien l'une des sources de nourriture utilisée par le groupe, mais elle ne correspond pas à la source de nourriture préférentiellement utilisée par le groupe. Cette variable est peu discriminante dans notre analyse de co-inertie (voir les rapports de corrélation, chapitre II, paragraphe 3.2.). Ainsi, nous admettons qu'une distribution des notes d'affinités partiellement similaire entre le groupe fonctionnel et son représentant est suffisamment pertinente pour cette variable, et nous supposons que ce manque de représentativité a probablement peu d'impact sur la pertinence écologique de notre batterie de tests.

Par ailleurs, ce manque de représentativité n'a probablement pas d'impact dans le cadre de la comparaison de la sensibilité de nos représentants en laboratoire, puisque :

- tous les organismes sont nourris avec les mêmes aliments durant les tests de toxicité ;
- les différences de sensibilité des organismes aux toxiques liées à l'alimentation proviennent plus des différences entre les modes d'alimentation (taux d'ingestion et efficacité d'assimilation de la nourriture) que des différences entre le type de nourriture consommée (voir Luoma et Rainbow (2005) pour les métaux et Granberg et Forbes (2005) pour une étude sur le pyrène).

Les différences biologiques entre nos représentants sont présentées dans le tableau VII. Elles concernent principalement leur taille, leur durée de vie, leur nombre de reproductions par an, leur mode de reproduction et leur mode de respiration.

Tableau VII. Principales différences biologiques et écologiques entre les trois espèces étudiées.

	<i>B. sowerbyi</i>	<i>C. riparius</i>	<i>V. piscinalis</i>
Taille maximale	Grande (15 cm)	Moyenne (1,5 cm)	Petite (0,6 cm)
Durée du cycle de vie	>1 an	<1 an	≥1 an
Nombre de reproduction par an	>1	≥1	1
Stades aquatiques	Tous	Œufs, larves, nymphes	Tous
Reproduction	Hermaphrodite	Sexes séparés	Hermaphrodite
Pontes	Cocon vitellin libre	Masse gélatineuse fixée	Capsule gélatineuse fixée
Respiration	Tégument/branchies	Tégument	Branchies
Formes de résistance	Cocon protecteur	Diapause larvaire	Aucune
Dispersion	Aquatique passive	Aérienne active	Aquatique passive
Amplitude du régime alimentaire	Réduite (Détritus <1mm)	Réduite (Détritus <1mm)	Large (des débris aux microorganismes vivants)
Mode d'alimentation	Mangeur de sédiment fin	Mangeur de sédiment fin	Racleur/filtreur
Préférendum de substrat	Limons & vase	Macrophytes & vase	Macrophytes & vase
Locomotion / Relation au substrat	Fouisseur Benthique (0-40 cm)	Rampant Epibenthique (0-10 cm)	Fouisseur Epibenthique (0-20cm)
Préférendum de température	Thermophile	Eurytherme	Eurytherme
Degré de trophie	Oligotrophe à Eutrophe	Eutrophe	Oligotrophe
Degré de saprobie	β-mésosaprobe	Mésosaprobe à polysaprobe	β-mésosaprobe

Ces trois espèces s'observant *in situ* dans la même niche écologique, leur preferendum de substrat, de température, de vitesse de courant, d'altitude et de salinité sont relativement similaires. Les principales différences écologiques entre nos espèces concernent leur mode d'alimentation, le type de nourriture utilisée (amplitude du régime alimentaire), leur relation au substrat, leurs degrés de trophie et de saprobie.

Parmi ces traits, les variables mode de reproduction, mode de respiration, relation au substrat, preferendum de nourriture et mode d'alimentation sont les traits dont la fréquence est modifiée en milieu pollué (par rapport à leur fréquence dans les communautés benthiques de référence – Archaimbault, 2003). Ceci indique que notre batterie de tests représente différentes modalités pour les traits impliqués dans la réponse des organismes aux toxiques sur le terrain. D'après ces observations, nous pouvons supposer que cette batterie permet de représenter au moins partiellement la gamme de réponse des espèces benthiques aux contaminants.

5. CONCLUSIONS DU CHAPITRE II

- ❖ La méthode proposée permet de réaliser une typologie des traits biologiques et écologiques rencontrés dans les communautés benthiques par quelques organismes qui composent une batterie de tests pour le laboratoire.
- ❖ La batterie obtenue correspond à une palette de traits biologiques et écologiques qui fournissent une représentation de la typologie de traits rencontrés dans la communauté, en liens avec sa structure et son fonctionnement. Dans notre approche, la notion de taxon « disparaît » donc au profit de la notion de combinaisons de traits.
- ❖ La batterie obtenue est site spécifique : elle est représentative de la communauté observée dans une zone typologique donnée (ici les sédiments de zone aval de cours d'eau).
- ❖ Seuls trois taxa sur les cinq composant initialement la batterie ont pu être étudiés au cours de cette thèse. La batterie réduite est composée des espèces suivantes : *B. sowerbyi*, *C. riparius* et *V. piscinalis*. Cette batterie réduite ne permet pas de représenter les organismes qui se reproduisent de façon asexuée, ni les organismes broyeurs.
- ❖ Les trois espèces sélectionnées représentent relativement bien les caractéristiques biologiques et écologiques moyennes de leur groupe fonctionnel, sauf pour le trait « preferendum de nourriture », pour lequel la gamme de réponse est très large à l'intérieur de chaque groupe.
- ❖ Les principales différences entre ces espèces concernent leur stratégie d'histoire de vie, ainsi que leur utilisation de l'espace et de la ressource alimentaire du milieu. Ces traits étant impliqués dans la sensibilité des organismes, nous supposons que la batterie de tests est au moins partiellement représentative de la gamme de réponse aux contaminants des espèces benthiques. En revanche, notre méthode ne permet pas de tenir compte du mode d'action du polluant étudié (à moins de procéder à certaines modifications que nous exposerons en discussion).

Liens avec les articles rédigés au cours de la thèse :

Le lecteur trouvera une discussion autour des aspects méthodologiques de la sélection des taxa (*i.e.* influence de la valeur des poids et du niveau d'acceptation des taxa dans la communauté théorique sur la structure de cette communauté, et influence du niveau de troncature sur la batterie d'organismes) dans l'article intitulé : « Using aquatic macroinvertebrate species traits to build test batteries for sediment toxicity assessment: accounting for the diversity of potential biological responses to toxicants » (Ducrot *et al.*, 2005).

CHAPITRE III

ELEVAGE, CARACTERISATION ET MODELISATION DU CYCLE DE VIE EN LABORATOIRE DE NOS ESPECES MODELES

Dans ce chapitre, nous décrivons tout d'abord le dispositif d'élevage pré-existant au laboratoire pour *Chironomus riparius*. Nous présentons par ailleurs les protocoles de prélèvement, d'acclimatation et d'élevage mis au point au cours de la thèse pour *Valvata (Cincinna) piscinalis* et *Branchiura sowerbyi*.

Les conditions d'élevage et d'expérimentation en laboratoire induisent une modification de certains traits d'histoire de vie des espèces, tels que leurs taux de survie, de croissance et de fécondité, par rapport aux valeurs observées dans la nature. Nous avons donc cherché à caractériser et à modéliser le cycle de vie de nos trois espèces au laboratoire.

Nous évoquons, en deuxième partie de ce chapitre, les raisons pour lesquelles nous avons choisi d'aborder les relations entre le cycle de vie des organismes et leurs traits biologiques et écologiques par la modélisation. Nous présentons ensuite le concept porteur de nos modèles, la gestion de l'énergie, ainsi que les différentes hypothèses biologiques qui s'y rapportent. Nous précisons par ailleurs les conditions expérimentales et les méthodes qui nous ont permis de caractériser le cycle de vie des organismes en absence de contaminant, et d'acquérir ainsi les données de base pour paramétrer nos modèles.

Les principaux paramètres du cycle de vie (niveau d'alimentation *ad libitum*, survie, croissance et reproduction) des trois espèces étudiées, et les modèles de survie, croissance et reproduction en conditions témoin, sont présentés en troisième partie de ce chapitre. Nous terminons par une synthèse comparative des paramètres du cycle de vie pour nos trois espèces. Les différents paramètres et équations utilisés sont recensés dans des tableaux récapitulatifs présentés en annexes 6 et 7.

1. PRELEVEMENTS, ACCLIMATATIONS ET ELEVAGES

1.1. *Chironomus riparius*

L'élevage existant au laboratoire est réalisé selon un protocole normalisé (AFNOR, 2004). Le dispositif expérimental est schématisé en figure 23. L'élevage est réalisé dans des aquariums de 20 litres contenant 1/10 de volume de sable de Fontainebleau de granulométrie 120 à 250 μm et 9/10 de volume d'un mélange d'eau de forage et d'eau osmosée, tel que la conductivité se maintienne entre 300 et 330 $\mu\text{S/cm}$ (dureté : 100 à 120 mg de CaCO_3/l , pH : 7,4 à 7,8 ; O_2 dissous : 8 +/- 1 mg/l). Cette eau est utilisée pour tous les élevages de notre laboratoire. Elle est continuellement renouvelée à débit fixe (80 l/jour). Un couvercle recouvre l'aquarium pour éviter la fuite des adultes. La température est maintenue à 23 °C +/- 1°C. La photopériode est de 16h/8h jour/nuit, l'intensité lumineuse étant comprise entre 500 et 1000 lux. Un bullage permanent permet de saturer le milieu en oxygène. La nourriture (Tétramin®) est délivrée sous forme d'un broyat à raison de 500 mg/aquarium/jour ouvré.

L'entretien de l'aquarium consiste en un nettoyage succinct toutes les semaines (les exuvies et les adultes morts sont retirés de la surface de l'eau) et un nettoyage des parois et éléments plastiques tous les mois.

La densité de population est régulée en retirant régulièrement des larves du substrat. Le nombre de larves pouvant être retirées de l'aquarium est laissé à l'appréciation du manipulateur.

Afin de permettre un brassage génétique, de nouveaux aquariums sontensemencés tous les 4 à 6 mois avec un mélange des masses provenant de nos autres aquariums ou d'autres laboratoires.

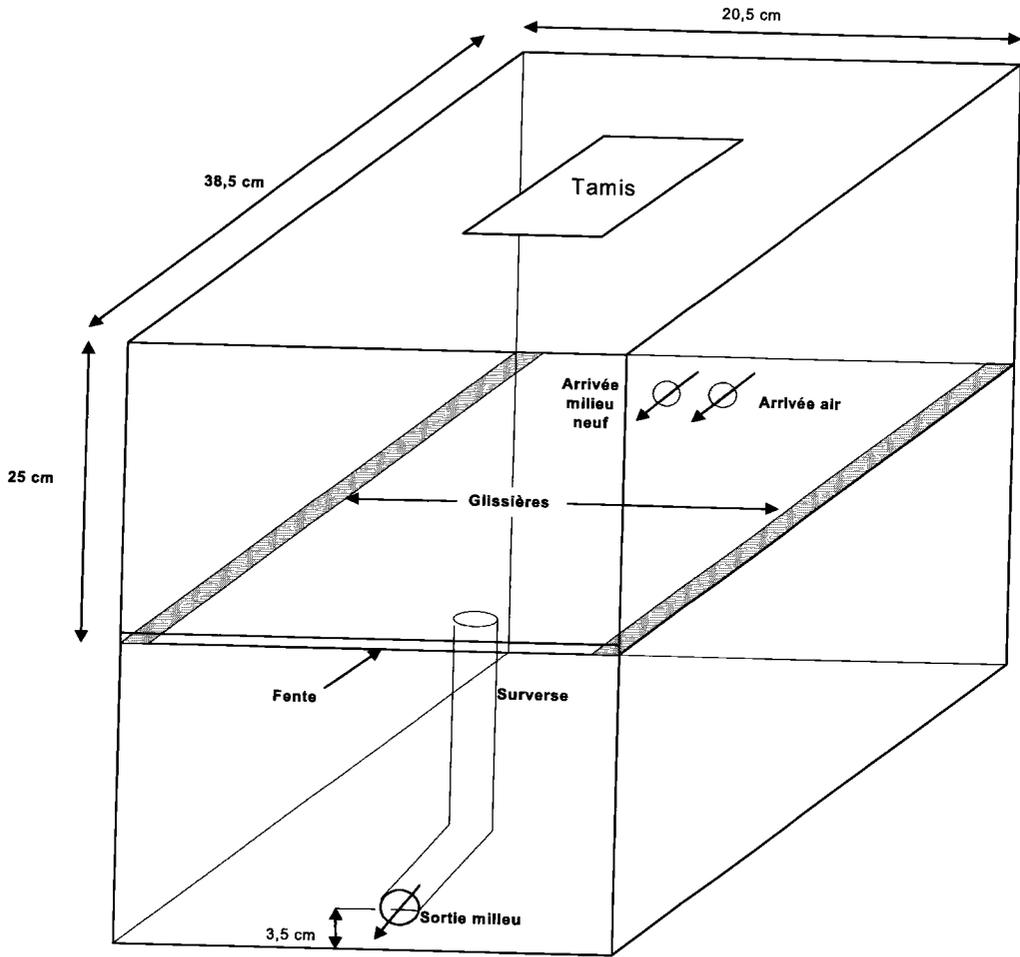


Figure 23. Dispositif expérimental utilisé pour l'élevage de Chironomus riparius

1.2. *Valvata (Cincinna) piscinalis*

1.2.1. Prélèvement et acclimatation

Les organismes utilisés pour démarrer une culture au laboratoire ont été prélevés dans le Rhône (contre-canal de Cresmalville, amont de Lyon). Les organismes ont été récoltés à l'aide d'un troubleau à base rectangulaire (25 × 18 cm), de vide de maille 630 µm, sur une surface de 1 à 2 m² (Mouthon et Dubois, 2001). Les individus ainsi capturés sont ramenés au laboratoire, puis triés afin de ne conserver que l'espèce recherchée. Cette espèce est facilement identifiée d'après la forme et l'ornementation de la coquille. A titre indicatif, l'échantillonnage de 1 m² de sédiment sur notre site de prélèvement (caractérisé par une densité plutôt faible de l'espèce recherchée) permet d'obtenir une soixantaine d'individus adultes. Cette quantité est suffisante pour lancer un élevage car les adultes prélevés au printemps commencent à se reproduire quelques jours après leur installation au laboratoire.

L'acclimatation de *V. piscinalis* aux conditions d'élevage débute au laboratoire, en introduisant les gastéropodes dans le sédiment naturel utilisé pour les élevages. La conductivité, le pH et la dureté de l'eau d'élevage étant relativement similaires aux valeurs relevées sur le site de prélèvement, les organismes peuvent être introduits directement dans cette eau. L'acclimatation nécessite simplement une augmentation graduelle de la température (de 12,5 à 21 °C à raison de 2 °C par heure).

Les deux premières tentatives d'acclimatation au laboratoire ne nous ont pas permis d'obtenir une population pérenne. Nous avons essuyé de fortes mortalités des adultes issus du terrain 15 jours après leur arrivée au laboratoire. Ces mortalités étaient dues à la présence d'une espèce commensale de la limnée : *Chaetogaster limnaei* (Oligochaeta) (Fig. 24) qui se nourrit du corps mou du gastéropode. Cet organisme a probablement été ramené du terrain.

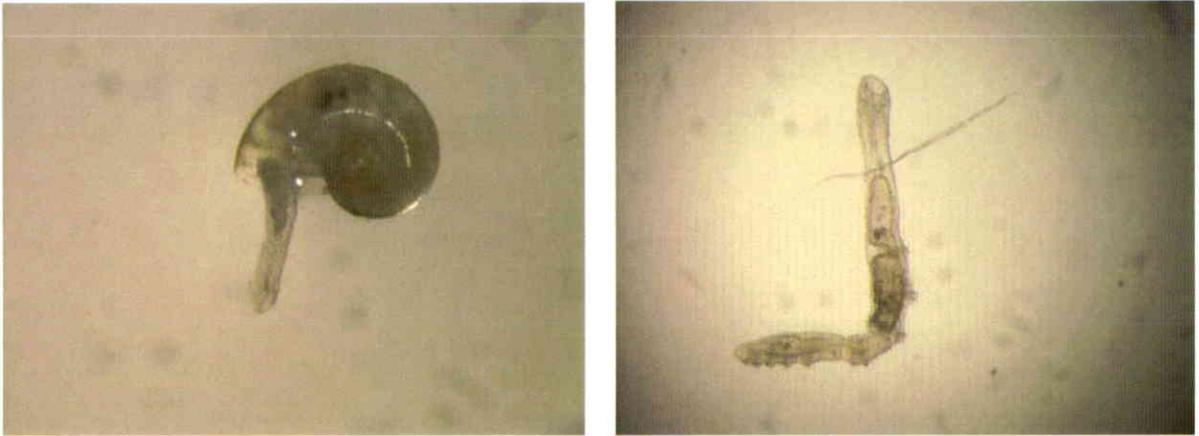


Figure 24. Présence de *Chaetogaster limnaei* dans la coquille de *Valvata (Cincinna) piscinalis*, et détail de cet oligochète.

Afin d'éviter la présence de cet oligochète, nous avons démarré les cultures de *V. piscinalis* non pas avec les organismes récoltés sur le terrain, mais avec les juvéniles de première génération. Pour ce faire, les adultes prélevés *in situ* ont été isolés dans un aquarium de quarantaine. Leurs pontes, qui ne sont pas attaquées par l'oligochète, ont été régulièrement prélevées et introduites dans un aquarium d'élevage indépendant.

1.2.2. Elevages

L'élevage des gastéropodes est réalisé dans des aquariums de 20 litres, similaires à ceux utilisés pour les chironomes. Le volume substrat/eau est de 1/10. Des essais préliminaires ont montré que l'utilisation de sédiment naturel permet d'obtenir une croissance et une reproduction plus rapide et plus importante qu'avec le sable quartzique utilisé pour l'élevage des chironomes. Le sédiment naturel utilisé a été choisi pour les propriétés suivantes (sa physico-chimie est présentée de façon détaillée en Annexe 4):

- sa granulométrie fine : 93% des particules ont une taille < 50µm ;
- son oligotrophie ;
- son faible niveau de contamination par les diverses familles de polluants.

Ce sédiment a été prélevé au niveau d'un bras mort de l'Ain, sur la commune de Port-Galland (01). Les dix premiers centimètres de la couche superficielle de sédiment ont été prélevés à la benne Eckman, à une profondeur d'environ 1,20 mètres. Les organismes endogènes ainsi que les particules végétales de grande taille ont été retirés de ce sédiment

grâce à un tamisage à 500 µm. Le sédiment a été congelé (- 80°C pendant 24h minimum) afin d'éliminer les œufs ou les formes de résistance d'organismes endogènes ayant pu passer au travers du tamis. Le substrat a ensuite été dégelé par paliers (-18°C, 4°C et température ambiante).

La décongélation du sédiment et sa remise en contact avec l'eau d'élevage provoque une rapide explosion bactérienne. Celle-ci se traduit par la production d'ions nitrites et ammonium, qui sont toxiques pour les invertébrés aquatiques à fortes concentrations. Un renouvellement important de l'eau de l'aquarium (200 l/jour, comme recommandé par l'ASTM (2000)) permet de maintenir les concentrations en nitrites et ammonium à un niveau bas. Une diminution du débit provoque une augmentation de la charge organique dans l'élevage. Ceci se traduit par l'apparition de vorticelles sur la coquille de l'organisme (Fig. 25). Ces dernières ne nuisent pas au développement du gastéropode, mais témoignent d'une mauvaise qualité du milieu.



Figure 25. Présence de vorticelles sur la coquille de Valvata (Cincinna) piscinalis

La température est maintenue à 21 °C +/- 1°C. La photopériode est de 16h/8h jour/nuit, l'intensité lumineuse étant comprise entre 500 et 1000 lux. Un bullage permanent permet de saturer le milieu en oxygène. Dans ces conditions, les individus se répartissent de façon homogène sur la surface disponible (sédiment, parois de l'aquarium) : ce comportement signale que l'élevage fonctionne bien, car les organismes stressés ont tendance à se regrouper.

L'entretien de l'aquarium consiste en un nettoyage succinct tous les mois (parois, surverse, arrivées d'eau et d'air). La densité de population est contrôlée mensuellement, en prélevant un volume donné de sédiment et en comptant l'effectif des organismes pour chaque classe d'âge de la population (juvéniles et adultes). Le prélèvement des organismes est réalisé en extrayant le sédiment à l'aide d'un siphon puis en le tamisant à 315 μm .

De nouveaux aquariums sontensemencés avec les pontes obtenues à chaque nouvelle cohorte (deux à trois fois par an).

Le régime alimentaire de *V. piscinalis* étant très large dans la nature, nous pouvons utiliser plusieurs types de nourriture pour maintenir cet organisme en élevage. Afin de déterminer quel type de nourriture permet une survie et une croissance optimale, ces paramètres ont été comparés pour des organismes nourris avec :

- un broyat de Tétramin®, (0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 et 1 mg/individu/jour) ;
- un broyat de Tabimin®, (0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 et 1 mg/individu/jour) ;
- une solution mixte d'algues : 0,125 mg de spiruline/individu/jour + une quantité variable de *Scenedesmus sp.* (9×10^4 ; 18×10^4 et 36×10^4 cellules algales/individu/jour).

La Tétramin® et la Tabimin® représentent des mélanges de matière organique d'origine animale et végétale, tandis que les deux derniers aliments correspondent respectivement à un broyat d'algues lyophilisées et à une algue vivante.

Trois réplicats ont été réalisés pour chacun des régimes alimentaires testés. Dix juvéniles (taille moyenne proche de 1mm) ont été placés à 21°C, dans 500 ml d'eau d'élevage aérée, avec un éclairage de 1000 lux (16h jour/8 h nuit), et nourris pendant 21 jours. Les survivants ont alors été dénombrés et mesurés à l'aide d'une loupe binoculaire équipée d'un micromètre.

A l'issue de ce test, les survies étaient équivalentes pour chacun des régimes alimentaires testés. Les organismes nourris avec des algues en suspension (*Scenedesmus sp.* ou spiruline) n'ont pas ou peu grandi. La nourriture a pourtant été ingérée par le gastéropode, puisqu'il n'y avait pas de restes dans les enceintes de test. Il semble que les algues, obtenues par filtration du milieu dans notre dispositif, ne puissent pas être digérées par les gastéropodes (Cleland, 1954). Un résultat similaire avait déjà été obtenu avec *Scenedesmus sp.* par Tsikhon-Lukanina (1961). Les organismes nourris avec de la Tétramin® ou de la Tabimin® ont présenté une

croissance globalement similaire. Afin de diversifier l'origine de l'alimentation (animale ou végétale), nous avons donc choisi de nourrir les organismes en alternance avec un broyat de Tétramin® et de Tabimin®. La quantité de nourriture délivrée dans chaque aquarium a été fixée à 0,2 ou 0,4 mg/individu/jour ouvré, en fonction de l'âge des organismes.

1.3. *Branchiura sowerbyi*

1.3.1. Prélèvement et acclimatation

Les organismes utilisés pour l'initiation d'une culture au laboratoire ont été prélevés sur le terrain. Le site de l'Ile Barbe (rive droite du Rhône, amont de Lyon) a été retenu comme point de prélèvement des oligochètes pour sa proximité du laboratoire et son faible niveau de contamination chimique.

Le sédiment (sable fin) est prélevé au moyen d'une drague, puis précautionneusement tamisé à l'aide de deux tamis disposés en colonne (ouverture 500 µm et 1 mm). L'espèce recherchée est différenciée *in vivo* des autres espèces d'oligochètes du fait de sa grande taille et de la présence de filaments branchiaux caudaux. L'étape de tamisage est délicate puisqu'un stress de l'organisme déclenche une réaction d'autotomie, rendant l'identification impossible. A titre indicatif, le tamisage de 90 l de sédiment sur notre site de prélèvement (caractérisé par une densité relativement faible de l'espèce recherchée) permet d'obtenir une centaine d'individus entiers, dont la taille varie entre 3 et 12 cm. La réalisation du prélèvement en juin permet d'isoler des organismes pubères dont certains sont déjà gravides.

L'absence de substrat induit un stress intense et durable chez *B. sowerbyi* : les organismes se regroupent en une « boule » compacte, au sein de laquelle les individus finissent par mourir. Afin d'éviter ce comportement, l'acclimatation des organismes aux conditions d'élevage débute dès le prélèvement : les oligochètes sont introduits dans le substrat utilisé pour les élevages, en présence d'eau provenant du site de prélèvement. L'acclimatation au laboratoire nécessite simplement d'adapter graduellement la température (de 18 à 23 +/-1 °C à raison de 2°C par heure), la conductivité (de 420 à 330 +/-30 µs/cm), le pH (de 7,81 à 7,75) et la dureté de (180 à 100 mg/l CaCO₃) du milieu. Ceci est réalisé en ajoutant progressivement l'eau d'élevage à l'eau du terrain.

1.3.2. Elevages

L'élevage des oligochètes est réalisé dans des aquariums de 20 litres, similaires à ceux utilisés pour les chironomes et les mollusques. Ces aquariums sont remplis au tiers de sédiment afin de permettre aux organismes de s'enfouir verticalement dans le substrat. L'oligochète présente une croissance et une fécondité moindre lorsqu'il est élevé sur le sable quartzique utilisé pour l'élevage des chironomes. Nous utilisons donc le sédiment naturel de Port-Galland (préalablement tamisé à 500 μm et congelé à -80°C) comme substrat pour nos élevages. L'utilisation de ce sédiment naturel nécessite un renouvellement important de l'eau de l'aquarium (200 l/jour (ASTM, 2000)). La température est maintenue à $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, valeur assurant une croissance et une reproduction optimales (Aston *et al.*, 1982). La photopériode est de 16h/8h jour/nuit, l'intensité lumineuse étant comprise entre 500 et 1000 lux. Un bullage permanent permet de saturer le milieu en oxygène.

L'entretien de l'aquarium consiste en un nettoyage succinct tous les 15 jours (parois, surverse, arrivées d'eau et d'air). La densité de population est contrôlée mensuellement, en prélevant un volume donné de sédiment et en comptant l'effectif des organismes dans chaque classe d'âge de la population (œufs, juvéniles, adultes gravides et non gravides). Le prélèvement des organismes est réalisé en extrayant le sédiment à l'aide d'un siphon puis en le tamisant à 315 μm . Lorsque l'appareil sexuel a régressé, il existe une forte similarité morphologique entre les adultes et les juvéniles (Casellato *et al.*, 1987). Cette similarité complique la gestion de la dynamique de population en laboratoire : il est donc nécessaire de réaliser un suivi régulier de l'état de la population afin d'être toujours en mesure de différencier les adultes non gravides des juvéniles.

La quantité et le type de nourriture permettant une survie et une croissance optimales de l'oligochète ont été déterminées grâce à des tests similaires à ceux réalisés pour le mollusque. Deux types de nourriture pour poisson ont été testés. D'après les résultats de ces tests, la nourriture est constituée en alternance d'un broyat de Tétramin® et de Tétracichlid®, délivré dans chaque aquarium à raison de 1,2 ou 2,4 mg/individu/jour ouvré, en fonction de l'âge des organismes. Le rendement de l'élevage est directement lié à la quantité de matière organique disponible pour les oligochètes, apportée *via* le sédiment et l'alimentation quotidienne. Un tiers du volume initial de sédiment est donc rajouté tous les mois, afin de maintenir la qualité nutritive du milieu d'élevage. La modification de la quantité ou de la

qualité de ces ressources permet un contrôle de la durée du cycle de vie des oligochètes et de leur fécondité.

Une étude préliminaire de l'évolution des organismes prélevés sur le terrain a été réalisée dans le but de mieux connaître le cycle de vie de l'oligochète en laboratoire, afin de définir le meilleur plan d'expérience possible pour les essais définitifs. Des individus matures ont été isolés dans des béciers à 25°C, sous aération et alimentés à raison de 1 mg de Tétramin®/individu/jour. Ces individus se sont reproduits 4 fois, à un intervalle régulier de 1 mois environ. Lors de leur troisième reproduction, 8 % des juvéniles étaient porteurs d'une branchie surnuméraire (Fig. 25). Cette modification anatomique n'est pas un artéfact de laboratoire : elle s'observe aussi dans la nature (Dumnicka et Kasprzak, 1979).



Figure 25. Partie postérieure d'un juvénile de *Branchiura sowerbyi* issu de la troisième reproduction du même parent (photo prise sur un organisme âgé d'une semaine environ).

Ces organismes ont été isolés, afin de voir si la présence de cette seconde branchie influence leur développement. La branchie surnuméraire ne régresse pas au cours de la croissance et prend des proportions identiques à la branchie « initiale » (Fig. 26).

A 21 jours, le taux de survie des organismes bifides n'est que de 25%, contre 81 % pour les individus normaux. De plus, les organismes bifides n'ont pas bien grandi : ils pèsent en moyenne 3,59 mg alors les individus normaux pèsent en moyenne 40 mg.

A 32 jours, la survie des organismes anormaux n'est plus que de 2%. Leur poids moyen est de 3,62 mg, contre 71,7 mg pour les individus normaux, ces derniers ayant commencé à se reproduire. Les organismes anormaux ne sont donc pas viables dans nos conditions expérimentales.



Figure 26. Partie postérieure d'un juvénile de *Branchiura sowerbyi* issu de la troisième reproduction du même parent (photo prise sur un organisme âgé de 4 semaines environ).

Ce résultat se vérifie sur le terrain : seulement 1 organisme bifide pour 25000 individus normaux atteint la maturité sexuelle (Naitoh et Takabatake, 1995). Ces auteurs ont mis en évidence des modifications physiologiques chez les juvéniles pourvus de l'organe surnuméraire. Ces modifications sont probablement à la source de leurs problèmes de développement. La cause de ces anomalies n'est pas connue. Cependant, la plupart des modifications morphologiques observées chez les oligochètes ont une origine tératogène (Dumnicka et Kasprzak, 1979). Nous supposons, sans pouvoir tester cette hypothèse, que dans notre cas, la présence d'individus anormaux est le résultat du vieillissement des géniteurs.

Ceci souligne l'importance du contrôle de la dynamique des populations d'élevage. Le fait de s'assurer que les géniteurs se sont reproduits moins de trois fois permet d'obtenir des juvéniles sains et viables pour les bioessais. Afin de contrôler la densité, l'âge et le nombre de reproductions déjà réalisées par les individus dans chaque aquarium, de nouveaux aquariums sontensemencés avec les juvéniles obtenus à chaque nouvelle cohorte (environ tous les six mois). Après leur première ponte, les géniteurs sont stockés dans une réserve d'organismes, utilisables en cas de problème dans l'élevage. Après leur seconde ponte, les géniteurs sont sacrifiés.

2. CARACTERISATION ET MODELISATION DU CYCLE DE VIE DES ESPECES ETUDIEES EN LABORATOIRE : PRINCIPES ET METHODES

2.1. Technique d'analyse des données : la modélisation

La modélisation biologique est actuellement en plein développement (Jackson *et al.*, 2000). En effet, elle permet de dépasser l'approche statistique qui ne repose sur aucun fondement biologique (Chew et Hamilton, 1985) et qui est souvent mal adaptée à la description de la croissance et de la reproduction (Vindimian, 2000). Ainsi, les intérêts majeurs de la modélisation, par rapport aux méthodes descriptives, sont les suivants :

- pouvoir tester des hypothèses concernant la survie, la croissance et la reproduction ;
- pouvoir prédire l'évolution des traits étudiés en fonction de l'âge ou de la taille des organismes ;
- pouvoir identifier les variables biologiques et écologiques pertinentes dans le cadre de la description de la survie, de la croissance et de la reproduction ;
- pouvoir hiérarchiser l'importance relative de ces variables.

Cette conceptualisation permet de réfléchir aux hypothèses biologiques concernant les effets toxiques lors de la construction des modèles et de conclure sur les données expérimentales à acquérir. Cette approche permet de converger peu à peu vers les meilleures hypothèses et le meilleur plan expérimental possible.

2.1.1. La variable explicative privilégiée au niveau individuel : l'énergie

Tout organisme vivant a besoin d'énergie pour assurer sa survie, son activité, sa croissance et sa reproduction. L'étude de la gestion de l'énergie chez un organisme vivant est le moyen à la fois le plus direct et le plus pertinent pour rendre compte des relations existant entre les principaux traits d'histoire de vie au niveau individuel, tels que l'alimentation, la croissance, la reproduction et le vieillissement. Ces relations obéissent à des règles qui décrivent de façon qualitative et quantitative comment les organismes vivants acquièrent et utilisent l'énergie pour assurer leurs fonctions vitales. La bioénergétique apparaît donc bien comme une clé d'interprétation du cycle de vie des organismes.

A partir de lois de conservation de l'énergie, différentes règles d'allocation d'énergie ont été formulées puis formalisées en langage mathématique. Ces travaux ont donné naissance à différents modèles de gestion de l'énergie, de complexité et de champ d'applicabilité très variables, depuis des modèles généralistes, applicables à la plupart des espèces, jusqu'aux modèles taxon-spécifiques. L'hypothèse fondamentale de ces modèles est que les « variables d'état » de l'organisme (âge, taille, réserves énergétiques, etc.) et de l'environnement (densité de nourriture, température, etc.) déterminent complètement l'histoire de vie des individus en termes de survie, de croissance et de reproduction (Lika et Nisbet, 2000).

Dans le cadre de la comparaison des caractéristiques biologiques de différentes espèces, il est recommandé d'utiliser des modèles simples et généralistes (*loc.cit.*).

Une approche simple de la gestion de l'énergie consiste à faire le bilan entre les gains et les pertes d'énergie. Ce concept a donné naissance aux modèles de type « scope for growth » (SFG), basés sur la quantification de la différence entre l'énergie obtenue par l'organisme à partir de la nourriture et l'énergie perdue pour l'excrétion et la respiration ou utilisée pour la croissance et la reproduction (voir Bayne (1998) pour une revue et une mise en équations).

Ces modèles ont été largement utilisés afin de rendre compte des effets des variations de facteurs environnementaux, tels que la température et la disponibilité de la nourriture, sur la croissance et la reproduction, en particulier chez les mollusques et crustacés marins (*e.g.* application à la gestion des stocks d'huîtres (Pouvreau *et al.* 2000)). Ils ont aussi été validés dans le cadre de l'étude des effets toxiques sur la croissance et la reproduction de quelques espèces d'invertébrés benthiques au laboratoire (Maltby *et al.*, 1990a) et sur le terrain (Maltby *et al.*, 1990b).

Concrètement, ces modèles requièrent un suivi dans le temps de plusieurs paramètres écophysologiques : le taux d'ingestion de la nourriture, le taux de production de faeces et pseudo-faeces, le taux d'excrétion et le taux de respiration. Le suivi de ces paramètres au cours du temps rend le plan d'expérience correspondant relativement lourd en terme de charge de travail. Il est donc difficile d'envisager l'utilisation des tels modèles pour décrire les données issues de tests de longue durée, comme ceux réalisés pour *V. piscinalis* ou *B. sowerbyi*.

Par ailleurs, ces modèles sont spécifiques à une espèce, voire à un site d'étude pour cette espèce. Dans le cadre de la comparaison des caractéristiques biologiques des différentes espèces, nous avons besoins d'approches plus généralistes.

Une approche généraliste de la gestion de l'énergie chez les organismes a été proposée par Kooijman (2000), sous le nom de « Dynamic Energy Budget theory » (théorie DEB). Cette théorie a pour objectif d'analyser de façon quantitative, à partir d'un ensemble de constats physiologiques traduits en équations différentielles, les effets de l'environnement sur les fonctions biologiques des organismes vivants (nutrition, assimilation, maintenance des cellules, croissance, reproduction et vieillissement). Cette approche consiste à quantifier la quantité d'énergie acquise par l'organisme par unité de temps et à établir des règles d'allocation de cette énergie entre les traits d'histoire de vie fondamentaux : la survie, la croissance et la reproduction.

La quantité d'énergie acquise par l'organisme par unité de temps dépend premièrement de la quantité et de la qualité des ressources présentes dans son environnement. Dans le milieu naturel, ces paramètres fluctuent aussi bien spatialement que temporellement. En laboratoire, les organismes bénéficient d'une alimentation de qualité et de quantité constantes et connues. Dès lors, la quantité d'énergie acquise par unité de temps ne dépend plus que de l'âge et de l'activité métabolique de l'organisme.

L'activité métabolique des organismes n'étant généralement pas mesurée lors des tests, les modèles de gestion de l'énergie ont été construits de façon à rendre compte de la quantité d'énergie acquise par l'organisme par des descripteurs plus globaux que les paramètres écophysiologiques. Ces descripteurs sont la taille et la fécondité.

L'énergie acquise est répartie entre trois grandes fonctions physiologiques : la croissance, la maintenance et la reproduction. Cette répartition obéit à des règles d'allocation de l'énergie, qui constituent le fondement biologique des modèles. Selon Kooijman (1993, 2000), l'énergie stockée par l'organisme se répartit de la manière suivante : une portion constante d'énergie (κ) est affectée à la croissance et à la maintenance somatique, alors qu'une portion $(1 - \kappa)$ est affectée à la maturation des organes sexuels, à leur maintenance et à la reproduction (Fig. 27). D'après Kooijman (2000), cette loi de répartition de l'énergie est valable chez tous les êtres vivants : seuls les valeurs des paramètres du modèle varient en fonction de l'espèce étudiée.

Parallèlement à la théorie DEB a été proposée la théorie métabolique en écologie (MTE) (Brown *et al.*, 2004). Cette théorie a pour but de décrire le fonctionnement des systèmes vivants à différentes échelles (de l'individu à la biosphère) sous l'hypothèse que le « taux métabolique » individuel définit l'ensemble des activités biologiques à ces différentes

échelles. Ce taux métabolique est une valeur globale, qui permet de décrire le rythme d'acquisition et d'utilisation de l'énergie par l'organisme. Concrètement, chez les organismes hétérotrophes, il est égal au taux de respiration. Dans ce cadre théorique, la survie, la croissance et la reproduction des individus peuvent être prédits à partir d'un bilan gains / pertes d'énergie basé sur l'étude du taux de respiration.

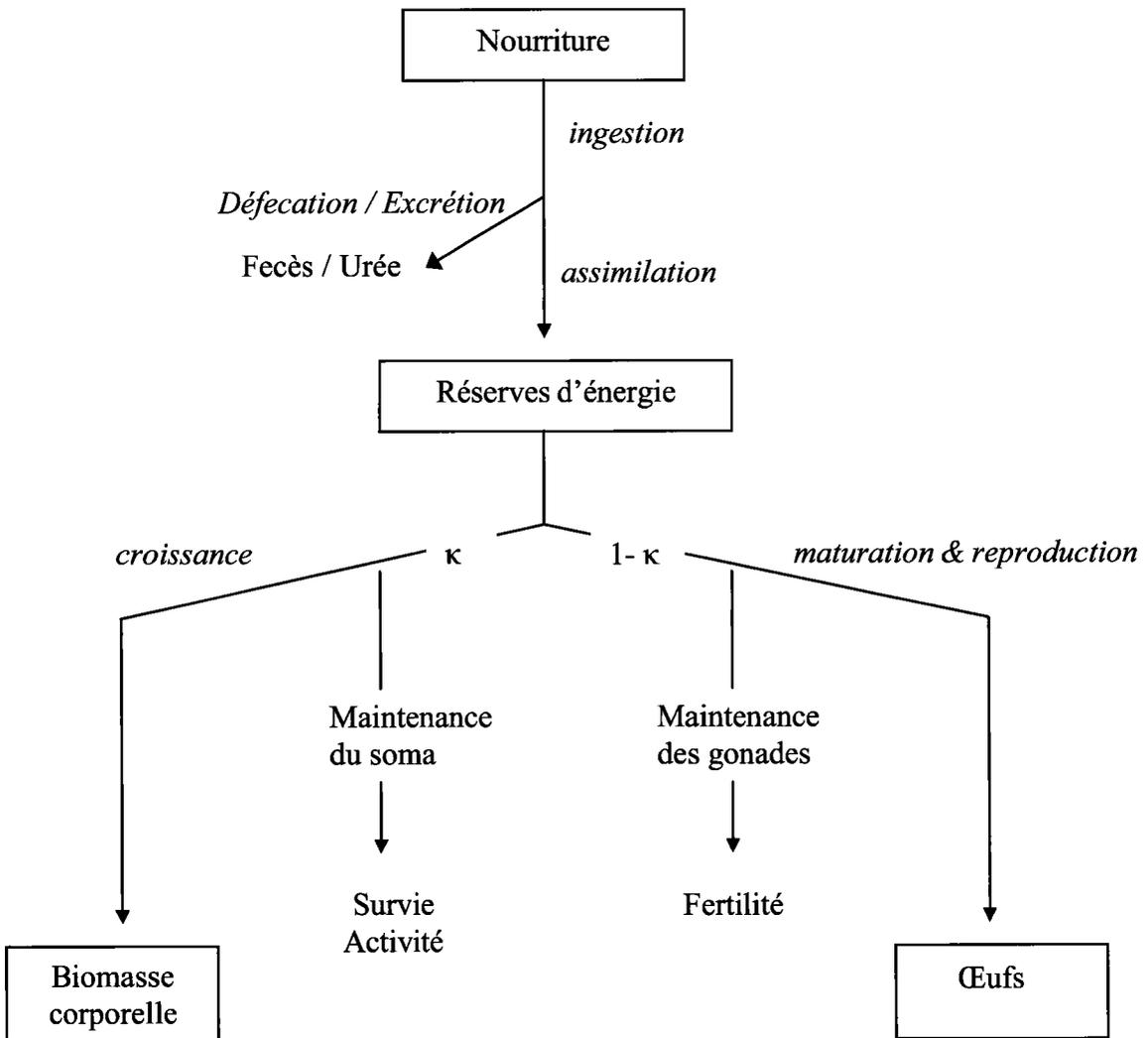


Figure 27. Représentation schématique simplifiée de la répartition de l'énergie aux différentes fonctions biologiques vitales selon la théorie DEB (Kooijman, 1993, 2000).

Les hypothèses biologiques soutenant les deux théories sont relativement similaires : l'allocation d'énergie aux différentes fonctions vitales est réalisée selon les lois de conservation de l'énergie et contrôlée par quelques paramètres clés, tels que la taille de l'organisme et la température du milieu. Cependant, deux différences importantes doivent être soulignées.

Premièrement, dans la théorie MTE, l'allocation d'énergie à la maintenance est directement soustraite de la part d'énergie disponible (l'énergie restante se partage entre croissance et reproduction) alors que dans la théorie DEB, cette énergie fait partie du budget alloué à la croissance.

Deuxièmement, le formalisme mathématique des deux modèles est différent. Dans la théorie MTE, les paramètres impliqués dans la modélisation des flux d'énergie dépendent les uns des autres selon des relations fractales, alors que dans la théorie DEB, ces relations sont basées sur l'échelle géométrique euclidienne.

Aucun argument ne nous permet de rejeter l'une ou l'autre de ces théories. Cependant, nous avons retenu les modèles de types DEB par rapport aux modèles de type MTE car :

- les variables clés des modèles DEB correspondent aux critères d'effets biologiques classiquement mesurés en écotoxicologie (survie, croissance et reproduction des organismes). L'utilisation de ces modèles ne requiert donc pas de mesures écophysiologiques, qui sont une charge de travail supplémentaire lors des tests ;
- leur formulation mathématique plus simple, ce qui facilite à la fois la compréhension et l'utilisation de cet outil ;
- enfin, il existe des logiciels informatiques (*e.g.* logiciel DEBtox®) qui facilitent l'analyse des données brutes et permettent le calcul d'intervalles de confiance sur les paramètres du modèle.

2.1.2. Principales hypothèses de la théorie DEB utilisées lors de la thèse

Nous exposons ici les hypothèses biologiques sur lesquelles sont fondées les modèles bioénergétiques utilisés lors de la thèse. Ces hypothèses sont issues de la théorie DEB. D'après Kooijman (2000), ces hypothèses sont suffisamment généralistes pour s'appliquer à toutes les espèces vivantes :

1. Trois types d'individus sont distingués, en fonction de leurs gains et pertes d'énergie :
 - les embryons, qui ne mangent pas, grandissent mais ne se reproduisent pas ;
 - les juvéniles, qui mangent, grandissent mais ne se reproduisent pas ;
 - les adultes, qui mangent, grandissent, et se reproduisent.

Deux types de courbes de croissance sont possibles : la croissance « finie » (*i.e.* l'adulte cesse de grandir une fois qu'il a atteint une taille maximale caractéristique de l'espèce étudiée) et la croissance « infinie » (*i.e.* l'adulte ne cesse pas de grandir au cours de sa vie. Cependant, sa vitesse de croissance se ralentit avec l'âge : il tend ainsi vers une taille asymptotique caractéristique de la population étudiée et dépendante des conditions environnementales).

2. Pour les individus qui mangent, la quantité de nourriture assimilée par l'organisme est proportionnelle à la taille (car elle est limitée par la surface de son intestin) et dépend de la quantité de nourriture disponible dans le milieu de façon hyperbolique.
3. La fraction non assimilable de la nourriture est convertie en fèces, tandis que la fraction assimilable est convertie en réserves. Pour un type de nourriture donné, l'efficacité de la conversion de cette nourriture en réserves est constante chez les organismes témoins, quel que soit l'âge et le statut physiologique de l'organisme.
4. L'énergie présente dans les réserves est utilisable pour différents processus, tels que la maintenance somatique et gonadique de l'organisme, sa croissance, la maturation de son appareil génital et sa reproduction.
5. Les règles d'allocation de l'énergie entre ces processus sont bien définies : une fraction κ de la quantité d'énergie est investie pour la maintenance et la croissance somatique. Cette fraction est constante au cours de la vie de l'organisme. Le reste de l'énergie est utilisé pour la maturation des gonades, puis pour leur maintenance et pour la reproduction (voir Fig. V.1.).
6. L'énergie investie dans la fabrication de la biomasse n'est pas re-mobilisable (les organismes ne peuvent pas maigrir). Seule l'énergie stockée dans le compartiment de réserves est disponible.

7. La fonction prioritaire de l'organisme est la survie (maintenance) : la gestion du stock d'énergie contenu dans les réserves est donc modulée pour que les coûts de maintenance soient toujours couverts. Ceci se réalise en détournant de l'énergie destinée soit à la croissance, soit à la maintenance des gonades et à la reproduction. Les coûts de maintenance sont proportionnels au volume de l'organisme. Si l'organisme n'arrive pas à assurer ces coûts, il meurt.

8. Le vieillissement de l'organisme est lié à l'action des radicaux libres (dégagés lors de la respiration, du métabolisme des lipides et de la biotransformation des produits toxiques) sur l'ADN et les protéines. Ce vieillissement implique une augmentation des coûts de maintenance pour réparer le matériel biologique endommagé. C'est l'augmentation de cette dépense énergétique qui conduit *in fine* à la mort de l'organisme.

2.2 Définition des conditions expérimentales

2.2.1. Homogénéité des conditions expérimentales pour nos trois espèces

Le choix des conditions expérimentales pour les tests est problématique dans le cadre de cette thèse. En effet, nous avons construit notre batterie de tests sur la base des différences biologiques et écologiques des organismes. Afin de tenir compte de ces différences lors des tests, il convient de trouver les conditions expérimentales telles que les organismes soient à leur optimum bio/écologique pendant les tests.

D'un autre point de vue, le but des tests est de comparer la réponse biologique des différentes espèces étudiées à un contaminant. Or, la mesure de la réponse biologique est fortement influencée par le choix des conditions expérimentales. Afin d'obtenir des mesures de réponse comparables, il est donc nécessaire de minimiser la variabilité d'origine expérimentale en termes de biodisponibilité et de cinétique d'absorption du produit. Ceci implique l'utilisation de conditions expérimentales similaires pour chacune des espèces étudiées (Sloof *et al.*, 1986).

Nous devons donc faire un choix entre la maximisation du réalisme écologique (en terme d'exposition des organismes) et la maximisation de la comparabilité des réponses biologiques obtenues pour les différentes espèces testées. D'après Vaal *et al.* (1997a), la variabilité de réponse biologique liée aux conditions expérimentales est plus élevée que la variabilité liée aux différences de traits biologiques et écologiques des taxa. Nous avons donc choisi d'utiliser des conditions expérimentales similaires pour nos trois espèces. Aussi, nous avons recherché des conditions expérimentales moyennes, qui s'inscrivent dans la gamme de tolérance aux facteurs abiotiques de toutes les espèces testées. Puisque nous analysons les effets toxiques au niveau de la population, ces conditions moyennes ne doivent pas modifier les caractéristiques du cycle de vie des espèces, citées au tableau VII.

Nos trois espèces s'observant dans la même niche écologique, leurs gammes de tolérance aux facteurs abiotiques sont relativement semblables (Townsend *et al.*, 1997). Ainsi, nous supposons que le fait de travailler dans des conditions expérimentales moyennes (au lieu de nous placer à l'optimum écologique de chaque espèce) n'entraîne pas de stress significatif des organismes qui pourrait influencer la mesure de la réponse biologique aux contaminants.

Ce choix implique un relatif « lissage » des différences biologiques et écologiques entre nos organismes, notamment pour les variables « preferendum de température » et « source de nourriture ». Ces variables participent significativement à la discrimination des taxa dans notre analyse de co-inertie. L'ampleur de la perte de pertinence écologique sera discutée au chapitre VI.

2.2.2. Conditions expérimentales retenues

Les conditions expérimentales ont été définies sur la base des protocoles standardisés pour *C. riparius* (US EPA, 1994 ; ASTM, 2000 ; OECD, 2000). Ces conditions sont présentées dans le tableau VIII. La température a été fixée à 21°C, ce qui correspond à l'optimum physiologique du mollusque et du chironome (Reynolds et Benke, 2005). Cette température ne permet pas de maximiser la croissance et la reproduction de l'oligochète, dont l'optimum se situe à 24 +/- 1°C sous nos latitudes (Aston, 1968).

La nourriture retenue est la Tétramin®, puisqu'elle entre dans le régime alimentaire de nos trois organismes en élevage. La quantité de nourriture a été adaptée à chacune des espèces testées, afin d'assurer une survie, une croissance et une reproduction optimales. Cette quantité de nourriture, dite *ad libitum*, a été déterminée grâce aux tests de croissance et de reproduction présentés au paragraphe suivant.

Tableau VIII. Conditions expérimentales des bioessais

Paramètre expérimental	Conditions de laboratoire
Substrat	Sédiment naturel ¹ frais tamisé (500 µm)
Eau	FOS ² , non renouvelée durant l'essai (évaporation complétée avec de l'eau déminéralisée)
Volume sédiment/ Volume eau	100 ml/400 ml ³ pour <i>C. riparius</i> et <i>V. piscinalis</i> 200 ml/300 ml ³ pour <i>B. sowerbyi</i>
Température	21 +/-1°C
Eclairage	Par tube fluorescent à large spectre Intensité : 500-1000 lux Photopériode : 16h d'éclairage/j (correspond à la photopériode estivale)
Aération	Modérée, sous la surface de l'eau
Nombre de réplicats	3 par condition testée (6 pour les essais reproduction)
Nombre d'organismes par réplicat	10
Nourriture	Tétramin® en quantité <i>ad libitum</i> ⁴
Critères d'acceptabilité chimiques de l'eau.	Maintient du pH à 8,0 +/- 0,5 NO ₂ ⁻ <10 mg/l NH ₄ ⁺ <2 mg/l

¹ sédiment naturel prélevé dans un bras mort de l'Ain (commune de Port-Galland) – physico-chimie présentée en annexe 4.

² mélange d'eau de source et d'eau osmosée (pH = 7,4 à 7,75, conductivité = 300 à 330 µs/cm et dureté = 100 mg/l CaCO₃)

³ soit une densité de 1 organisme pour 10 cm³ de sédiment chez *C. riparius* et *V. piscinalis* et 1 organisme pour 20 cm³ de sédiment chez *B. sowerbyi*

⁴ soit 0,6 mg Tétramin®/individu/jour ouvré pour *C. riparius* (quel que soit le stade larvaire), 0,4 et 0,8 mg de Tétramin®/individu/jour ouvré pour les juvéniles et les adultes de *V. piscinalis* et 1,6 et 3,2 mg de Tétramin®/individu/jour ouvré pour les juvéniles et les adultes de *B. sowerbyi* (voir paragraphe 3).

2.3. Méthodes de caractérisation des paramètres du cycle de vie : les bioessais

Pour chacune des espèces étudiées, nous cherchons à déterminer le niveau d'alimentation *ad libitum*, et à quantifier les taux de survie, de croissance et de reproduction des organismes dans les conditions expérimentales précédemment définies. Expérimentalement, ce travail revient à réaliser des bioessais en absence de toxique. Nous présentons dans ce paragraphe le principe et la méthodologie générale de ces tests, puis les adaptations spécifiques à chacune des espèces.

2.3.1. Méthodologie générale des bioessais

Choix du sédiment

La présence de sédiment lors des bioessais permet d'éviter une surmortalité des organismes liée au stress provoqué par l'absence de substrat (Lydy *et al.*, 1990 ; Leppänen et Kukkonen, 1998). Nous utilisons le même sédiment naturel que pour les élevages (sédiment prélevé dans un bras mort de l'Ain, sur la commune de Port-Galland ; propriétés physico-chimiques en annexe 4).

Le sédiment utilisé pour les essais est prélevé puis tamisé à 500 μm afin d'éliminer les organismes endogènes ainsi que les particules végétales de grosse taille (US EPA, 1994) puis stocké à 4°C jusqu'à son utilisation. La qualité du sédiment se dégrade en cas de stockage prolongé ou de congélation (ASTM, 2000). En effet, la congélation ou le stockage provoque une explosion bactérienne dans le sédiment, suivie par une augmentation de la quantité d'ions ammonium et nitrites, potentiellement toxiques pour les organismes. Cette augmentation de la concentration en ions toxiques ne peut être ni évitée, ni gérée car nous ne renouvelons pas l'eau surnageante durant les tests. Ainsi, les sédiments destinés aux essais ne pas congelés, ni conservés plus de deux mois après le prélèvement.

La réalisation de prélèvements réguliers au cours de la thèse plutôt que l'utilisation d'un stock de sédiment issu d'un seul prélèvement implique une variabilité saisonnière de la qualité du substrat. L'évolution de sa granulométrie et de sa physico-chimie a été évaluée grâce à un suivi analytique. L'évolution de son niveau de toxicité global a été suivie en réalisant des

« contrôles biologiques » réguliers. Ces contrôles consistent en l'évaluation de la croissance de larves de chironomes (Fig. 28). Ce test a été choisi pour sa simplicité, sa rapidité (7 jours) et l'existence d'un protocole d'expérimentation normé (AFNOR, 2004).

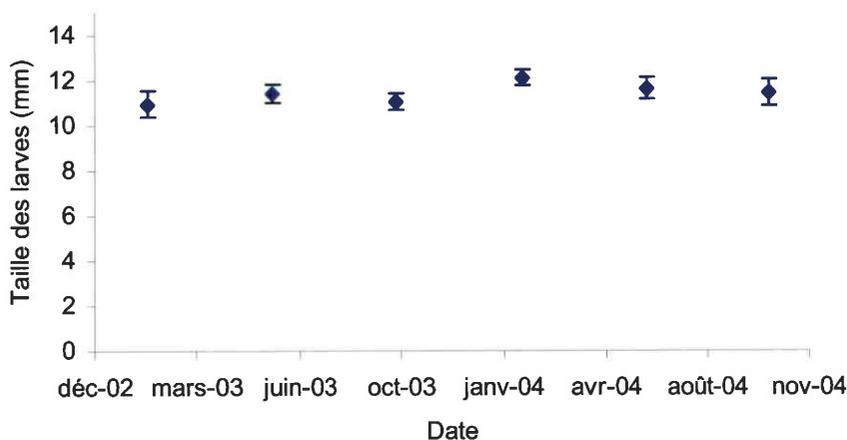


Figure 28. Taille moyenne (et IC 95%) de larves de chironomes en fonction de la date de prélèvement du sédiment naturel utilisé au cours de la thèse.

Les chironomes ayant grandi sur des sédiments provenant des différents prélèvements réalisés à intervalles réguliers au cours de la thèse présentent une taille moyenne similaire. Ainsi, la qualité du substrat (en terme de niveau de toxicité pour les chironomes) est constante durant la thèse.

Mise en place et suivi des enceintes expérimentales

L'enceinte expérimentale (bêcher pyrex, 600 ml) doit permettre de recréer dans un petit volume les différents compartiments de l'écosystème aquatique (sédiment et colonne d'eau – Fig. 29).

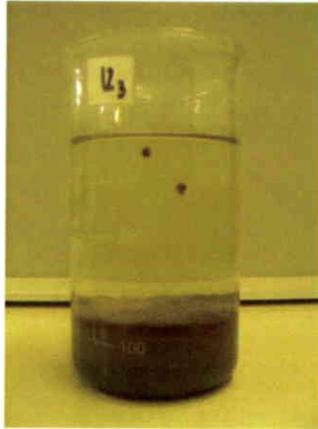


Figure 29. Enceinte expérimentale utilisées durant les essais (et adultes de *Valvata (Cincinna) piscinalis* sur la paroi).

Ce système sédiment / eau correspond au mode d'exposition standard préconisé pour les organismes benthiques (US EPA, 1994 ; Environment Canada, 1997 ; OECD, 2000). Ces béchers sont maintenus à température constante ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) à l'aide d'un bain-marie. Un délai de trois jours en conditions expérimentales est observé avant le début de l'essai afin de permettre la décantation et le rétablissement des gradients d'oxydoréduction dans le milieu (Simpson *et al.*, 2004). La température, le pH et les concentrations en ammoniacque et en nitrites sont régulièrement contrôlés durant les tests. Le dispositif expérimental est présenté en figure 30.



Figure 30. Dispositif expérimental utilisé pour les essais.

Obtention des organismes destinés aux essais

Les organismes utilisés pour les essais sont obtenus grâce aux protocoles présentés en annexe 5. Ces protocoles permettent d'obtenir des lots d'individus d'âge et de conditions physiologiques homogènes. Au jour zéro de l'essai, ces organismes sont introduits aléatoirement dans les bécchers.

2.3.2. Méthodologies spécifiques chez *Chironomus riparius*

Chironomus riparius est largement utilisé en écotoxicologie. Nous procédons donc simplement à un bref rappel des méthodes de tests avec cet organisme.

Evaluation de la survie et de la croissance

La probabilité de survie et les capacités d'alimentation des larves dépendent du stade larvaire (Armitage *et al.*, 1995). Afin de tenir compte de ces variations, la survie et la croissance sont évaluées de façon indépendante pour chacun des stades larvaires.

Trois essais sont ainsi réalisés. L'âge des organismes en début d'essai est respectivement de 2, 4 et 6 jours (début de stade larvaire). La durée d'exposition de ces organismes est respectivement de 2, 2 et 4 jours. A l'issue du test, les organismes sont extraits du sédiment par un tamisage doux (maille du tamis : 500 µm) et les survivants sont dénombrés. La survie se définit par la présence de mouvement spontané ou engendré suite à une stimulation à la pipette Pasteur dans les cinq secondes suivant cette stimulation. Les larves survivantes sont immobilisées par un bref trempage (1 à 2 minutes) dans une solution de formaldéhyde concentrée à 10% et mesurées grâce à une loupe binoculaire équipée d'un micromètre.

Evaluation de l'émergence

Afin de se placer dans des conditions de survie satisfaisantes, l'essai est initié avec des larves âgées de quatre jours (début de 3^{ème} stade). Les bécchers sont dotés de couvercles translucides évitant l'envol des émergents. Dès le début des émergences, les adultes sont

quotidiennement retirés des béciers par aspiration grâce à un dispositif inspiré de Benoit *et al.* (1997), puis comptés et sexés. Le test cesse lorsque toutes les larves ont émergé.

Evaluation de la reproduction

L'essai est initié avec des larves âgées de quatre jours, placées dans des béciers avec couvercle. Les femelles émergeant de chaque réplicats sont rassemblées dans une bouteille (pyrex, 2l) contenant quelques centimètres d'eau afin de recevoir les pontes. Ces bouteilles sont placées à 24 °C après introduction de 2 mâles par femelle, afin de maximiser la probabilité de fécondation dans les 24 h.

Le sexe-ratio étant proche de 1, nous ne disposons pas de suffisamment de mâles dans nos béciers pour accorder deux partenaires à toutes les femelles émergeantes. Nous supposons que, comme chez *Chironomus tentans*, la qualité des mâles a une influence négligeable sur la fécondité (Benoit *et al.*, 1997 ; Sibley *et al.*, 2001). Ainsi, nous utilisons les mâles de l'élevage pour assurer la fécondation des femelles prélevées dans les béciers.

Les pontes obtenues dans chaque bouteille sont quotidiennement relevées jusqu'à la mort de toutes les femelles introduites. Chaque femelle ne se reproduisant qu'une seule fois, le comptage du nombre d'œufs par masse nous donne directement accès à la fécondité.

Le nombre d'œufs par masse est évalué suivant la méthode du ring-count (Benoit *et al.*, 1997). Cette méthode consiste à compter le nombre d'anneaux composant la masse et à le multiplier par le nombre d'œufs moyen par anneau (moyenne réalisée sur trois anneaux). Pour les masses dont le nombre d'anneaux n'est pas facilement comptable (masses déformées ou trop denses), nous procédons par comptage manuel après avoir dissout la masse gélatineuse à l'aide d'une solution de javel diluée à 10%.

2.3.3. Méthodologies spécifiques chez *Valvata (Cincinna) piscinalis*

Valvata (Cincinna) piscinalis n'a jamais fait l'objet de tests en écotoxicologie. Nous décrivons ici les protocoles mis au point durant la thèse.

Evaluation de la survie embryonnaire

La présence d'une capsule dure et de petite taille (1,10 mm, IC_{95%} [1,03 ; 1,16]) autour des œufs permet de les manipuler à l'aide d'une pipette pasteur sans les endommager. La capsule s'hydrate au cours de l'incubation des œufs (Fig. 31) et devient moins résistante : les œufs sont donc de plus en plus difficiles à manipuler au cours de leur développement.

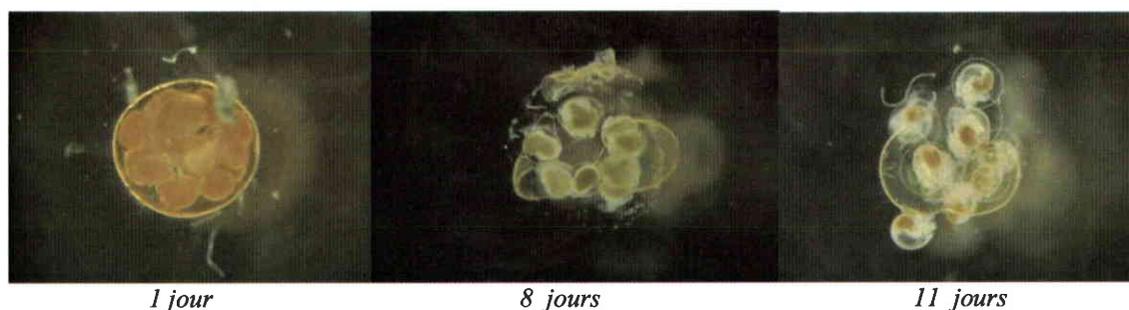


Figure 31. Maturation d'une capsule de *Valvata (Cincinna) piscinalis*

Le développement embryonnaire est étudié en plaçant des capsules prélevées dans les élevages le jour de leur ponte dans de l'eau à 21 °C, sous aération (par une pipette pasteur reliée à une pompe à air). Le nombre moyen d'œufs par capsule est déterminé à l'aide d'une loupe binoculaire, sur un échantillon de 60 capsules. La durée du développement embryonnaire est déterminée en contrôlant quotidiennement le nombre de capsules écloses, jusqu'à ce que toutes aient soit éclos, soit dégénéré.

Détermination du régime alimentaire *ad libitum* pour les nouveau-nés

Les nouveau-nés issus de l'expérience précédente sont introduits dans des béciers remplis d'eau (sous aération) afin de déterminer leur probabilité de survie et leur vitesse de croissance pour différents niveaux d'alimentation. Quatre réplicats de 30 nouveau-nés sont mis en place pour chacun des régimes alimentaires suivants, choisis d'après les résultats de pré-tests : 0 ; 0,1 et 0,2 mg de Tétramin®/individu/jour ouvré. La survie et la croissance sont évaluées après deux semaines. Les individus operculés n'étant pas forcément morts, la survie est estimée en comptant le nombre d'organismes mobiles 15 minutes après leur transfert dans de l'eau propre. La croissance est évaluée en mesurant la longueur de la coquille (Cleland, 1954). La mesure est réalisée entre le péristome (opercule non compris) et son extrémité

opposée (Fig. 32). Cette distance correspond au diamètre maximal de la coquille (Russel Hunter, 1961).

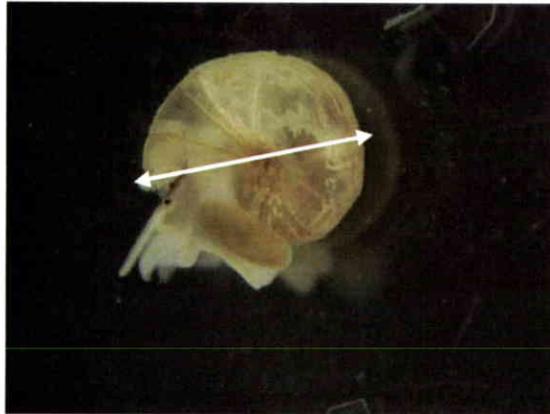


Figure 32. Mesure de la taille d'un nouveau-né de *Valvata (Cincinna) piscinalis*

Evaluation de la croissance et de la reproduction ; détermination du régime alimentaire *ad libitum* pour les adultes

La détermination des courbes de croissance et de reproduction des adultes pour différents régimes alimentaires est réalisée dans des béciers contenant eau et sédiment. Trois réplicats de 10 organismes juvéniles (âgés de 14 jours) sont mis en place pour chacun des régimes alimentaires suivants, choisis d'après les résultats de pré-tests : 0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,8 et 1 mg de Tétramin® /individu/jour ouvré.

La survie et la longueur des organismes sont évaluées toutes les deux semaines suivant ce protocole :

- les sédiments sont tamisés à 315 μm ;
- les individus ainsi obtenus sont placés 15 minutes dans de l'eau propre ;
- les survivants sont dénombrés, puis mesurés à l'aide d'une loupe binoculaire ;
- ils sont replacés dans de nouveaux béciers de test, ayant été préparés 3 jours avant le transfert des organismes.

La reproduction est évaluée chaque semaine afin d'éviter l'éclosion des capsules dans les béciers. Comme ces capsules sont pondues sur les parois des béciers, elles sont facilement prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur, puis dénombrées. Le nombre d'œufs par capsule est évalué à la loupe binoculaire. Afin d'assurer un comptage fiable, les capsules

contenant un grand nombre d'œufs sont dissoutes dans une solution de javel diluée à 10% afin de libérer les oeufs.

Ces tests de croissance et de reproduction sont arrêtés lorsque la survie moyenne des témoins tombe au-dessous de 70 %. Ce seuil correspond aux critères de validité recommandés par les lignes directrices pour les tests de toxicité (ASTM, 2000). Dans notre cas, les tests ont duré 224 jours.

Caractérisation de la croissance : test de l'hypothèse d'isomorphie

Afin de caractériser la croissance, il faut déterminer la relation entre la taille de l'organisme et son poids au cours du temps. Nous cherchons à savoir si *V. piscinalis* est un organisme isomorphe. L'isomorphie implique que la croissance s'opère dans les trois dimensions de l'espace et que le ratio entre la longueur et la hauteur (constante d'isomorphie) ne varie pas au cours du cycle de vie. Si l'organisme est isomorphe, son poids peut être décrit de façon très simple : il est proportionnel au cube de sa longueur. Le facteur de proportionnalité correspond à la constante d'isomorphie.

Afin de vérifier si *V. piscinalis* est isomorphe ou non, nous avons réalisé des mesures de longueur et de hauteur sur des lots de 30 organismes juvéniles et adultes. Les organismes ont été prélevés dans l'élevage grâce à un tamisage sélectif (ouverture de tamis : 315 µm ; 2,50 mm et 3,55 mm). Ils ont ensuite été mesurés sous une loupe binoculaire équipée d'un micromètre. La mesure de la longueur est relativement simple : il suffit de poser l'organisme « sur le dos » (voir Fig. 32). En revanche, la mesure de la hauteur nécessite de poser l'organisme « sur le flanc ». Dans cette position, l'organisme « roule » jusqu'à se positionner en appui sur le péristome, ce qui empêche de visualiser les derniers tours de spires de la coquille. Afin d'éviter ce biais, l'expérimentateur doit maintenir l'organisme à l'aide de pinces (ou de pâte à modeler) pendant la mesure : ceci rend la mesure de la hauteur difficile et donc potentiellement imprécise.

2.3.4. Méthodologies spécifiques chez *Branchiura sowerbyi*

Branchiura sowerbyi est une espèce peu utilisée en écotoxicologie. Des protocoles de tests sur sédiments sont néanmoins disponibles (Casellato *et al.*, 1992 ; Marchese et Brinkhurst, 1996). Ces protocoles ont servi de base aux méthodes de tests développées durant la thèse.

Détermination du régime alimentaire *ad libitum*

Les juvéniles sont prélevés dans l'élevage par tamisage du sédiment à 315 µm (Aston, 1968). Ils proviennent de la même génération et ont un poids équivalent (3,73 mg, IC 95 % : [3,67; 3,78]). Dix organismes sont aléatoirement placés dans 3 réplicats pour chacun des régimes alimentaires suivants (choisis d'après les résultats de pré-tests) : 0 ; 1,6 ; 3,2 et 6,4 mg de Tétramin®/individu/jour ouvré. La vitesse de croissance et la fécondité ont été suivies durant un mois. Tous les dix jours, les organismes sont retirés du sédiment par un tamisage le plus délicat possible (maille du tamis : 315 µm). Ils sont grossièrement séchés en les déposant sur du papier absorbant et immédiatement pesés. Ils sont ensuite réintroduits dans de nouveaux béchers de test ayant été préparés trois jours avant le transfert des organismes.

Evaluation de la croissance et de la reproduction

La croissance et la reproduction de *B. sowerbyi* ont été étudiés seulement pour un apport de nourriture *ad libitum*.

Les nouveau-nés sont prélevés dans l'élevage par tamisage du sédiment à 315 µm (Aston, 1968). Ils proviennent de la même génération et ont un poids équivalent (0,54 mg IC 95 % : [0,29 ; 0,79]). Dix organismes sont aléatoirement placés dans 21 réplicats. La survie, la croissance et le nombre de cocons pondus sont évalués tous les 10 jours jusqu'au jour 60 du test (début de la reproduction), puis tous les mois jusqu'à la fin du test, afin de minimiser le stress généré par une manipulation trop fréquente des mêmes organismes (Marchese et Brinkhurst, 1996).

La survie est facilement évaluée en comptant le nombre d'individus mobiles après tamisage du sédiment à 315 µm. Le tamisage doit être réalisé délicatement afin d'éviter de

blessés les animaux ou de les stresser. En effet, le stress provoque une réaction d'autotomie. Bien que cette réaction soit un artéfact expérimental et non une dégénérescence naturelle, les individus blessés sont déclarés morts et éliminés du réplicat. Les survivants sont replacés dans de nouveaux béchers de test ayant été préparés 3 jours avant le transfert des organismes.

L'organisme stressé étant très mobile, la mesure de sa longueur ne peut pas se faire de façon fiable *in vivo*. Des essais d'immobilisation par divers produits anesthésiants ou létaux ont montré que ces produits provoquent une rétractation ou une déformation de l'annélide. Du fait de ces réactions, la taille ne constitue pas un indicateur fiable de la croissance. Par ailleurs, il est impossible d'évaluer la croissance à partir de mesures de poids sec, car le fait de devoir tuer les organismes impliquerait la mise en place d'un trop grand nombre de réplicats en début d'expérience.

La croissance des organismes est donc suivie grâce à des mesures de poids frais individuel. Afin d'éviter un stress lié à l'absence prolongée de sédiment, les organismes ne subissent pas de dépuración avant la pesée : le poids indiqué tient donc compte du contenu intestinal. Conformément à la méthode développée par Aston *et al.* (1982), les organismes sont extraits du sédiment grâce à un tamisage précautionneux (maille de tamis : 315 μm), séchés sur du papier absorbant et pesés au dixième de milligramme près. Après la pesée, les organismes sont replacés dans de nouveaux béchers de test ayant été préparés 3 jours à l'avance.

Les individus gravides sont facilement reconnus car les œufs sont stockés juste sous le tégument, formant un collier blanc dorsal. La fécondité est évaluée en comptant le nombre de cocons pondus dans le sédiment en trente jours, et le nombre d'œufs par cocons. Ces cocons sont retrouvés dans le rejet du tamis de 315 μm . Les cocons dégénérés (opaques ou noirs), ainsi que les cocons vides (déjà éclos) sont pris en compte dans le calcul de la fécondité des organismes.

Ces tests de croissance et de reproduction sont arrêtés lorsque la survie moyenne des témoins tombe au-dessous de 70 %. Ce seuil correspond aux critères de validité recommandés par les lignes directrices pour les tests de toxicité (ASTM, 2000). Dans notre cas, le test a duré 388 jours.

Evaluation de la survie embryonnaire

Le taux d'éclosion des cocons et la survie embryonnaire ont été déterminés en introduisant les cocons récoltés lors du test précédent dans un milieu non contaminé (eau + sédiment), aéré, à 21 °C et sans apport de nourriture. Ne connaissant pas la durée du développement embryonnaire, nous avons réalisé 6 expériences de durée différentes : 10, 14, 35, 42, 49 et 54 jours (3 réplicats / durée ; 30 +/- 2 œufs / réplicat). A la fin de la durée d'incubation testée, le milieu est tamisé à 315 µm, et les survivants sont dénombrés.

2.4. Méthodes d'analyse des données

Les statistiques élémentaires sont réalisées à l'aide de Statistica 6.0. (StatSoft Inc, Tulsa OK, USA). Les données sont utilisées afin de paramétrer des modèles de survie, de croissance et de reproduction. Ces modèles sont ensuite utilisés afin de prévoir des valeurs de survie, de croissance et de reproduction théoriques en fonction de l'âge des organismes. Les différents paramètres utilisés dans nos modèles, ainsi que leurs unités, sont recensés dans des tableaux récapitulatifs présentés en annexe 7.

La fiabilité des estimations obtenues *via* nos modèles par rapport aux données expérimentales est contrôlée grâce à un test de Student sur petits échantillons ou à un test de Fisher, qui permettent d'accepter ou de rejeter le modèle. Ces tests sont réalisés au risque d'erreur de type I de 5%.

3. CARACTERISATION DU CYCLE DE VIE AU LABORATOIRE POUR LES TROIS ESPECES ETUDIEES : RESULTATS

3.1. Cycle de vie de *Chironomus riparius*

Le cycle de vie de *C. riparius* dans nos conditions expérimentales a été complètement décrit au cours de la thèse d'A. Péry (2003). Nous reprenons ici les principaux résultats de cette thèse.

3.1.1. Cycle de vie et taux de survie

A 21°C avec un apport de nourriture *ad libitum*, le chironome réalise son cycle de vie dans le sédiment de Port-Galland en 20 à 24 jours. Chaque stade de développement se caractérise par un taux de survie et une durée spécifiques (tableau IX).

Tableau IX. Caractéristiques du cycle de vie de *Chironomus riparius* dans le sédiment de Port-Galland, à 21°C, avec un apport alimentaire *ad libitum* (d'après Péry 2003).

<i>Stade de développement</i>	<i>Durée du stade (jour)</i>	<i>Taux de survie en fin de stade (%)</i>	<i>Taux de croissance (mm/j)</i>
Œuf	2	50	0
Premier stade larvaire	2	80	0,8
Second stade larvaire	3	100	0,8
Troisième stade larvaire	2	100	1,4
Quatrième stade larvaire	9	100	♂ : 1,7 ; ♀ : 2,2
Nymphe	1	100	0
Imago	1 à 4	100	0

3.1.2. Caractérisation et modélisation de la croissance

La croissance des larves de chironome est un phénomène complexe. Les larves de premier stade grandissent en se nourrissant des restes de vitellus composant la masse qui entourait les œufs. Nageuses, ces larves partent à la recherche d'un substrat propice à leur

enfouissement où elles construisent un fourreau protecteur. La construction du fourreau est une étape nécessaire à la poursuite de la croissance (Péry *et al.*, 2004a).

La taille de la capsule céphalique est spécifique de chaque stade larvaire. Chaque stade larvaire est donc caractérisé par un taux de croissance journalier spécifique (voir tableau IX), qui détermine la durée du stade.

Pour chacun de stades larvaires, la croissance est de type isomorphe : le ratio entre la longueur et la largeur de l'organisme est constant. Au quatrième stade larvaire, le taux de croissance journalier dépend du sexe de l'organisme : il est plus élevé chez les femelles que chez les mâles. La croissance s'arrête quelques jours avant la fin du quatrième stade, lorsque les larves ont atteint leur taille maximale (11,4 mm pour les mâles et 13,7 mm pour les femelles dans nos conditions expérimentales).

L'apport de 0,6 mg/individu/jour ouvré de Tétramin® représente une quantité *ad libitum* de nourriture pour les chironomes vivant dans le sédiment de Port-Galland à 21°C. La quantité d'énergie issue de la consommation des détritux sédimentaires est négligeable devant la quantité d'énergie fournie par la Tétramin® (Péry *et al.*, 2004b).

La caractérisation de la gestion de l'énergie permet de comprendre et de modéliser le cycle de vie de nos espèces modèles. Chez le chironome, les coûts de maintenance et de respiration chez les larves sont faibles par rapport à l'investissement énergétique pour la croissance (Péry *et al.*, 2002). Ainsi, l'énergie est principalement investie en biomasse somatique. Cette énergie permet en outre la réalisation des mues larvaires et la mise en place de l'appareil reproducteur au troisième stade (Sibley *et al.*, 1997). En revanche, la larve en croissance n'investit pas d'énergie pour préparer l'émergence et la production d'œufs (Ducrot *et al.*, 2004).

A partir de ces observations, Péry (2003) a mis au point des modèles permettant de prédire l'évolution journalière de la taille des larves au cours de leur développement, en fonction de la quantité de nourriture fournie par l'expérimentateur. Ces modèles s'inspirent de la théorie DEB (Kooijman, 2000).

Selon ses observations en laboratoire, Péry (2003) considère que toute l'énergie absorbée par la larve est utilisée pour sa croissance, et ceci jusqu'à ce qu'elle atteigne sa taille

maximale. La croissance de la larve dépend donc uniquement de sa taille et de la quantité de nourriture assimilée. En conditions *ad libitum*, la longueur attendue à l'instant $t+1$ peut alors être prédite à partir de la longueur mesurée expérimentalement à l'instant t grâce à l'équation suivante :

$$l_{(t+1)} = \frac{f \times \beta}{3i \times \alpha} + l_{(t)} \quad (1)$$

avec :

- β la fraction assimilable de la nourriture (constante valant 70% pour la Tétramin® d'après Péry *et al.*, 2002) ;
- f la vitesse d'assimilation de la nourriture (constante valant 1 en conditions d'alimentation *ad libitum* d'après Kooijman et Bedaux, 1996) ;
- i le rapport entre la taille et le poids de l'organisme (constante d'isomorphie valant 0,52 chez *C. riparius* d'après Péry *et al.*, 2002) ;
- α le coût énergétique de fabrication d'une unité de biomasse.

Ce modèle de croissance sera utilisé afin de prédire la taille des organismes témoins au cours de leur développement.

3.1.3. Caractérisation et modélisation de l'émergence

La nymphose des organismes se produit une fois leur taille maximale atteinte. Le surplus de temps nécessaire aux femelles pour atteindre leur taille maximale génère un décalage de 48 h (à 21°C et apport alimentaire *ad libitum*) entre l'émergence des mâles et des femelles.

D'après Péry (2003), le temps moyen d'émergence d'une larve correspond à la durée de sa croissance ajoutée à une constante qui représente le temps écoulé entre le moment où la larve atteint sa taille maximale et le moment où l'adulte émerge (5 jours dans nos conditions expérimentales). Ainsi, le temps moyen d'émergence d'une larve (t_e) dans nos conditions expérimentales s'écrit :

$$t_e = d_1 + d_2 + d_3 + d_4 + 5 \quad (2)$$

avec d_x la durée du $x^{\text{ième}}$ stade larvaire.

Cette durée est calculée de la façon suivante :

$$d_x = \frac{(l_{max,x} - l_{0,x})}{\gamma_x} \quad (3)$$

avec :

- $l_{0,x}$ la taille moyenne des larves en début du $x^{ième}$ stade de développement ;
 - $l_{max,x}$ la taille maximale des larves à la fin du $x^{ième}$ stade de développement ;
 - γ_x le taux de croissance journalier spécifique au $x^{ième}$ stade de développement ;
- sachant que pour le quatrième stade, $l_{max,x}$ et γ_x dépendent du sexe de la larve (valeurs fournies dans le tableau IX).

Ce modèle est utilisé afin de prédire le temps d'émergence des organismes témoins et des organismes exposés au toxique au cours de leur développement.

3.1.4. Caractérisation et modélisation de la reproduction

L'accouplement et la ponte surviennent dans les 24 h suivant la mise en présence des mâles et des femelles dans une enceinte de petit volume (21). La ponte est constituée d'une unique masse d'œufs par femelle.

La fécondité des femelles (N) dépend directement de la quantité d'énergie stockée sous formes de réserves entre la fin de la croissance et la nymphose, et du coût énergétique de fabrication d'un œuf (Ducrot *et al.*, 2004) :

$$N = \frac{Q \times f \times \beta \times D}{\delta} \quad (4)$$

avec :

- Q la quantité de nourriture apportée quotidiennement aux organismes ;
- f la vitesse d'assimilation de la nourriture (constante valant 1 en conditions d'alimentation *ad libitum* d'après Kooijman et Bedaux, 1996) ;
- β la fraction assimilable de la nourriture fournie ($\beta = 70\%$ pour la Tétramin® d'après Péry *et al.*, 2002) ;
- D la durée de la phase d'investissement énergétique pour la reproduction (5 jours dans nos conditions expérimentales - *loc.cit.*) ;
- δ le coût énergétique de fabrication des œufs ($\delta = 0,0019$ chez les témoins - *loc.cit.*).

Ce modèle est utilisé dans notre thèse pour prédire la fécondité des organismes témoins en fonction de l'apport alimentaire, en conditions *ad libitum*.

3.1.5. Paramètre du cycle de vie de *Chironomus riparius* dans nos conditions expérimentales : bilan

Le tableau X présente une synthèse de la valeur des paramètres du cycle de vie du chironome en conditions de laboratoire.

Tableau X. Synthèse des paramètres du cycle de vie de *Chironomus riparius* dans nos conditions expérimentales (21°C, nourriture ad libitum, autres conditions précisées au sous- chapitre 2)

<i>Stade de développement</i>	<i>Paramètre d'histoire de vie</i>	<i>Valeur en laboratoire (IC 95%)</i>
Embryons 0-2 j	Durée moyenne de maturation des capsules	2 j
	Taux de survie embryonnaire	50 %
Premier stade larvaire 2-4 j	Durée du stade	2 j
	Longueur moyenne en début de stade	ND
	Taux de survie	100% ¹
	Taux de croissance journalier moyen	0,8
Second stade larvaire 4-7 j	Durée du stade	2 j
	Longueur moyenne en début de stade	1,8 mm [1,7 ;1,9]
	Taux de survie	87%
	Apport de nourriture <i>ad libitum</i>	0,6 mg Tétramin®/ind/j ouvert
	Taux de croissance journalier moyen	0,8 mm/j
Troisième stade larvaire (7-9 j)	Durée du stade	3 j
	Longueur moyenne en début de stade	3,4 mm [3,2 ;3,6]
	Taux de survie	90%
	Apport de nourriture <i>ad libitum</i>	0,6 mg Tétramin®/ind/j ouvert
	Taux de croissance journalier moyen	1,4 mm/j
Quatrième stade larvaire (9-18 j)	Durée du stade	7 j
	Longueur moyenne en début de stade	7,4 mm [7 ;7,8]
	Taux de survie	97%
	Apport de nourriture <i>ad libitum</i>	0,6 mg Tétramin®/ind/j ouvert
	Taux de croissance journalier moyen	2 mm/j
	Taille maximale des mâles	11,4 mm
	Taille maximale des femelles	13,7 mm
Nymphes (1 j)	Durée du stade	1 j
	Taux d'émergence	88% [74,9; 100]
	Sexe ratio	50% ♀ ; 50% ♂
Adultes (1 à 4 j)	Durée du stade	4 j
	Nombre de reproductions/ind.	1
	Fécondité moyenne	495 oeufs [443,9 ; 546,7]
	Durée maximale du cycle de vie	24 jours

¹ Péry, 2003

3.2. Cycle de vie de *Valvata (Cincinna) piscinalis*

La littérature ne nous fournit aucune information quant au cycle de vie de ce gastéropode en laboratoire. Les études de terrain aboutissent parfois à des résultats contradictoires selon la population étudiée (lieu de prélèvement, année, auteur). Il est donc impossible de caractériser les paramètres du cycle de vie sur la base de la littérature.

L'information nécessaire a été recueillie grâce à la réalisation de 2 bioessais témoins. Chaque essai a été réalisé pour 5 niveaux d'alimentation, afin de déterminer le niveau *ad libitum* et d'obtenir des informations quant à la gestion de l'énergie au cours du cycle de vie.

Le premier essai témoin a consisté en un suivi des nouveau-nés placés dans des béciers ne contenant que de l'eau (afin de pouvoir retrouver les organismes facilement) pendant 14 jours.

Le second essai témoin a consisté en un suivi du développement des nouveau-nés durant 224 jours sur sédiment non contaminé.

3.2.1. Détermination du niveau d'alimentation *ad libitum*

Alimentation *ad libitum* chez les nouveau-nés

Les nouveau-nés mesurent en moyenne 547 μm (IC_{95%} : [514 ; 579]). L'apport de 0,1 mg/individu/jour ouvré de Tétramin® permet de maximiser leur survie et leur croissance (Fig. 33). Cette dose correspond à un apport alimentaire *ad libitum* pendant les 14 premiers jours de vie.

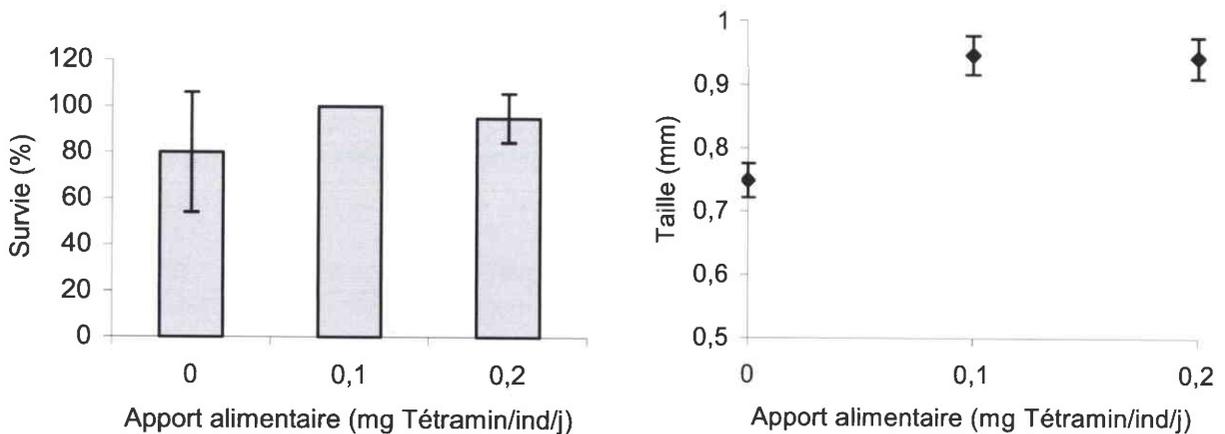


Figure 33. Survie et croissance moyennes (et IC_{95%}) de nouveau-nés de *Valvata (Cincinna) piscinalis* au bout de 14 jours pour différents régimes alimentaires.

Alimentation *ad libitum* chez les juvéniles et les adultes

Pour un apport de 1 mg de Tétramin®/individu/jour ouvré, nous observons des restes de nourriture. En se dégradant, ces restes provoquent une augmentation des taux d'ammonium et de nitrites jusqu'à des doses respectives de 5 mg/l et 20 mg/l. Ces fortes concentrations en ions azotés entraînent des effets néfastes sur la survie : la survie moyenne à 21 jours est médiocre (46,7%, IC_{95%} : [37,55 ; 55,85]) alors que les taux de survie des juvéniles avoisinent les 100% pour les autres régimes alimentaires. Le seuil d'alimentation *ad libitum* est donc inférieur à 1 mg de Tétramin®/individu/jour ouvré.

Les tailles moyennes des juvéniles en fin de stade (mesurées une semaine avant le début de la reproduction) ne sont pas significativement différentes pour les régimes 0,4 et 0,8 mg de Tétramin®/individu/jour ouvré. La dose de nourriture *ad libitum* pour les juvéniles correspond à donc un apport de 0,4 mg de Tétramin®/individu/jour ouvré.

Les organismes qui ne disposent que de sédiment naturel comme nourriture grandissent à une vitesse comparable à celle relevée sur le terrain (15 µm/jour dans notre expérience contre 14 µm/jour pour les populations naturelles suivie par Russel-Hunter (1961). La vitesse de croissance et la taille des adultes en fin d'expérience (224 jours) augmentent significativement en fonction de la quantité de nourriture délivrée par l'expérimentateur (Fig. 34).

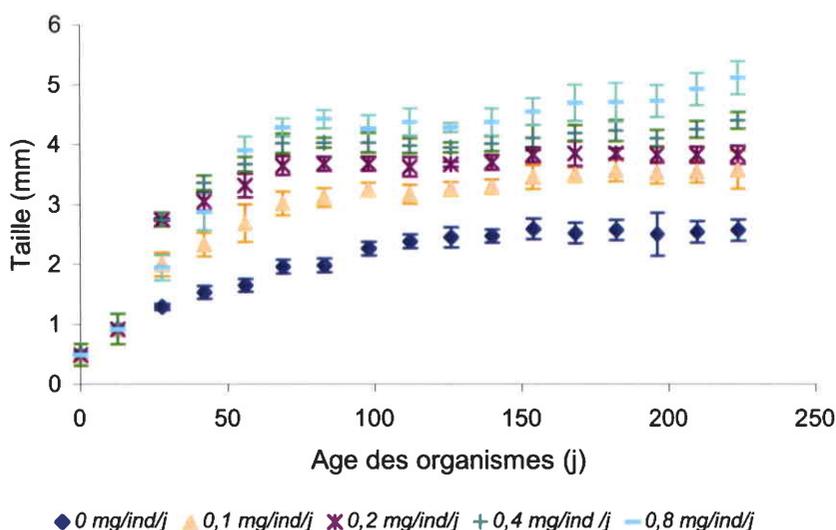


Figure 34. Evolution de la taille moyenne (et IC_{95%}) de *Valvata (Cincinna) piscinalis* en fonction de l'apport alimentaire journalier de Tétramin®

Par ailleurs, la fécondité des adultes augmente linéairement avec la quantité de nourriture délivrée par l'expérimentateur (Fig. 35). L'augmentation de fécondité correspond à la fois à une augmentation du nombre de capsules pondues au cours de la vie de l'organisme, ainsi que du nombre d'œufs par capsule.

D'après ces résultats, et sachant que l'apport de 1 mg de Tétramin®/individu/jour ouvré est trop élevé pour maintenir une qualité de l'eau acceptable en termes de concentrations en ions ammonium et nitrites, la dose de nourriture choisie pour nourrir les adultes pendant les tests est de 0,8 mg Tétramin®/individu/jour ouvré.

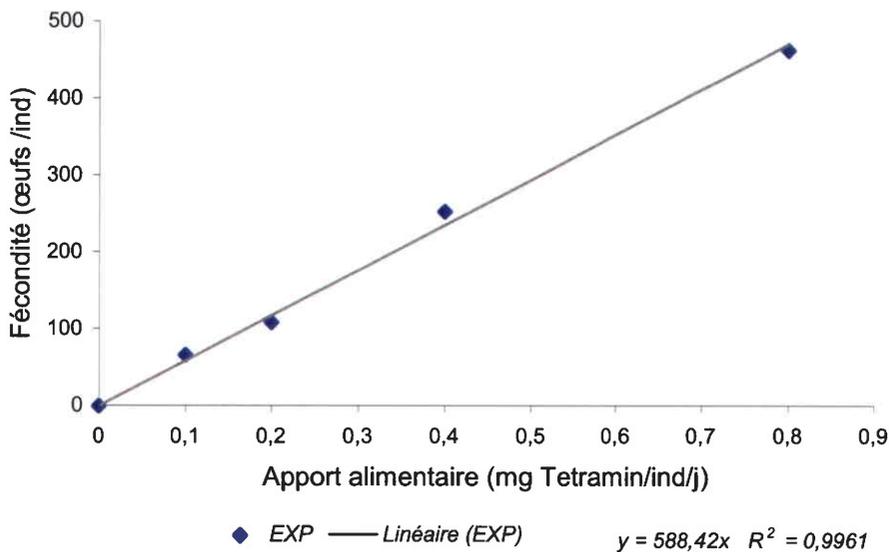


Figure 35. Fécondité moyenne chez *Valvata (Cincinna) piscinalis* après 224 jours de test en fonction de l'apport alimentaire journalier de Tétramin®

Pertinence de notre mesure du niveau d'alimentation *ad libitum* sur sédiment

Contrairement au chironome, qui se nourrit quasi-exclusivement de la Tétramin® apportée par l'expérimentateur (Péry *et al.*, 2004b), deux sources de nourriture sont disponibles dans nos béciers de tests pour *V. piscinalis* : la Tétramin® apportée quotidiennement, et la matière organique et bactérienne du sédiment. Les organismes nourris seulement avec le sédiment sont capables de grandir. Ceci montre que la quantité d'énergie fournie par le sédiment n'est pas négligeable par rapport à la quantité d'énergie fournie par l'expérimentateur. Cependant, leur taille finale est 2 fois plus petite que les organismes nourris *ad libitum* (sédiment + 0,8 mg Tétramin®/individu/jour ouvré).

Il est important de pouvoir quantifier l'apport alimentaire fourni par le sédiment afin de connaître la quantité d'énergie réellement disponible pour l'organisme. Ceci permet premièrement de pouvoir transposer les doses de nourriture *ad libitum* proposées dans cette étude dans le cadre d'études de croissance utilisant un sédiment différent du nôtre. Deuxièmement, ceci permet d'utiliser des modèles de croissance basés sur l'apport énergétique journalier de façon plus pertinente.

Afin de connaître la quantité d'énergie réellement disponible pour l'organisme (Q), il faut rechercher la quantité d'énergie présente dans le sédiment en « équivalent Tétramin® » (Q_{Sed}), et l'ajouter à la dose quotidienne de Tétramin® fournie aux organismes (Q_{Tetra}).

Le paramètre Q s'écrit :

$$Q = Q_{Sed} + Q_{Tetra} \quad (5)$$

Afin d'estimer le paramètre Q_{sed} , nous comparons les tailles maximales des organismes pour différentes densités de nourriture dans le milieu :

- cas 1 : les organismes sont limités en nourriture. Ils ne disposent que d'une quantité Q_{Tetra} de nourriture (avec $Q_{Tetra} < 0,8$ mg/individu/jour ouvré) ;

- cas 2 : les organismes ne sont pas limités en nourriture. Ils disposent d'une quantité Q de nourriture.

D'après Kooijman (2000), la taille maximale d'un organisme isomorphe limité en nourriture (l_{max}) est proportionnelle à la taille maximale d'un organisme nourri *ad libitum* (L_{max}) et s'écrit:

$$l_{max} = f \times L_{max} \quad (6)$$

Le paramètre f correspond à la vitesse d'assimilation de la nourriture. Concrètement, f représente la fraction de nourriture ingérée par l'organisme limité en nourriture par rapport à la quantité de nourriture ingérée par l'organisme nourri *ad libitum*. Le paramètre f s'écrit :

$$f = \frac{1}{1 + C/Q} \quad (7)$$

où C est une constante qui exprime la capacité de l'organisme à trouver de la nourriture. Concrètement, C représente une quantité de nourriture qui correspond à une réduction de 50% de la croissance des organismes par rapport à leur croissance optimale (A. Péry, Comm. Pers.).

D'après les équations 6 et 7, la taille d'un organisme en fin d'essai dépend de l'efficacité de recherche de nourriture (que nous appellerons Q/C) selon :

$$\frac{Q}{C} = \frac{l_{\max}}{L_{\max} - l_{\max}} \quad (8) \text{ pour un niveau d'alimentation donné.}$$

Grâce à nos tests de croissance réalisés pour différentes doses journalières de Tétramin®, nous connaissons l_{\max} et L_{\max} pour chaque niveau d'alimentation Q_{Tetra} testé. Nous pouvons donc obtenir une valeur du rapport Q/C pour chaque niveau d'alimentation Q_{Tetra} testé. Les paramètres C et Q_{sed} peuvent alors être estimés en traçant Q/C en fonction de Q_{Tetra} sachant que :

- $C = l/a$;
- $Q = Q_{\text{sed}} = C \times b$ pour $Q_{\text{Tetra}} = 0$;

avec a la pente et b l'ordonnée à l'origine de la droite de régression $Q/C = f(Q_{\text{Tetra}})$

(Fig. 36).

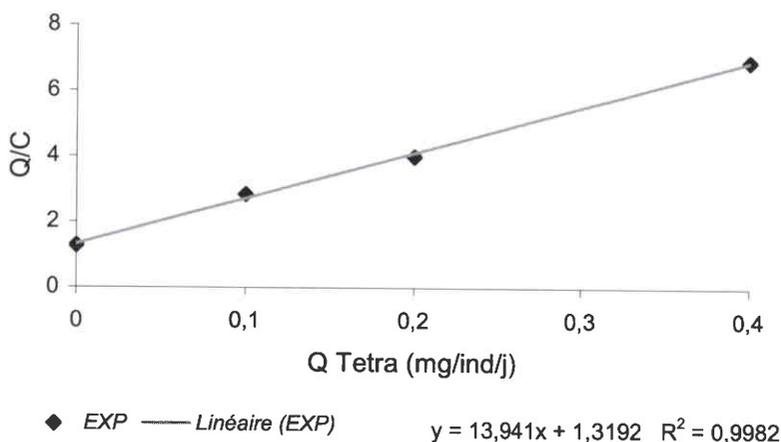


Figure 36. Efficacité de recherche de la nourriture en fonction de l'apport alimentaire journalier en Tétramin® chez *Valvata (Cincinna) piscinalis*

Nous obtenons $C = 0,072$ j/mg nourriture/individu et $Q_{sed} = 0,1$ mg équivalent Tétramin®/individu/jour ouvré. Pour les organismes nourris *ad libitum*, ceci implique que seulement un neuvième de la nourriture assimilée provient du sédiment, le reste étant fourni par la Tétramin®. L'apport énergétique du sédiment est donc faible chez *V. piscinalis*.

3.2.2. Déroulement du cycle de vie en conditions contrôlées

Le déroulement chronologique du cycle de vie d'organismes nourris *ad libitum* est présenté dans le tableau XI. Le début du stade juvénile correspond à un changement d'habitat : en effet les nouveau-nés ne vivent pas au contact du sédiment. Le stade adulte débute à la première reproduction des organismes.

Tableau XI : Description schématique du cycle de vie de *Valvata (Cincinna) piscinalis* en conditions *ad libitum*

Stade de développement	Durée du stade (jour)	Taille moyenne en début de stade (mm) et IC _{95%}	Habitat
Œuf	14	250 µm	Eau, fixé
Nouveau-né	14	547 µm [514 ; 579]	Eau
Juvénile	42	1 mm [0,95 ; 1,05]	Sédiment
Adulte	≤ 575 ¹	3,91 [3,66 ; 4,16]	Eau / sédiment

¹ Donnée issue de la modélisation de la courbe de survie, voir paragraphe 3.2.3.

3.2.3. Caractérisation et modélisation de la survie

Taux d'éclosion et survie embryonnaire

Le nombre d'œufs par capsule dépend du niveau d'alimentation du gastéropode. Pour un apport alimentaire *ad libitum*, le nombre moyen d'œufs par capsule est égal à 13,2 [12,3 ; 14,1]. A 21°C, la capsule éclos après 14 jours en moyenne (IC_{95%} [13,4 ; 14,6]). Les éclosions sont synchrones : toutes les capsules éclosent dans un intervalle de temps de 2 jours. Le taux moyen d'éclosion des capsules est de 100%. La probabilité de survie des embryons atteint 94% (IC_{95%} [79,8 ; 100]). Dans nos conditions expérimentales, le stade embryonnaire semble donc très résistant chez *V. piscinalis*.

Survie des juvéniles et des adultes

La survie moyenne à la fin de notre test de 224 jours est proche de 70 % quel que soit le régime alimentaire testé. Il est possible de prédire la durée du cycle de vie à partir de nos données en modélisant la probabilité de survie des organismes (Fig. 37). Chez les juvéniles, nous supposons que la survie diminue linéairement avec l'âge. Le nombre de survivants en fonction de l'âge peut donc être prédit grâce à l'équation suivante :

$$S_j(t) = S_0 \times (1 - k)^t \quad (9)$$

avec :

- $S_j(t)$ le nombre moyen de survivants d'âge t ;
- S_0 le nombre d'individus en début d'essai ;
- k le taux de mortalité journalière chez les juvéniles ($k = 0,0014$ d'après nos expériences).

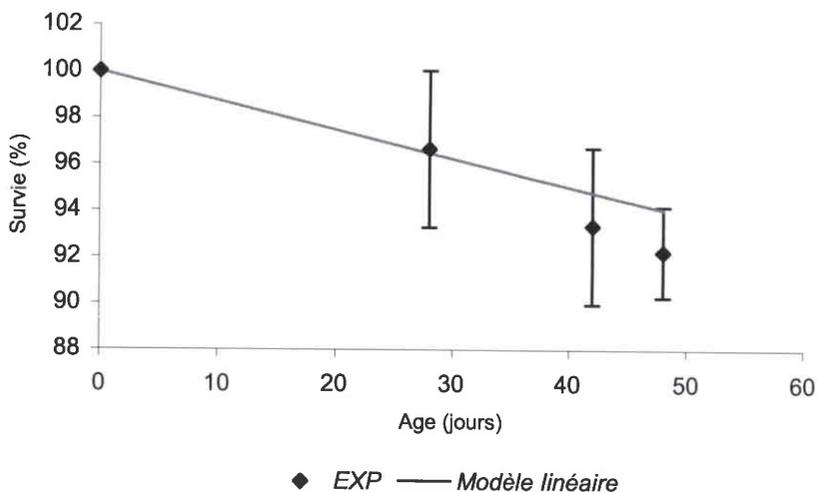


Figure 37. Evolution du taux de survie moyen (et IC 95%) chez les juvéniles de *Valvata (Cincinna) piscinalis* nourris ad libitum.

Le nombre de survivants prédit par le modèle n'est pas significativement différent de la donnée. La racine de la somme des carrés des écarts entre la prédiction et la donnée est faible. Elle correspond à une erreur de 2 organismes sur les 90 organismes observés (soit 2,2 % d'estimations erronées). Ainsi, ce modèle prédit la survie des juvéniles de façon fiable. Selon ce modèle, le taux de survie à la fin du stade juvénile vaut 94,1%. Le stade juvénile est donc très résistant chez *V. piscinalis*.

Chez les adultes, la survie diminue plus rapidement que ne le prévoit le modèle linéaire. Les taux de survie suivent une distribution de Weibull, avec un paramètre de forme de la distribution égal à 2 (Kooijman et Bedaux, 1996) : concrètement ce modèle suppose que les effets du vieillissement sont d'autant plus graves que l'organisme est vieux. Le nombre de survivants diminue alors de façon exponentielle avec l'âge (Fig. 38):

$$S_a(t) = S_a(0) \times e^{[-\psi \times (t-t_p)^2]} \quad (10)$$

avec :

- $S_a(t)$ le nombre moyen d'adultes survivant à l'âge t ;
- $S_a(0)$ le nombre d'organismes ayant survécu au stade juvénile ;
- t_p l'âge à la première reproduction, qui marque le début du stade adulte ($t_p = 56$ jours quel que soit le régime alimentaire testé) ;
- ψ une constante qui représente l'accélération de la mortalité liée au vieillissement. D'après nos expériences, $\psi = 0,00001$ chez les adultes.

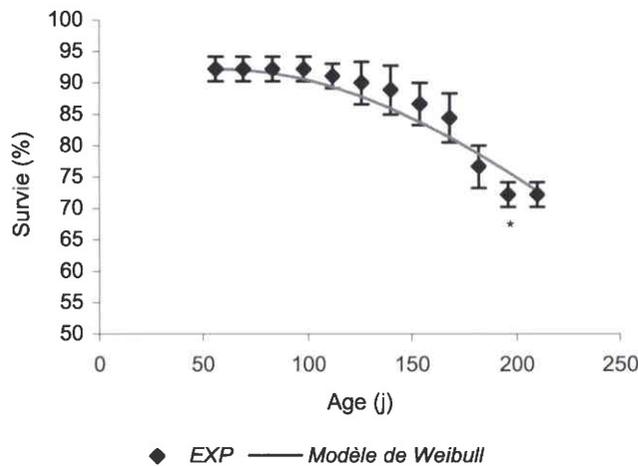


Figure 38. Evolution du taux de survie moyen (et IC 95%) chez les adultes de *Valvata (Cincinna) piscinalis* nourris ad libitum. Comparaison entre les prédictions du modèle (ligne) et les données (points). Les différences significatives entre la prédiction et la donnée sont signalées par un astérisque.

Seule une estimation fournie par le modèle (sur 12 estimations réalisées) est significativement différente du nombre de survivants observés. La racine de la somme des carrés des écarts entre les prédictions et les données correspond à une erreur de 7 organismes sur les 90 organismes observés (soit 7,7 % d'erreur). D'après le test de Fisher, la somme des carrés des écarts entre le modèle et les données est trop faible pour pouvoir rejeter le modèle ($p = 0,73$). Notre modèle prédit donc la survie des adultes de façon fiable.

Selon ce modèle, la durée maximale de survie des adultes dans nos conditions expérimentales est de 617 jours (âge correspondant à un taux de survie de 1%). Cette prévision est plutôt réaliste au regard de la biologie de l'animal, qui vit 1 à 2 ans dans la nature (Fretter et Graham, 1978).

3.2.4. Caractérisation et modélisation de la croissance

Evaluation expérimentale de la croissance : résultats & discussion

La courbe de croissance présente deux phases distinctes : une phase de croissance rapide chez les nouveau-nés et les juvéniles, suivie d'une phase de croissance lente chez les adultes.

Les nouveau-nés et les juvéniles présentent des taux de croissance journaliers similaires : 46 $\mu\text{m}/\text{jour}$ et 55 $\mu\text{m}/\text{jour}$ respectivement (Fig. 39) dans des conditions *ad libitum*. Le rythme de croissance des adultes est dix fois plus lent que celui des organismes immatures (5 $\mu\text{m}/\text{jour}$).

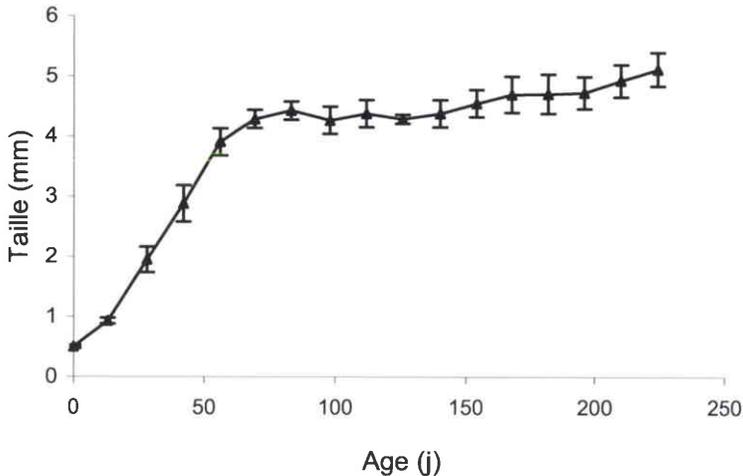


Figure 39. Evolution de la taille moyenne (et IC 95%) de *Valvata (Cincinna) piscinalis* nourris ad libitum

Les organismes âgés de 83 à 126 jours ne grandissent pas significativement. Cet arrêt momentané de la croissance correspond sans doute à un artéfact expérimental lié à une mauvaise qualité du sédiment utilisé à cette période (avril 2004), malgré les précautions que nous avons prises lors de son prélèvement et de son conditionnement (voir paragraphe 2.1.). En effet, l'utilisation du sédiment prélevé en mai 2004 induit la reprise de croissance des

organismes. Le facteur physico-chimique en cause n'a pas été identifié. D'après ces résultats, nous supposons que la croissance de *V. piscinalis* est continue jusqu'à 224 jours. A la fin du test, la taille moyenne des organismes nourris *ad libitum* vaut 5,12 mm (IC 95% [5,05 ; 5,19]).

Afin de vérifier l'hypothèse d'isomorphie, nous avons réalisé des mesures de longueur et de hauteur sur des juvéniles et sur des adultes. Ceci nous a permis de vérifier que la croissance s'opère bien dans les trois dimensions de l'espace, et de calculer des rapports longueur/hauteur dans les deux classes d'âge (tableau XII).

Tableau XII.4. Estimation du rapport entre la longueur et la hauteur de la coquille chez *Valvata (Cincinna) piscinalis*

<i>Stade de développement</i>	<i>juvéniles</i>	<i>adultes</i>
Ratio longueur/ hauteur (et IC 95%)	0,73 [0,70 ; 0,76]	0,86 [0,85 ; 0,88]

Le rapport longueur/hauteur chez les juvéniles est significativement différent de celui des adultes. Cependant, cette différence est faible, puisqu'elle est du même ordre que l'erreur commise en se trompant d'une graduation lors de la mesure (une graduation correspond à 0,14 mm). Nous faisons donc l'hypothèse que *V. piscinalis* présente une croissance isomorphe. Cette hypothèse est soutenue par l'allure de la courbe de croissance : en effet, la forme de type $1-e^{-x}$ est caractéristique des organismes isomorphes (Kooijman, 2000). Nous estimons la constante d'isomorphie à 0,8 (valeur moyenne des rapports longueur/hauteur mesurés chez les juvéniles et les adultes).

Hypothèses biologiques concernant la croissance

D'après les résultats précédents, la croissance de l'organisme est considérée comme isomorphe. La taille moyenne des organismes en fin de test (5,12 mm) est de l'ordre de la taille maximale observée sur le terrain (de 4 à 5 mm selon Fretter et Graham, 1978). La taille de l'organisme en fin de vie correspond donc à l'asymptote de notre courbe de croissance.

La forme de la courbe de croissance permet de formuler des hypothèses quant à la gestion de l'énergie relative à la croissance. Nous supposons, conformément aux hypothèses de la théorie DEB (Kooijman, 2000), que l'énergie acquise tout au long de la vie de l'organisme se partage entre :

- la croissance ;
- la maintenance des tissus et de l'activité de l'organisme (respiration, déplacements, etc.) ;
- les événements liés à la reproduction (mise en place et maintenance des organes reproducteurs, acquisition de réserves pour la première reproduction chez les juvéniles, fabrication des œufs chez les adultes).

Des hypothèses biologiques au modèle de croissance

L'organisme étant isomorphe, son augmentation de poids (w) est proportionnelle à son augmentation de longueur (l) et s'écrit :

$$\frac{dw}{dt} = i \times \frac{dl^3}{dt} \quad (11)$$

avec i la constante d'isomorphie (estimée à 0,8 chez *V. piscinalis*).

D'après les hypothèses biologiques précédentes, cette augmentation de poids correspond à la différence entre la quantité de nourriture assimilée et l'énergie nécessaire à assurer la maintenance somatique et gonadique. La quantité de nourriture assimilée est proportionnelle à la surface de l'intestin, qui dépend de la taille des organismes (l). Par ailleurs, les coûts de maintenance sont proportionnels au volume de l'organisme (Kooijman, 2000). L'augmentation de poids d'un organisme au cours du temps s'écrit donc :

$$\frac{dw}{dt} = al^2 - bl^3 \quad (12)$$

avec :

- a une constante qui décrit la quantité d'énergie assimilée par l'organisme en une unité de temps pour une densité en nourriture constante dans le milieu ;
- b le coût de maintenance d'une unité de tissu.

D'après les équations 11 et 12 :

$$i \times \frac{dl^3}{dt} = al^2 - bl^3 \quad (13)$$

En résolvant l'équation 13, nous obtenons une équation qui permet de modéliser la croissance des organismes:

$$l(t) = \frac{a}{b} \left[1 - e^{-\frac{b}{3i}(t-t_0)} \right] \quad (14)$$

avec :

- a/b la taille maximale de l'organisme, que nous appellerons l_∞ ;
- $b/3i$ le taux de croissance journalier des organismes, que nous appellerons γ ;
- t_0 une constante qui correspond au temps théorique où les organismes mesureraient 0 mm s'ils grandissent selon cette équation (moyen d'initialiser la courbe de croissance théorique).

Selon nos nouvelles notations, la croissance des organismes soumis à une température et à un apport alimentaire constant, s'écrit en fonction de son âge t :

$$l(t) = l_\infty \left[1 - e^{-\gamma(t-t_0)} \right] \quad (15)$$

Ce modèle de croissance théorique s'observe chez de nombreux organismes isomorphes : il a été décrit pour plus de 270 espèces appartenant à différents phyla (Kooijman, 2000). Parmi ces organismes figure la limnée (Zonnenveld, 1992), dont la courbe de croissance sur le terrain est très proche de celle de *V. piscinalis* (Russel-Hunter, 1961). Ce modèle de croissance est connu sous le nom de « modèle de Von Bertalanffy ».

La courbe de croissance théorique peut aussi être initialisée à partir de la longueur des organismes à la naissance (Kooijman, 2000). La taille des organismes au temps t s'écrit alors :

$$l(t) = l_\infty - (l_\infty - l_b) \times e^{-\gamma t} \quad (16)$$

avec l_b la taille de l'organisme à la naissance.

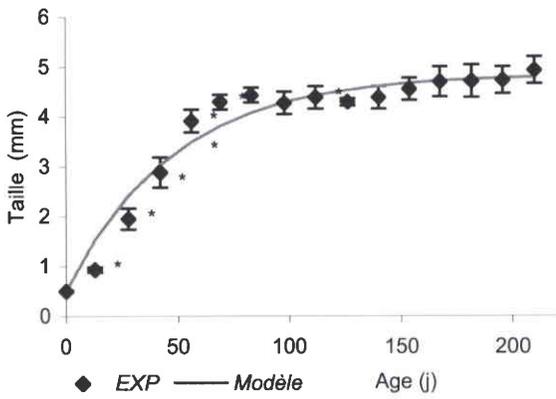
Comme nous connaissons la valeur de ce paramètre, nous utiliserons la formule 16 plutôt que la formule 15 comme modèle de croissance pour *V. piscinalis*.

Paramétrage du modèle de croissance

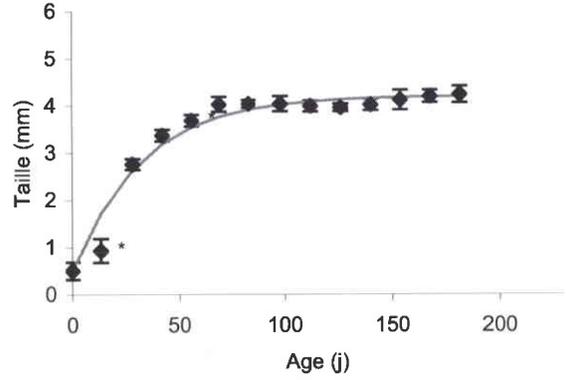
L'ajustement de la courbe de croissance de Von Bertalanffy à nos données permet d'obtenir une estimation de la taille asymptotique et du taux de croissance (Fig. 40). Ces paramètres sont estimés empiriquement pour chaque niveau alimentaire, puisque l'une des hypothèses fondamentales des modèles est que la densité de nourriture est constante dans le milieu : il existe donc un jeu de paramètres pour chaque densité de nourriture testée.

Les courbes de croissance de Von Bertalanffy décrivent nos données de façon satisfaisante : en effet, d'après les tests de Fisher, les sommes des carrés des écarts entre les modèles et les données ne sont pas suffisantes pour rejeter les modèles (les valeurs de p valent respectivement 0,50 ; 0,45 ; 0,38 ; 0,38 et 0,38 pour les régimes alimentaires 0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 et 0,8 mg de tétramin /individu/jour ouvré).

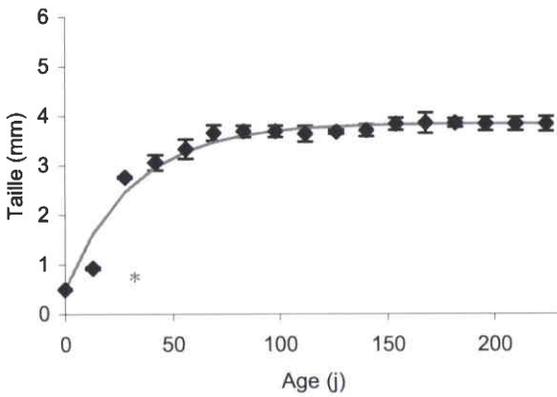
Nous remarquons toutefois que pour le niveau d'alimentation *ad libitum*, le taux de croissance prévu par le modèle surestime la vitesse de croissance des juvéniles. Le modèle de Von Bertalanffy estime un taux de croissance journalier moyen, valable pour les juvéniles et les adultes. Etant donné que la durée du stade juvénile est beaucoup plus faible que celle du stade adulte dans notre expérience (56 jours contre 168 jours respectivement), le rythme de croissance des adultes a probablement plus d'influence sur l'estimation de γ que le rythme de croissance des juvéniles. Le rythme de croissance des organismes dépend beaucoup de la valeur nutritive de ce qu'ils mangent. En utilisant un taux de croissance journalier moyen pour les juvéniles et les adultes, nous supposons implicitement qu'ils mangent la même chose. La vitesse de croissance des juvéniles prédite par le modèle est donc basée sur l'hypothèse qu'ils mangent principalement de la Tétramin®, comme les adultes (paragraphe 3.2.1.). Or, d'après les résultats de Russel-Hunter (1961), les juvéniles se nourrissent principalement de la matière organique et bactérienne du sédiment pendant leurs premières semaines de vie. La valeur énergétique de cette nourriture est très inférieure à celle de la Tétramin® (Péry *et al.*, 2004b). Ceci explique pourquoi les tailles des juvéniles estimées par le modèle sont généralement supérieures aux tailles observées.



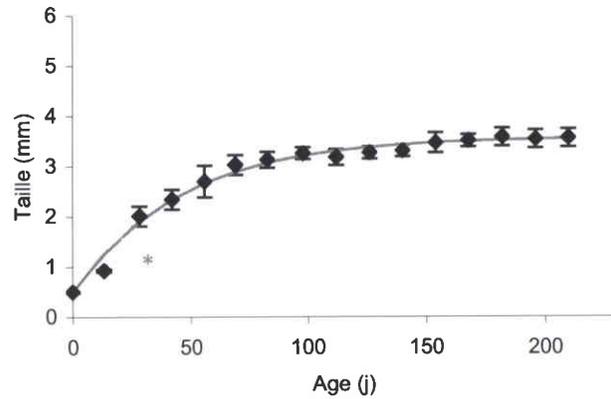
0,8 mg Tetramin®/ind/j
 $\gamma = 0,0208 ; l_{\infty} = 4,85 ; l_b = 0,5$



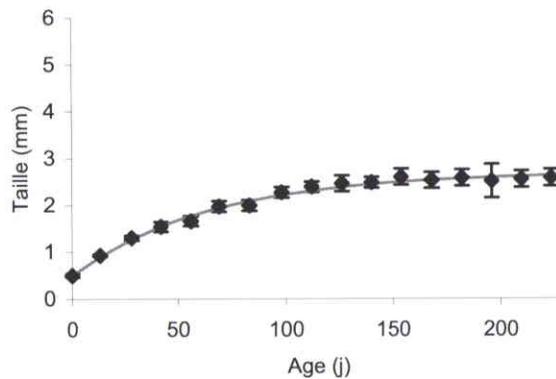
0,4 mg Tetramin®/ind/j
 $\gamma = 0,0307 ; l_{\infty} = 4,21 ; l_b = 0,5$



0,2 mg Tetramin®/ind/j
 $\gamma = 0,0316 ; l_{\infty} = 3,85 ; l_b = 0,5$



0,1 mg Tetramin®/ind/j
 $\gamma = 0,0217 ; l_{\infty} = 3,58 ; l_b = 0,5$



Non Nourris
 $\gamma = 0,0154 ; l_{\infty} = 2,70 ; l_b = 0,5$

Figure 40. Evolution de la taille moyenne (et IC 95%) de *Valvata* (*Cincinna*) *piscinalis* et ajustements de la courbe de croissance de Von Bertalanffy, avec l_{∞} la taille asymptotique, l_b la taille de l'organisme à la naissance et γ le taux de croissance estimés pour les différents régimes alimentaires testés. Les différences significatives entre la prédiction (ligne) et la donnée (point) sont signalées par un astérisque.

Nous supposons donc que la surestimation des taux de croissance des juvéniles provient de l'incapacité du modèle à prendre en compte le fait que les juvéniles ne mangent pas la même chose que les adultes. Pour valider cette hypothèse, il faudrait étudier de façon comparative la signature isotopique de la nourriture ingérée par les juvéniles et les adultes.

L'étude des écarts au modèle met en évidence une structure des résidus pour chacun des niveaux d'alimentation testés : nous relevons une anomalie de signe. En effet, chez les individus âgés de 83 à 126 jours, la taille prédite est plus élevée que la taille observée. Les résidus correspondant sont donc tous négatifs (alors que leur signe doit être aléatoire). Ce résultat est la conséquence de l'artéfact expérimental précédemment évoqué (arrêt momentané de la croissance lié à une mauvaise qualité du sédiment utilisé à cette période).

Afin de tester la pertinence des paramètres que nous avons estimés, il faut comparer les prédictions du modèle avec des données expérimentales différentes de celles que nous avons utilisées pour le paramétrage. Pour ce faire, à défaut de refaire un test de 224 jours en conditions témoins, nous pouvons utiliser les données de croissance obtenues sur les lots témoins des essais de toxicité en conditions de nourriture *ad libitum*.

Le modèle permet d'estimer de façon fiable la taille des organismes témoins de l'essai reproduction : la taille asymptotique prédite (4,85 mm) n'est pas significativement différente de la taille mesurée en fin d'essai (organismes âgés de 202 jours, de taille moyenne 4,94 mm (IC_{95%} [4,70 ; 5,19])).

Par ailleurs, le modèle fournit des estimations fiables de la taille des organismes témoins de l'essai croissance pour les mesures effectuées pour 2 contrôles (21 et 56 jours) sur les 3 contrôles effectués (Fig. 41). L'estimation erronée correspond à une surestimation de la taille des juvéniles, ce qui rejoint le problème évoqué précédemment. Cependant, cette erreur est sans conséquence sur la fiabilité de l'estimation de l'âge à la puberté, qui est le paramètre essentiel lors de la modélisation de la dynamique de la population (voir chapitre V).

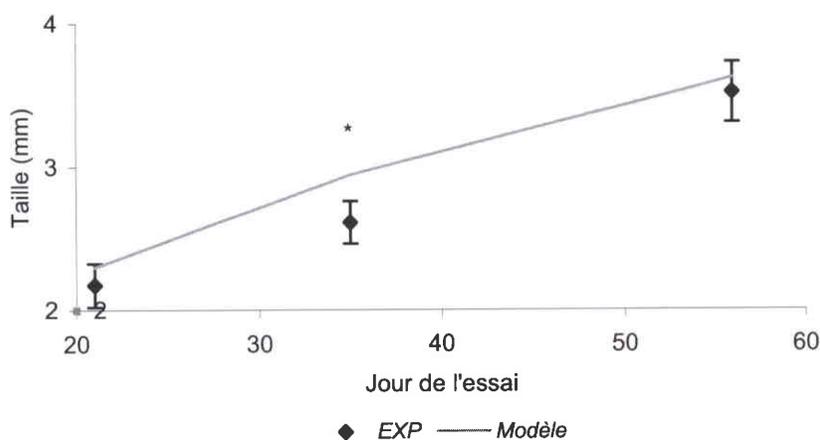


Figure 41. Taille moyenne (et IC 95%) des organismes témoins de l'essai croissance, nourris ad libitum. Les différences significatives par rapport aux témoins sont signalées par un astérisque.

D'après ces résultats, nous considérons que notre modèle est suffisamment fiable pour décrire la croissance de *V. piscinalis* en conditions d'alimentation inférieures au niveau *ad libitum*, ainsi que pour décrire la date de la puberté au niveau d'alimentation *ad libitum*. La validation du modèle nécessite la réalisation d'un nouveau test de croissance, équivalent à celui dont les données nous ont permis de paramétrer le modèle. Ce test n'a pas été réalisé durant la thèse, faute de temps.

3.2.5. Caractérisation et modélisation de la reproduction

Evaluation expérimentale de la reproduction : résultats & discussion

Les organismes nourris avec du sédiment sans apport de Tétramin® ne se reproduisent pas. Le sédiment représente donc une ressource énergétique insuffisante pour leur permettre d'atteindre la taille minimale nécessaire pour se reproduire au bout de 224 jours dans nos conditions expérimentales.

Cette taille minimale correspond à la taille moyenne mesurée au premier contrôle de taille suivant le début de la reproduction chez les organismes nourris avec le plus faible apport de Tétramin® permettant la reproduction (soit 0,1 mg Tétramin®/individu/jour ouvré). Elle est estimée à 3,03 mm (IC 95% [2,77 ; 3,28]). Cette valeur n'est pas significativement différente des valeurs reportées dans la littérature (3,2 mm pour Cleland, 1954) et observées dans la

population naturelle échantillonnée pour l'élevage au laboratoire (3 mm, d'après J. Mouthon, données non publiées).

Pour le régime alimentaire le plus limitant (0,1 mg/individu/jour ouvré), les organismes atteignent la taille minimale pour se reproduire lorsqu'ils sont âgés de 70 à 77 jours. Les organismes nourris avec des doses journalières de Tétramin® supérieures ou égales à 0,2 mg/individu/jour ouvré atteignent tous la taille minimale pour se reproduire entre 40 et 50 jours.

Quel que soit le régime alimentaire testé, la reproduction commence une à deux semaines après l'acquisition de la puberté. Le fait que le début de la reproduction soit synchrone pour des organismes nourris à des niveaux différents correspond probablement à un artefact de laboratoire : en effet, nous supposons que seuls les individus les plus gros se reproduisent dans les lots les moins nourris. Ainsi, l'âge moyen de première reproduction est probablement sous-estimé pour les organismes limités en nourriture.

Le nombre d'œufs par capsule est constant au cours de la vie de l'organisme et proportionnel au niveau d'alimentation. Il peut être prédit à partir de la taille asymptotique de l'organisme (Fig. 42). Pour un apport alimentaire *ad libitum*, il vaut 13,2 (IC 95% : [12,3 ; 14,1]).

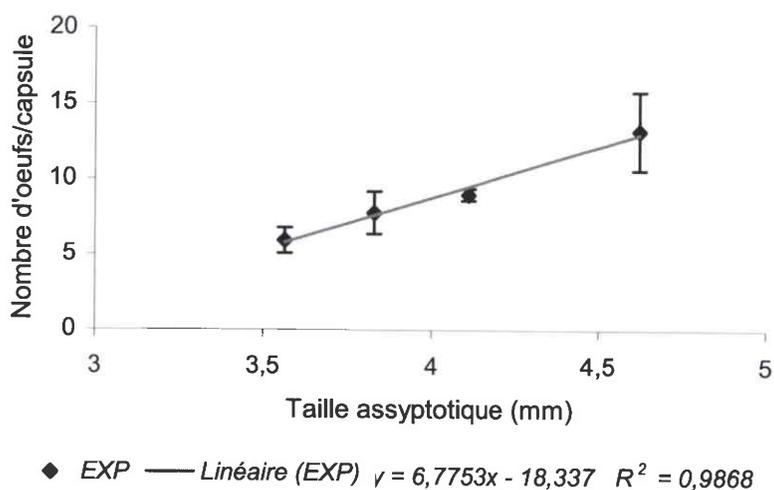


Figure 42. Relation entre le nombre d'œufs moyen par capsule (et IC 95%) et la taille asymptotique chez Valvata (Cincinna) piscinalis

Le rythme de reproduction est similaire pour tous les régimes alimentaires testés. Les organismes se reproduisent de façon cyclique, quatre fois durant l'essai de 224 jours (Fig. 43).

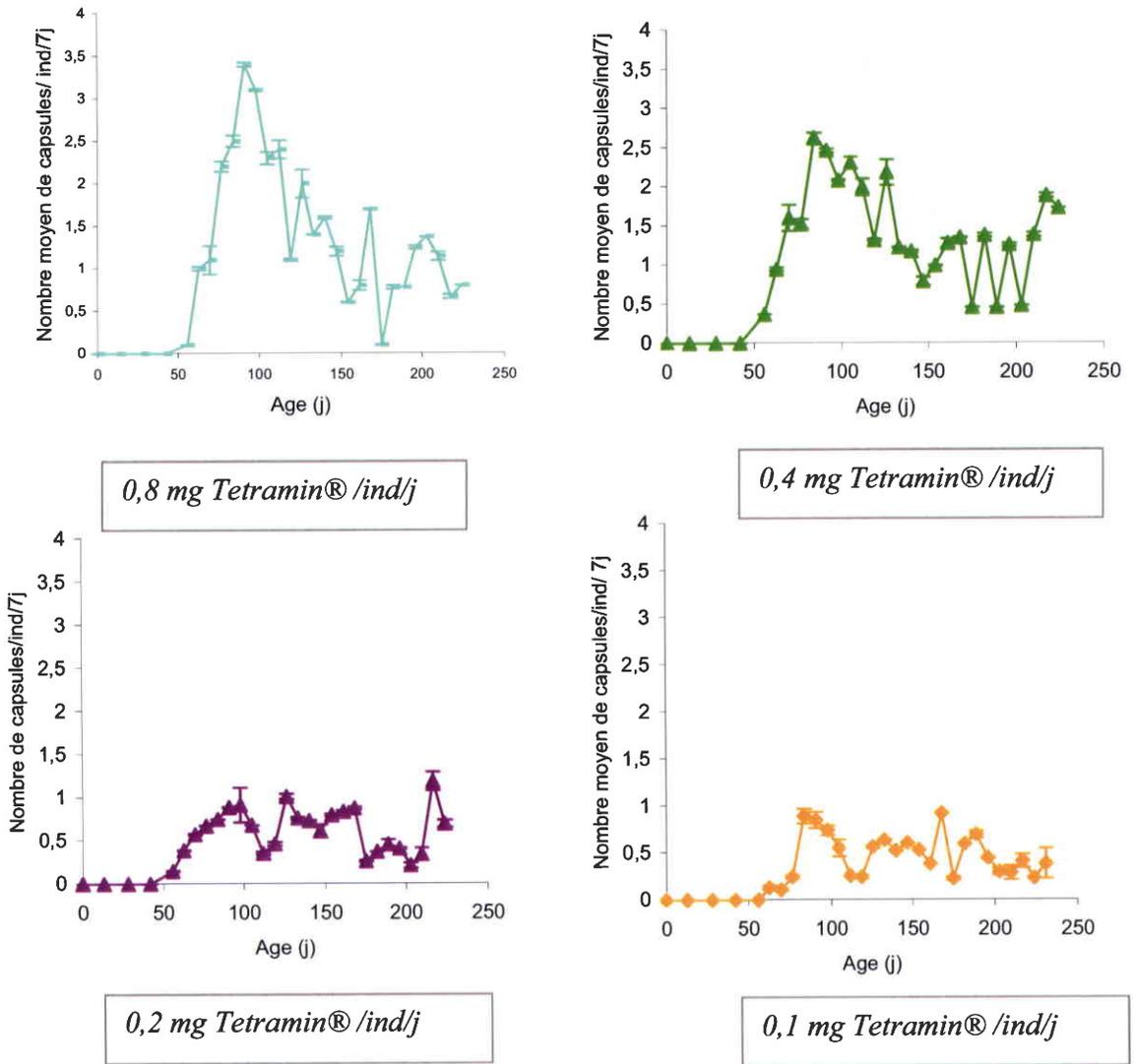


Figure 43. Evolution du nombre moyen de capsules pondues par individu en 7 jours (et IC 95%) selon l'apport alimentaire journalier chez Valvata (Cincinna) piscinalis.

Le premier cycle de ponte est le plus long : il faut 63 jours pour que tous les individus se reproduisent. Les cycles de ponte suivants durent près d'un mois (33 jours ; IC 95% : [28 ; 37]). Les pics de reproduction surviennent de manière cyclique environ tous les 41 jours (IC 95% : [34 ; 48]). Pour les organismes nourris avec 0,4 et 0,8 mg/individu/jour ouvré, le nombre de capsules produites par individu en une reproduction diminue au fil du test. Ceci suggère que la fécondité est liée à l'âge des organismes : plus les besoins énergétiques pour la maintenance des cellules augmentent (en liens avec le vieillissement), moins il reste à

l'organisme d'énergie à investir pour la fabrication des œufs. Cependant, cette diminution de fécondité en fonction de l'âge n'est pas observée chez les organismes nourris avec 0,1 et 0,2 mg/individu/jour ouvré. Nous avons donc besoin de données complémentaires afin de savoir si la fécondité des organismes diminue ou non au cours de leur vie. Ces données nous serviront aussi pour vérifier et préciser nos observations concernant la durée des cycles de pontes, ainsi que l'intervalle de temps entre ces cycles.

D'autres données ont été obtenues en milieu non contaminé grâce :

- à une expérience supplémentaire de reproduction réalisée sans sédiment (173 jours ; nourriture *ad libitum* (0,9 mg Tétramin®/ individu/jour ouvré),
- aux témoins de l'essai de toxicité sur la reproduction. (202 jours ; nourriture *ad libitum* (0,8 mg Tétramin®/ individu/jour ouvré + sédiment non renouvelé).

L'âge à la puberté, la durée du premier cycle de pontes ainsi que la fécondité durant la première reproduction sont similaires dans toutes les expériences. Ces paramètres sont donc peu variables dans nos conditions expérimentales.

A partir de la seconde ponte, la durée moyenne d'un cycle de ponte reproduction est de 27 jours en moyenne dans l'expérience de 173 jours, contre 33 jours dans l'expérience de 224 jours et 71 jours en moyenne dans les témoins de l'essai reproduction. Ces résultats montrent que la durée des cycles de ponte est un paramètre très variable dans nos conditions expérimentales.

Pour un régime alimentaire équivalent, la diminution de la fécondité avec l'âge des organismes n'a été observée ni dans l'expérience de 173 j, ni dans les témoins de l'essai reproduction (202 jours). Finalement, cette réduction de la fécondité au cours de la vie de l'organisme n'a été observée que dans 2 expériences sur 7. Par ailleurs, ce résultat n'est pas cohérent avec la stratégie de reproduction des gastéropodes (J. Mouthon, Comm. Pers.) : la fécondité des organismes étant liée à leur taille, elle augmente ou se maintient au cours de la vie de l'organisme. Nous supposons que ce résultat correspond donc à un artefact de laboratoire. Nous ne connaissons pas les causes de cet artefact.

Hypothèses biologiques concernant la reproduction

Les juvéniles possèdent un appareil géniteur mâle fonctionnel, qui permet la production et la maturation du sperme (Cleland, 1954). L'investissement énergétique pour la reproduction commence donc dès le stade juvénile. La puberté n'est acquise qu'à partir d'une taille minimale (3 mm environ dans nos conditions expérimentales). L'organisme pubère ne pond pas durant les quinze premiers jours de sa vie adulte, bien qu'il ait atteint sa taille minimale pour la puberté. Il y a donc une notion « d'âge adulte minimal » pour se reproduire. Ce décalage entre la puberté et la première reproduction s'explique probablement par la recherche d'un partenaire sexuel, ainsi que par la nécessité d'obtenir une certaine quantité d'énergie afin de pouvoir fabriquer les gamètes ainsi que le vitellus destiné à nourrir les œufs.

Puisque le nombre d'œufs par masse est constant au cours de la vie de l'organisme, une ponte correspond toujours à la même quantité d'énergie. Comme le nombre d'œufs par masse dépend linéairement de l'apport alimentaire fourni aux organismes, nous supposons que cette quantité d'énergie est déterminée par la densité de nourriture présente dans le milieu. Cette dernière détermine aussi la taille asymptotique de l'organisme. Pour un apport alimentaire donné, le nombre d'œufs par masse est donc corrélé à la taille asymptotique des individus.

L'énergie acquise par l'organisme doit être stockée dans un compartiment de réserves avant d'être utilisée. Nous supposons que comme chez la limnée, dont l'appareil génital est proche de celui de *V. piscinalis* (Russel-Hunter, 1961), ce compartiment de stockage correspond à un ensemble de glandes génitales (e.g. glandes à albumen (Zonnenveld, 1992), glandes à mucus (Cleland, 1954)).

Ce compartiment de stockage est ensuite vidé afin de produire une série de pontes. Ceci survient tous les 41 jours environ dans nos conditions expérimentales, quel que soit le régime alimentaire testé. Nous pouvons supposer que, comme chez la limnée, la ponte est déclenchée par un stimulus chimique qui est généré lorsque la quantité d'énergie dans le compartiment de stockage atteint un certain niveau (Zonnenveld, 1992).

Des hypothèses biologiques au modèle

D'après les hypothèses formulées ci dessus, la fécondité des organismes dépend de la quantité de réserves du gastéropode. Cette quantité de réserves disponible se partage entre la croissance et la reproduction. Pour un apport alimentaire donné, le nombre d'œufs par masse est corrélé à la taille asymptotique des individus. Leur fécondité à un âge donné peut donc être prédite à partir du ratio entre leur taille à cet âge et la taille maximale. Ce rapport L est appelé taille relative des organismes (« scaled length » des modèles DEB). La fécondité cumulée des organismes à un âge donné peut donc être prédite selon l'équation suivante (Kooijman, 2000) :

$$N(l) = \frac{N_{max}}{1 - L_p^3} \times \left(\frac{L^2 + L^3}{2} - L_p^3 \right) \quad (17)$$

$$\text{avec } L = \frac{l}{l_\infty} \text{ et } L_p = \frac{l_p}{l_\infty}$$

pour :

- l la taille à un âge donné ;
- l_∞ la taille asymptotique de l'organisme ;
- N_{max} sa fécondité totale au cours du cycle de vie ;
- l_p sa taille à la première reproduction.

Les valeurs de l et l_∞ sont prédites à partir de modèle de croissance de Von Bertalanffy. Les valeurs de N_{max} et l_p sont obtenues grâce aux résultats des essais de reproduction.

Paramétrage du modèle de reproduction

Puisque nous supposons que la diminution de la fécondité des organismes nourris *ad libitum* pendant 224 jours avec leur âge est un artefact de laboratoire, nous n'avons pas utilisé ces données pour paramétrer le modèle de reproduction. Le modèle a été paramétré sur la base des données de reproduction de l'essai de 173 jours. A partir de ces données, nous obtenons $l_p = 3,01$ mm et $N_{max} = 26,1$ œufs/individu/7jours (Fig. 44).

Le modèle ainsi paramétré décrit les données de façon satisfaisante, car 76% des valeurs prédites appartiennent à l'intervalle de confiance à 95% de la fécondité cumulée observée.

Bien que ce modèle ait été paramétré sur des données obtenues en eau seule, il est théoriquement capable de prédire des données obtenues sur sédiments puisque la condition d'apport alimentaire *ad libitum* est respectée dans les deux cas.

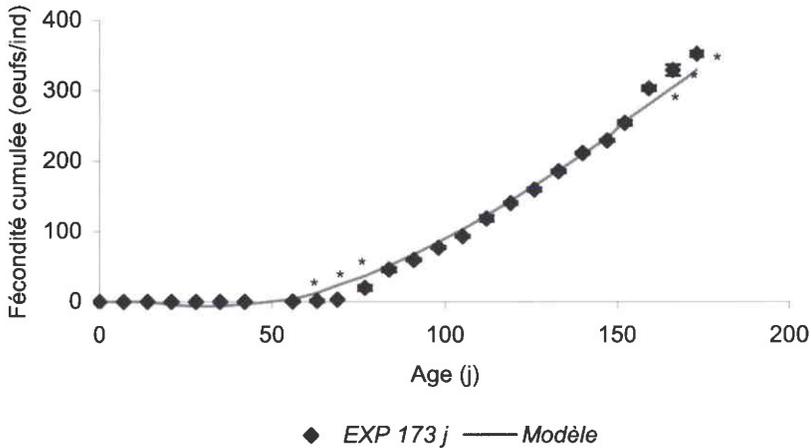


Figure 44. Evolution de la fécondité cumulée (et IC_{95%}) chez *Valvata (Cincinna) piscinalis* dans l'expérience de 173 j (eau seule) : comparaison entre les prédictions du modèle de reproduction paramétré sur le même jeu de données (ligne) et les données (points). Les différences significatives entre les prédictions et les données sont signalées par un astérisque.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons comparé les prédictions du modèle paramétré avec les données du test en eau seule, et les données des témoins de l'essai de reproduction (202 jours, sur sédiment). 74% des estimations du modèle sont incluses dans l'intervalle de confiance à 95 % de la fécondité cumulée observée (Fig. 45).

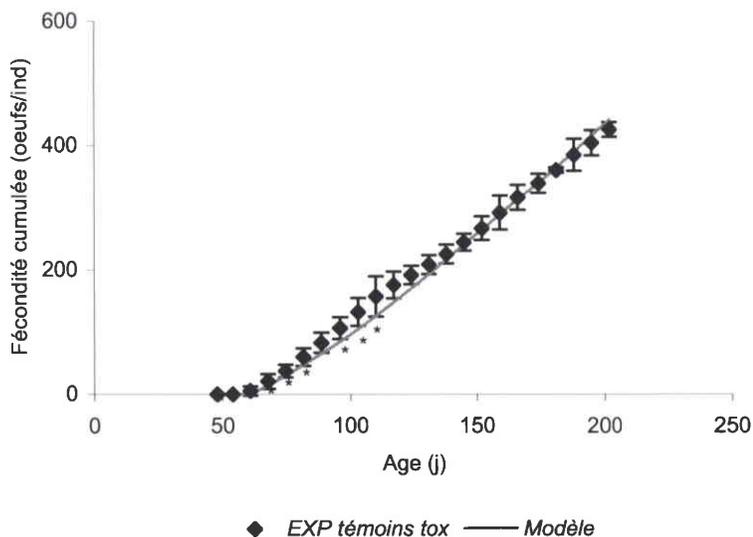


Figure 45. Evolution de la fécondité cumulée (et IC_{95%}) chez *Valvata (Cincinna) piscinalis* dans l'expérience de 202 j (sur sédiment) : comparaison entre les prédictions du modèle de reproduction paramétré à partir des données acquises en eau seule (ligne) et les données obtenues sur sédiment (points). Les différences significatives entre les prédictions et les données sont signalées par un astérisque.

La racine de la somme des carrés des écarts entre la donnée et la prédiction est faible : elle correspond à une erreur de 20 œufs sur 441 œufs comptés (soit une erreur de 5%). D'après le test de Fisher, la somme des carrés des écarts entre la donnée et le modèle est insuffisante pour rejeter le modèle ($p = 0,40$). Notre modèle permet donc de prédire la fécondité cumulée observée des témoins de façon satisfaisante

D'après ces résultats, nous considérons que nous pouvons utiliser le modèle de reproduction mis au point à partir des données obtenues en eau seule pour l'analyse de la fécondité de *V. piscinalis* sur sédiment, pour un apport alimentaire *ad libitum*.

3.2.6. Paramètre du cycle de vie de *Valvata (Cincinna) piscinalis* dans nos conditions expérimentales : bilan

Le tableau XIII présente une synthèse de la valeur des paramètres du cycle de vie de *V. piscinalis* en conditions de laboratoire.

Tableau XIII. Synthèse des paramètres du cycle de vie de *Valvata (Cincinna) piscinalis* dans nos conditions expérimentales (21°C, nourriture ad libitum, autres conditions précisées au sous-chapitre 2)

<i>Stade de développement</i>	<i>Paramètre d'histoire de vie</i>	<i>Valeur en laboratoire (IC_{95%})</i>
Embryons (0 - 14 j)	Taille des capsules	1,1 mm [1,0 ; 1,2]
	Durée moyenne de maturation des capsules	14 j [13,4 ; 14,6]
	Taux de survie embryonnaire	94,3 % [79,8 ; 100]
Nouveau-nés (14 - 28 j)	Durée du stade	14 j
	Longueur moyenne en début de stade	546,5 µm [531,8 ; 561,1]
	Taux de survie	100%
	Apport de nourriture <i>ad libitum</i> *	0,1 mg de Tétramin®/ind./j ouvré
	Taux de croissance journalier moyen	46 µm/j
Juvéniles (28 - 56 j)	Durée du stade	42 j
	Longueur moyenne en début de stade	1,0 mm [0,9 ; 1,1]
	Taux de survie (modélisé)	92,2%
	Apport de nourriture <i>ad libitum</i> *	0,4 mg de Tétramin®/ind./j ouvré
	Taux de croissance journalier moyen	55 µm/j
Adultes (56 - 673 j)	Age moyen à la puberté	56 j
	Taille minimale à la puberté	3,0 mm [2,8 ; 3,3]
	Taux de survie (modélisé)	50 % à 281 j
	Apport de nourriture <i>ad libitum</i> *	0,8 mg de Tétramin®/ind./j ouvré
	Taux de croissance journalier moyen	5µm/j
	Taille maximale moyenne à 224 jours	5,1 mm [5,0 ; 5,2]
	Nombre de reproductions/ind.	≥ 2
	Nombre moyen d'œufs par capsules	13,2 [12,3 ; 14,1]
	Fécondité moyenne à 224 j	482 oeufs [359 ; 606]
	Nombre de cohortes/an	≥ 4
	Durée maximale du cycle de vie (modélisée)	673 j

* Le sédiment naturel constitue un apport alimentaire équivalent à 0,1 mg de Tétramin®/individu/jour ouvré.

3.3. Cycle de vie de *Branchiura sowerbyi*

Dans la littérature, les organismes utilisés pour les tests de toxicité sont soit prélevés sur le terrain, soit achetés dans des fermes piscicoles. Nous disposons de peu d'informations quant au cycle de vie au laboratoire de l'oligochète. Par ailleurs, ces informations varient d'une étude à l'autre. Il est donc difficile de caractériser les paramètres du cycle de vie sur la base de la littérature.

L'information nécessaire a été recueillie grâce à la réalisation de deux essais sur sédiments : un essai de courte durée (42 jours) destiné à déterminer le niveau d'alimentation *ad libitum* des organismes, et un essai longue durée en conditions d'alimentation *ad libitum* (378 jours) destiné à déterminer leurs courbes de croissance et de reproduction.

3.3.1. Détermination du niveau d'alimentation *ad libitum*

Niveaux d'alimentation *ad libitum* au cours du cycle de vie

Le test est démarré avec des organismes de poids moyen 3,73 mg (IC_{95%} : [3,67 ; 3,78]). Il est arrêté lorsque les organismes commencent à se reproduire, soit au 42^{ème} jour du test. Les poids des organismes au 42^{ème} jour n'ont pas été déterminés pour les régimes alimentaires 0 et 6,4 mg de Tétramin®/individu/jour ouvré, suite à une erreur de manipulation.

La survie des organismes ne varie pas significativement en fonction de la dose de nourriture fournie. Cependant, la dose de nourriture la plus élevée (6,4 mg de Tétramin®/individu/jour ouvré) provoque un stress qui ralentit significativement la croissance des juvéniles : leur taille n'est pas significativement différente de celle des organismes non nourris (Fig. 46).

L'apport de 1,6 et 3,2 mg de Tétramin®/individu/jour ouvré résulte en une prise de poids équivalente des juvéniles. La dose de 1,6 mg/individu/jour ouvré correspond donc à un apport alimentaire *ad libitum* pendant les 30 premiers jours de test.

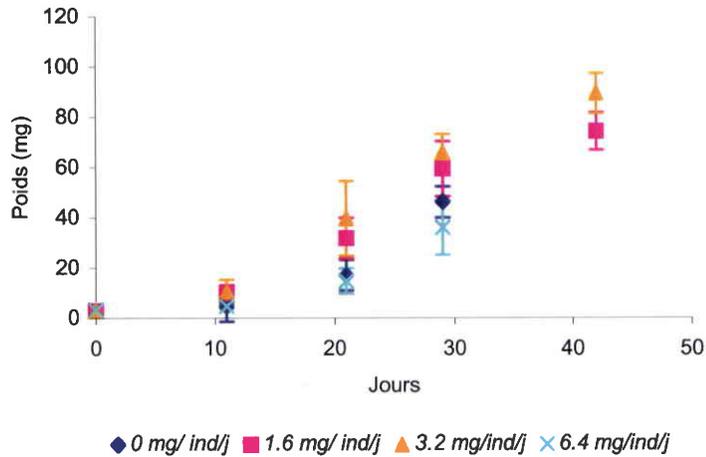


Figure 46. Poids moyen (et IC 95%) de *Branchiura sowerbyi* en fonction de l'apport alimentaire (Tétramin®)

Cependant, cette dose ne permet pas d'optimiser la croissance des adultes : les organismes nourris avec 3,2 mg Tétramin®/individu/jour ouvré sont significativement plus gros au 42^{ème} jour du test que ceux nourris avec 1,6 mg/individu/jour ouvré. Par ailleurs, le nombre d'individus gravides à 42 jours est significativement plus élevé pour un apport de 3,2 mg de Tétramin®/individu/jour ouvré que pour un apport de 1,6 mg/individu/jour (Fig. 47) . La dose de 3,2 mg de Tétramin®/individu/jour ouvré permettant de maximiser à la fois la croissance et la reproduction, elle correspond à l'apport *ad libitum* chez les adultes de *B. sowerbyi*.

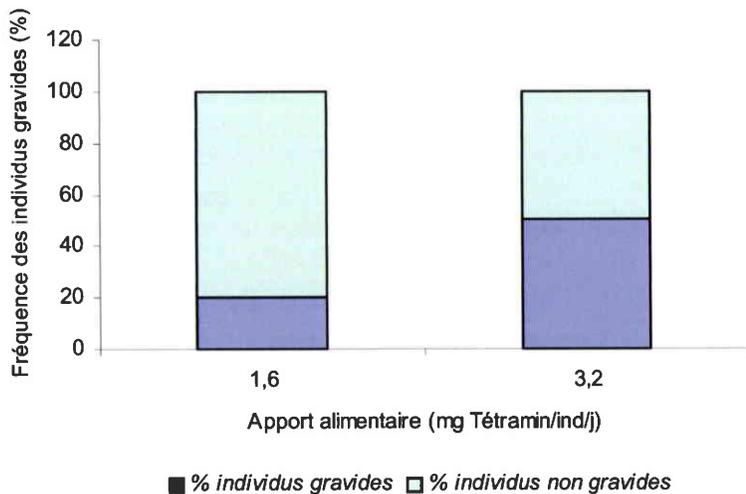


Figure 47. Fréquence d'individus gravides au 42^{ème} jour du test en fonction de l'apport alimentaire chez *Branchiura sowerbyi*

Pertinence de notre mesure du niveau d'alimentation *ad libitum*

Comme pour *V. piscinalis*, deux sources de nourriture sont disponibles dans nos béchers de test pour *B. sowerbyi* : la Tétramin® apportée quotidiennement et la matière organique et bactérienne du sédiment. Les organismes nourris seulement avec le sédiment sont capables de grandir, mais leur masse au 29^{ème} jour du test est en moyenne 30% moins élevée que celle des organismes nourris *ad libitum* (sédiment + 3,2 mg Tétramin®/individu/jour ouvré). Cette différence étant significative, ceci montre que la quantité d'énergie fournie par le sédiment n'est pas négligeable par rapport à la quantité d'énergie fournie par l'expérimentateur. Cet apport alimentaire secondaire a été quantifié en utilisant la même approche que pour *V. piscinalis* (voir paragraphe 3.2.1.)

Nous calculons le poids d'un organisme en fin d'essai en fonction de l'efficacité de recherche de nourriture pour chaque niveau d'alimentation testé selon la formule suivante :

$$\frac{Q}{C} = \frac{w_{\max}}{W_{\max} - w_{\max}} \quad (18)$$

avec :

- C une constante qui exprime la difficulté pour un individu à trouver la nourriture ;
- Q la quantité d'énergie réellement disponible pour l'organisme ;
- w_{\max} le poids maximal en fin d'essai d'un organisme limité en nourriture ;
- W_{\max} le poids maximal en fin d'essai d'un organisme nourri *ad libitum*.

Nous connaissons w_{\max} et W_{\max} pour chaque niveau d'alimentation Q_{Tetra} testé. Les paramètres manquants, C et Q_{sed} peuvent alors être estimés en traçant Q/C en fonction de Q_{Tetra} . ($C=1/a$ et $Q_{\text{sed}} = C \times b$ pour $Q_{\text{Tetra}}=0$, avec a la pente de la droite de régression $Q/C = f(Q_{\text{Tetra}})$ et b son ordonnée à l'origine).

Nous ne disposons que de deux points pour tracer la droite de régression, car nous n'avons testé que deux régimes alimentaires limitants (0 et 1,6 mg Tétramin®/individu/jour ouvré). Les résultats suivants ne correspondent donc qu'à des estimations grossières. Nous obtenons $a = 0,5714$ et $b = 1,0691$, d'où $C = 1,75$ jour / mg nourriture / individu, et $Q_{\text{sed}} = 1,8$ mg équivalent Tétramin®/individu/jour ouvré.

D'après ces résultats, la quantité de nourriture disponible pour les adultes à partir du sédiment frais non renouvelé équivaut grossièrement à un apport de 1,8 mg de Tétramin®/individu/jour ouvré. Pour les organismes nourris *ad libitum*, ceci implique qu'un tiers de la nourriture assimilée provient du sédiment, le reste provenant de la Tétramin®. L'apport énergétique du sédiment est donc loin d'être négligeable chez *B. sowerbyi*.

3.3.2. Déroulement du cycle de vie en conditions contrôlées

Le déroulement chronologique du cycle de vie d'organismes nourris *ad libitum* est présenté dans le tableau XIV. Tous les stades de développement se déroulent au contact du sédiment

Tableau XIV. Description schématique du cycle de vie de *Branchiura sowerbyi* en conditions ad libitum

<i>Stade de développement</i>	<i>Durée moyenne du stade (jour)</i>	<i>Poids moyen en début de stade (et IC 95%)</i>	<i>Tailles moyennes en début de stade (et IC 95%)</i>
Œuf	17 +/-7	ND	Diamètre : 1,9 mm [1,8 ; 2] Longueur : 2,8 mm [2,7 ; 2,9]
Nouveau-né	9 +/-1	0,53 mg [0,28; 0,79]	0,3 - 1 cm ¹
Juvénile	47 +/- 6	5 mg ¹	2 - 4 cm ²
Adulte	≤ 1050 ³	84,1 mg [57 ; 62]	8 - 10 cm ²

¹ Aston *et al.*, 1982

² Yanling, 1984

³ Valeur prédite par le modèle de Weibull (voir paragraphe 3.3.3.)

3.3.3. Caractérisation et modélisation de la survie

Taux d'éclosion et survie embryonnaire

Lorsque les organismes sont nourris *ad libitum*, le nombre moyen d'œufs par cocons est de 2,2 (IC_{95%} : [1,8 ; 2,6]). Ceci confirme la valeur moyenne de 2,7 +/- 0,5, obtenue en laboratoire par Aston *et al.* (1982).

A 21°C, la durée du développement embryonnaire pour des cocons cultivés dans du sédiment naturel est de 17 +/- 7 jours. Ce résultat confirme les observations de Casellato (1984) qui propose une durée de développement de 12 à 14 jours à 21°C.

Les cocons n'ayant pas éclos 4 semaines après la ponte ne sont pas considérés comme viables (Aston *et al.*, 1982). Ces cocons ont un aspect blanc opaque ou noir. Leur dégénérescence peut être liée à une attaque fongique ou à un endommagement pendant leur manipulation (Casellato, 1984).

La survie embryonnaire est très variable d'une expérience à l'autre : pour 7 tests réalisés dans des conditions expérimentales similaires, la survie embryonnaire moyenne varie de 10,1 à 64,3 % selon le test. Cette variabilité a aussi été relevée dans la littérature : à 20°C, la survie embryonnaire est estimée à 18% par Aston *et al.* (1982) alors que Casellato (1984) propose une valeur de 70%. A partir de nos tests, nous estimons la survie embryonnaire moyenne à 31,7 % (IC 95% : [11,6 ; 51,8]) pour une température de test de 21°C. Dans nos conditions expérimentales, le stade embryonnaire semble donc relativement vulnérable chez *B. sowerbyi*.

Survie des juvéniles et des adultes

Le stade juvénile dure en moyenne 42 +/- 7 jours. Nous supposons que la survie diminue linéairement en fonction de l'âge chez les juvéniles (Fig. 48). Le nombre de survivants en fonction de l'âge peuvent être prédit grâce à l'équation suivante :

$$S_j(t) = S_0 \times (1 - k)^t \quad (8)$$

avec :

- $S_j(t)$ le nombre moyen de survivants d'âge t ;
- S_0 le nombre d'individus en début d'essai ;
- k le taux de mortalité journalière chez les juvéniles ($k = 0,0035$ individu/jour d'après nos expériences).

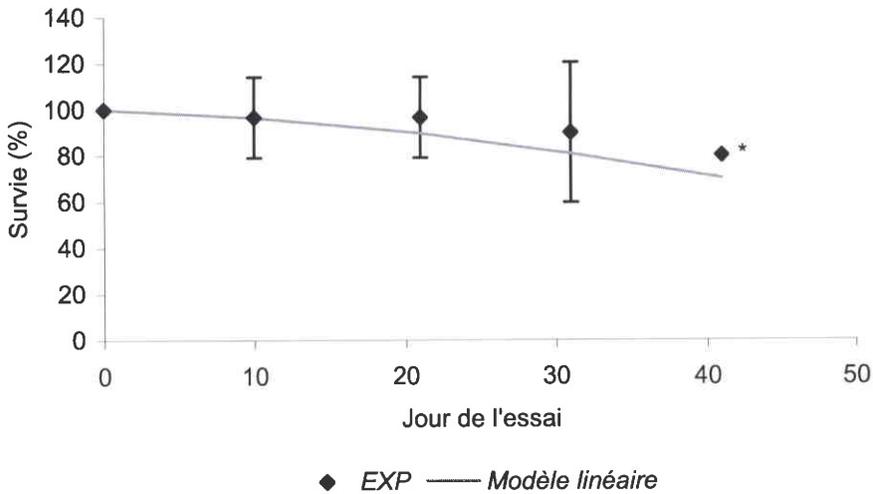


Figure 48. Evolution du taux de survie moyen (et IC 95%) chez les juvéniles de *Branchiura sowerbyi* nourris ad libitum : comparaison entre les prédictions de notre modèle de survie (ligne) et les données (points). Les différences significatives entre les données et les prédictions sont signalées par un astérisque

Une estimation fournie par le modèle (sur 5 estimations réalisées) est significativement différente du nombre de survivants observés : selon ce modèle, le taux de survie prédit à la fin du stade juvénile (42^{ème} jour de notre test) vaut 70%, contre 80% dans tous les réplicats de notre expérience. Cette erreur est du même ordre de grandeur que l'erreur expérimentale commise lors de l'évaluation de la survie des organismes. D'après le test de Fisher, elle n'est pas significative ($p = 0,21$). Ce modèle prédit donc la survie des adultes de façon fiable.

Comme pour le gastéropode, le nombre d'adultes survivants au temps t suit une distribution de Weibull avec un paramètre de forme égal à 2 (Fig. 49):

$$S_a(t) = S_a(0) \times e^{[-\psi \times (t-t_p)^2]} \quad (9)$$

avec :

- $S_a(t)$ le nombre moyen d'adultes survivants à l'âge t ;
- $S_a(0)$ le nombre d'organismes ayant survécu au stade juvénile ;
- t_p l'âge à la première reproduction, qui marque le début du stade adulte ($t_p = 60$ jours chez les organismes nourris *ad libitum*) ;
- ψ une constante qui représente l'accélération de la mortalité liée au vieillissement. D'après nos expériences, $\psi = 0,00004$ chez les adultes.

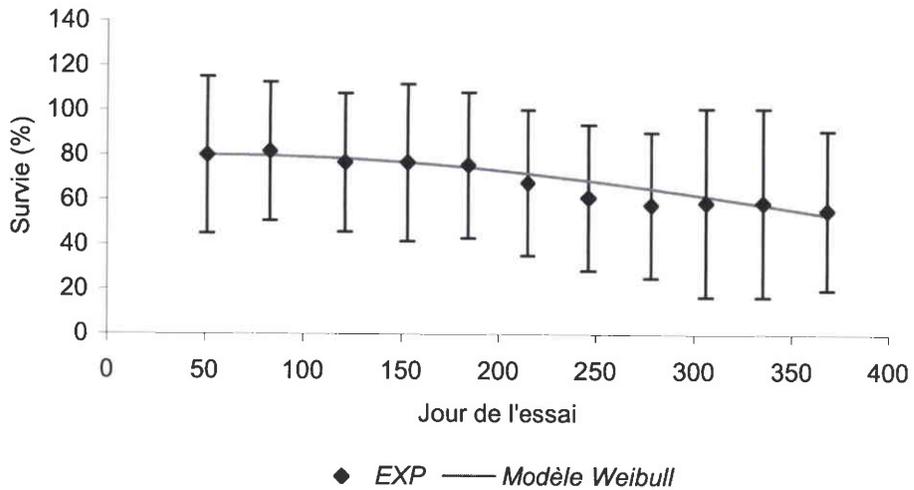


Figure 49. Evolution du taux de survie moyen (et IC 95%) chez les adultes de *Branchiura sowerbyi* nourris ad libitum : comparaison entre les survies prédites par le modèle de Weibull (ligne) et les données (points)

Le nombre de survivants prédits par le modèle de Weibull n'est pas significativement différent des données (test de Fisher, $p = 0,39$). Ce modèle prédit donc la survie des organismes de façon fiable. D'après ce modèle, 50% des organismes meurent avant 614 jours. Ces résultats confirment ceux d'Aston (1968), qui a observé que 40 % des organismes survivent plus de 18 mois au laboratoire. La durée maximale du cycle (âge correspondant à un taux de survie de 1%) est de 1097 jours, soit environ 3 ans. Bien que cette valeur paraisse élevée, certains Tubificidae peuvent survivre jusqu'à 4 ans dans un environnement favorable (Poddubnaya, 1980).

3.3.4. Caractérisation et modélisation de la croissance

Evaluation expérimentale de la croissance : résultats & discussion

Le test de croissance est démarré avec des nouveau-nés de poids moyen 0,53 mg (IC 95% : [0,28 ; 0,79]). Ces organismes ont été nourris *ad libitum* pendant 392 jours. Leur courbe de croissance est présentée par la figure 50.

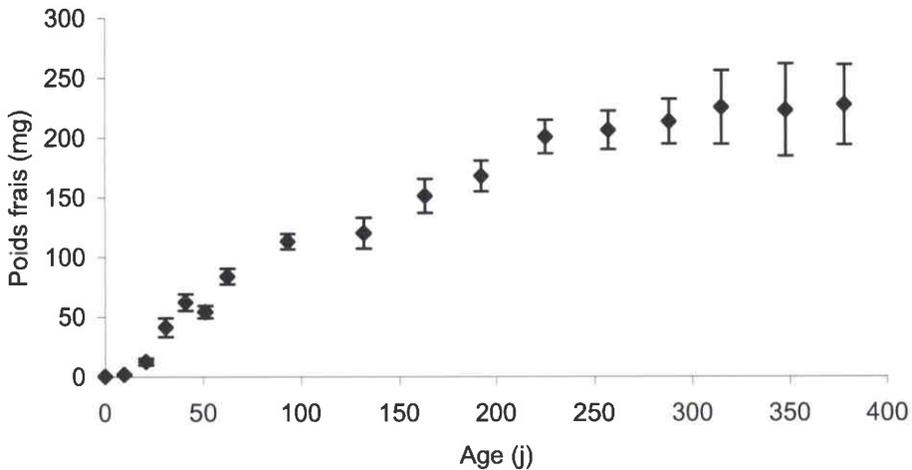


Figure 50. Evolution du poids frais moyen de *Branchiura sowerbyi* (et IC 95%) en fonction de l'âge des organismes nourris ad libitum

Nous distinguons trois phases distinctes sur cette courbe de croissance. Les juvéniles grandissent rapidement : leur taux de croissance a été estimé à 1,56 mg/jour. Le début de la reproduction coïncide avec une nette diminution de cette vitesse de croissance. Le taux de croissance des adultes d'âge inférieur ou égal à 288 jours est estimé à 0,65 mg/jour, soit environ 2 fois moins que chez les juvéniles. Ces adultes atteignent leur poids asymptotique (plateau de la courbe de croissance) à l'âge de 315 jours. Leur poids moyen vaut alors 227,4 mg (IC 95% : [194,0 ; 260,8]).

Le taux de croissance journalier est négatif entre les jours 41 (dernière mesure avant la reproduction) et 51 (première mesure pendant la reproduction). Ceci indique que nos organismes « maigrissent ». Cet amaigrissement consécutif à la ponte a aussi été observé par Marchese et Brinkhurst (1996) et Casellato (1984). Ces résultats indiquent que les œufs représentent une part de la biomasse corporelle de l'individu gravide. La perte de poids moyenne dans notre test est de l'ordre de 8 mg, ce qui représente 13 % de la masse corporelle moyenne des individus avant la ponte. Cette perte de poids n'est pas significative. Par ailleurs, elle n'est observée que lors de la première reproduction ; elle est prise en compte dans la mesure du poids moyen des individus pour les reproductions suivantes, puisque les organismes pondent de façon décalée dans le temps. Nous pouvons donc considérer que la perte de poids liée à la ponte ne joue pas un rôle important dans l'évolution du poids des organismes au cours de leur croissance.

Hypothèses biologiques concernant la croissance

La littérature fournit des informations contradictoires quant aux relations entre la taille et le poids des organismes. A partir d'un suivi du poids frais en laboratoire (21 °C, 84 jours), Aston, (1968) a montré que la courbe de croissance des organismes peut être décrite selon le modèle de croissance théorique de Von Bertalanffy. Ceci suppose que *B. sowerbyi* grandit de façon isomorphe. A partir de mesures effectuées sur des organismes tués au formol, Yanling (1984) infirme cette hypothèse. D'après notre propre expérience, l'immobilisation des oligochètes par une solution de formol dilué à 10 % provoque une déformation du corps, si bien que nous doutons de la pertinence des mesures de tailles proposées par Yanling (1984). Nous nous rangeons donc à l'avis d'Aston (1968) et supposons que la croissance de notre oligochète est de type isomorphe.

Les organismes grandissent durant toute leur vie. Nous supposons donc, conformément aux hypothèses de la théorie DEB (Kooijman, 2000), que l'énergie acquise tout au long de la vie de l'organisme se partage entre :

- la croissance ;
- la maintenance des tissus et de l'activité de l'organisme (respiration, déplacements, etc.) ;
- les événements liés à la reproduction : mise en place et maintenance des organes reproducteurs, acquisition des réserves pour la première reproduction chez les juvéniles, fabrication des œufs chez le adultes.

Nous supposons par ailleurs que les coûts de maintenance ne sont pas négligeables chez *B. sowerbyi*, puisque l'appareil génital régresse partiellement entre deux reproductions successives (Casellato *et al.*, 1987) et que la partie postérieure de l'organisme se régénère potentiellement plusieurs fois au cours de sa vie.

Des hypothèses biologiques au modèle de croissance

En suivant la même démonstration que pour *V. piscinalis* (voir paragraphe 3.2.4.), nous pouvons montrer que, pour une température et un apport alimentaire constant, l'évolution de la taille $l(t)$ de *B. sowerbyi* en fonction son âge (t) peut être décrite grâce au modèle de Von Bertalanffy :

$$l(t) = l_{\infty} \left[1 - e^{-\gamma(t-t_0)} \right] \quad (15)$$

avec :

- l_{∞} la taille asymptotique ;
- l_b la taille de l'organisme à la naissance ;
- γ le taux de croissance journalier ;
- t_0 une constante correspondant au temps théorique où les organismes mesureraient 0 mm s'ils grandissent selon cette équation.

L'équation 15 nous permet de prédire la taille moyenne des organismes en fonction de leur âge. Or, dans nos expériences, nous ne mesurons pas la taille mais le poids des organismes. Nous cherchons donc à transformer l'équation 15 de telle sorte que l'équation obtenue permette de prédire le poids des organismes plutôt que leur taille en fonction de l'âge. Chez les organismes isomorphes, le poids des organismes est proportionnel au cube de leur longueur. La constante d'isomorphie (i) rend compte de cette proportionnalité :

$$i = \frac{w(t)}{l(t)^3} \quad (11)$$

D'après les équations 11 et 15, le poids $w(t)$ d'un organisme isomorphe soumis à une température et à un apport alimentaire constant, s'écrit en fonction de son âge t :

$$w(t) = w_{\infty} \left[1 - e^{-\gamma(t-t_0)} \right]^3 \quad (19)$$

avec w_{∞} le poids asymptotique des organismes.

Nous utiliserons l'équation 19 afin de comparer les prédictions du modèle de croissance de Von Bertalanffy aux données de nos tests.

Paramétrage du modèle de croissance

L'ajustement de la courbe de croissance de Von Bertalanffy à nos données permet d'obtenir l'estimation du taux de croissance journalier γ et du paramètre d'initialisation t_0 .

Pour $w_\infty = 227,4$ (valeur mesurée dans notre test), nous obtenons $\gamma = 0,0128$ et $t_0 = -1,946$. Nous remarquons sur la figure 51 que le modèle est biaisé : il sous-estime toutes les mesures de poids pour les organismes âgés de 21 à 93 jours, mais décrit bien les données obtenues pour les organismes âgés de 132 jours ou plus.

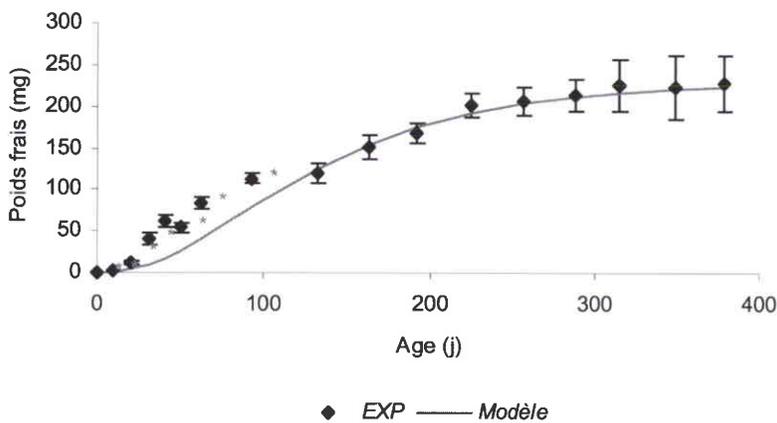


Figure 51. Evolution de la taille moyenne (et $IC_{95\%}$) de *Branchiura sowerbyi* et ajustements de la courbe de croissance de Von Bertalanffy : comparaison entre les prédictions du modèle (ligne) et les données (points). Les différences significatives entre les prédictions et les données sont signalées par un astérisque.

Ce résultat indique :

- soit que les paramètres obtenus à partir de nos données ne permettent pas décrire la croissance des juvéniles de façon fiable ;
- soit que les hypothèses du modèle ne sont pas respectées chez les juvéniles.

Afin de vérifier que les hypothèses du modèle sont effectivement vérifiées chez les juvéniles, nous avons re-paramétré le modèle sur la base des données obtenues entre 0 et 93 jours. Pour $w_\infty = 120,2$ (valeur mesurée dans notre test au 93^{ème} jour), nous obtenons $\gamma = 0,0395$ et $t_0 = -2,146$. L'ajustement du modèle ainsi paramétré aux données de croissance est relativement satisfaisant (Fig. 52).

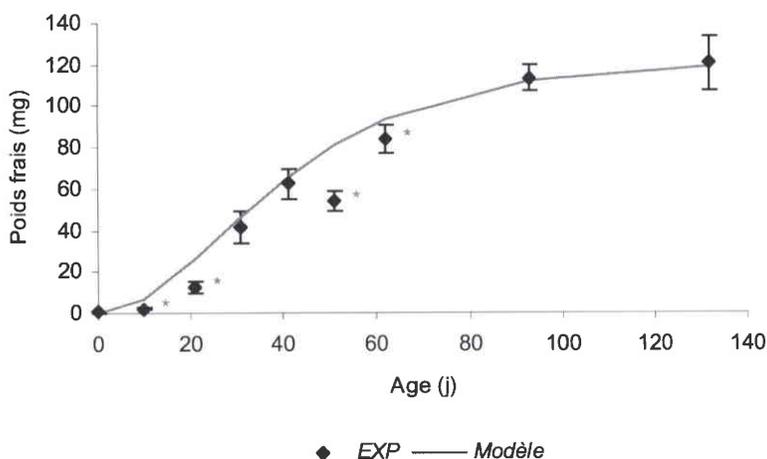


Figure 52. Evolution de la taille moyenne (et IC 95%) des organismes âgés de moins de 132 jours et ajustements de la courbe de croissance de Von Bertalanffy : comparaison entre les prédictions du modèle (ligne) et les données (points). Les différences significatives entre les prédictions et les données sont signalées par un astérisque.

D'après ces résultats, l'équation proposée ne nous permet de décrire la croissance des juvéniles d'une part, et des adultes d'autre part de façon relativement fiable. Afin de décrire la courbe de croissance en entier, il faut modifier les paramètres du modèle au 132^{ème} jour. Ceci signifie que l'une des hypothèses du modèle n'est pas vérifiée tout au long de notre test. En effet, nous n'avons pas respecté l'hypothèse d'un apport alimentaire constant. Nous avons utilisé des sédiments prélevés au printemps (période hautes eaux sur le site de prélèvement) puis des sédiments prélevés en été (période de basses eaux). Le changement de type de sédiment utilisé pour les essais a été réalisé au 132^{ème} jour du test. La saisonnalité influençant la qualité nutritive du sédiment, la quantité de nourriture disponible depuis le sédiment pour notre organisme a donc été modifiée au cours du test. Sachant que *B. sowerbyi* puise environ 1/3 de son énergie à partir du sédiment, la variation de la qualité du sédiment a induit une accélération significative de la croissance dès le 132^{ème} jour. Ce biais expérimental explique pourquoi les paramètres obtenus à partir de la totalité du jeu de données ne permettent pas de décrire l'ensemble de la courbe.

Kooijman (2000) a montré qu'il est possible de prendre en compte un changement de disponibilité de la ressource alimentaire lors de l'étude de la courbe de croissance d'organismes isomorphes, lorsque ce changement ne survient qu'une seule fois au cours de l'expérience. Les organismes s'adaptent à leur nouveau régime alimentaire, sans changer leur mode de gestion de l'énergie. Ceci se traduit par une modification du poids asymptotique de l'organisme. Cette modification est prise en compte en remplaçant la valeur des paramètres γ

et t_0 estimées dans la situation de faible densité de nourriture ($\gamma = 0,0395$ et $t_0 = -2,146$) par leurs valeurs estimées dans la situation de forte densité de nourriture ($\gamma = 0,0128$ et $t_0 = -1,946$) au 132^{ème} jour du test. La figure 53 présente les résultats obtenus en utilisant cette méthode.

Le modèle est incapable de prédire la diminution du poids observé après la première ponte des organismes puisque la valeur du taux d'accroissement journalier est toujours positive (voir hypothèses principales de la théorie DEB, sous chapitre 2).

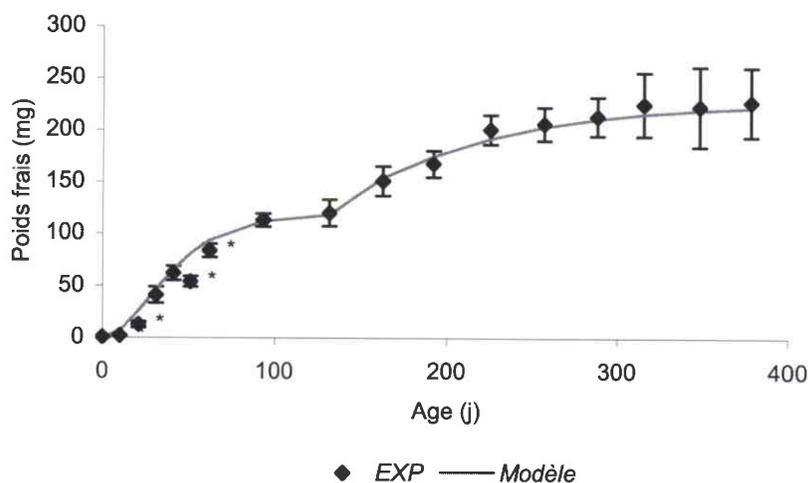


Figure 53. Evolution de la taille moyenne (et IC_{95%}) de Branchiura sowerbyi et ajustements de la courbe de croissance de Von Bertalanffy (modèle avec changement de densité de nourriture, Kooijman, 2000) : comparaison entre les prédictions du modèle (ligne) et les données (points). Les différences significatives entre les prédictions et les données sont signalées par un astérisque.

Par ailleurs, le modèle surestime la vitesse de croissance des organismes durant leurs premiers mois de vie. Cette erreur est sans conséquence sur la fiabilité de l'estimation de l'âge à la puberté, qui est le paramètre essentiel lors de la modélisation de la dynamique de la population (voir chapitre V). Seules 4 estimations sur les 17 estimations réalisées sont significativement différentes des données : ceci représente une fréquence d'erreur de 23 %. La racine de la somme des carrés des écarts entre les données et les prédictions du modèle est faible : elle correspond à une erreur de 36 mg sur 30 organismes mesurés pendant 378 jours. Le test de Fisher nous indique que la somme des carrés des écarts entre les données et le modèle est suffisamment faible pour pouvoir accepter ce modèle ($p = 0,40$). Ainsi, le modèle proposé permet de décrire la croissance de *B. sowerbyi* de façon relativement fiable.

D'après les résultats ci-dessus, la valeur des paramètres γ et t_0 dépendent de la qualité du sédiment utilisé pour les tests. Sur notre site de prélèvement de sédiment, nous distinguons clairement la période d'étiage (mai à octobre) de la période de hautes eaux (novembre à avril). Sous l'hypothèse que la qualité des sédiments varie de façon saisonnière, nous pouvons tester la validité de notre modèle en comparant ses prédictions pour une saison donnée à un jeu de donnée obtenu pour la même saison.

Le sédiment utilisé pour les tests de toxicité sur la croissance à été prélevé en novembre, hors période d'étiage. Nous pouvons donc comparer les prédictions du modèle paramétré avec les valeur de γ et t_0 estimées hors étiage ($\gamma = 0,0395$ et $t_0 = -2,146$) aux données de croissance des témoins du test de toxicité (Fig. 54).

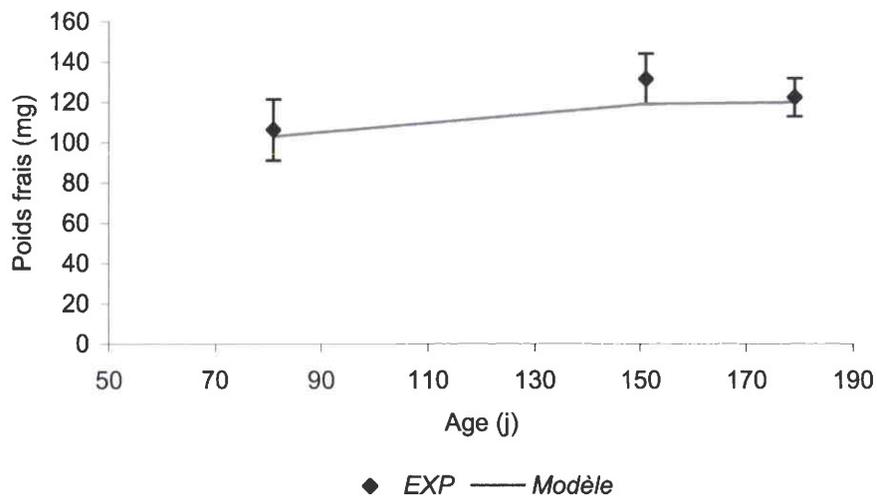


Figure 54. Taille moyenne (et IC 95%) des organismes témoins de l'essai reproduction sur sédiment contaminé et comparaison avec les prévisions du modèle de croissance paramétré en saison hors étiage.

Les prédictions du modèle ne diffèrent pas significativement des données témoins du test de reproduction. D'après ces résultats, nous admettons donc que le modèle de Von Bertalanffy permet de décrire de façon satisfaisante la croissance de *B. sowerbyi*. Ceci confirme les résultats publiés par Aston *et al.* (1982).

3.3.5. Caractérisation et modélisation de la reproduction

Evaluation expérimentale de la reproduction : résultats & discussion

L'âge moyen des organismes à la première reproduction est de 60 jours (IC_{95%} : [57 ; 62]). Ils pèsent alors 84,1 mg en moyenne (IC_{95%} : [77,5 ; 90,6]). Leur rythme reproduction a été suivi pendant 392 jours (Fig. 55).

Les organismes se sont reproduits 2 fois en 378 jours. Les pics de ponte se situent aux 71^{ème} et 212^{ème} jours du test. Tous les organismes de la population sont alors gravides. L'appareil génital régresse partiellement entre les reproductions : le clitellum (partie richement vascularisée correspondant à la position des organes génitaux) disparaît pour la plupart des individus âgés de 103 à 182 jours. Ce résultat confirme les observations histologiques réalisées par Casellato *et al.* (1987) sur des organismes prélevés sur le terrain. Cette caractéristique est commune chez les Tubificidae (Tachet *et al.*, 2000). La destruction de l'appareil génital se fait par digestion enzymatique : l'énergie ainsi dégagée est de nouveau disponible pour la construction de biomasse ou l'acquisition de réserves (Lafont, 1989).

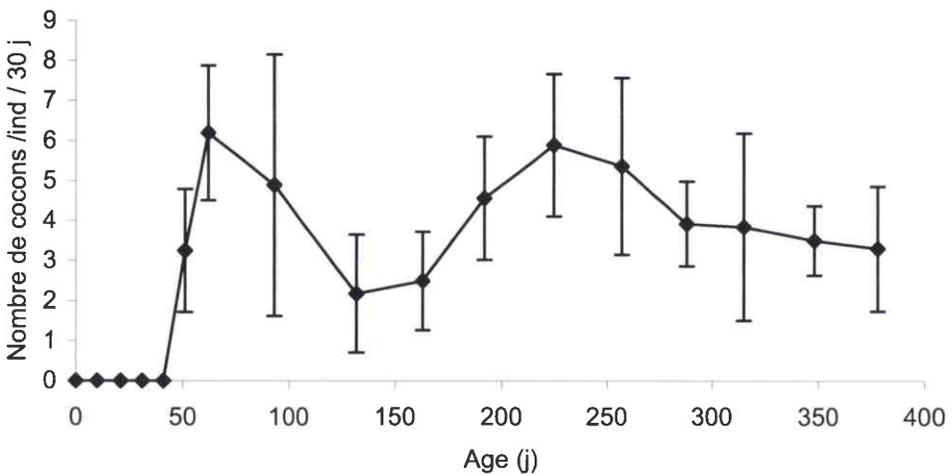


Figure 55. Fécondité individuelle moyenne chez *Branchiura sowerbyi* (et IC_{95%}).

La seconde période de ponte est environ deux fois plus longue que la première (respectivement 214 jours contre 91 jours). Nous avons récolté deux fois plus d'œufs durant le second cycle de ponte que durant le premier (respectivement 32,9 contre 16,5

cocons/individu/30 jours en moyenne). Le nombre d'œufs par cocon est constant au cours du test : il est estimé à 2,2 (IC_{95%} : [1,8 ; 2,6]). Ceci implique :

- que les organismes ne sont pas synchrones pour le début de la seconde reproduction ;
- que le nombre d'œufs produits par cycle de ponte est constant.

La fécondité moyenne ne dépend donc ni de l'âge ni du poids des organismes. Le nombre de cocons pondus par individu par jour est estimé à 0,170 +/- 0,002. Une valeur identique a été obtenue par Aston *et al.* (1968) à 25°C pour des individus non nourris.

Les paramètres de fécondité sont très variables d'une étude à l'autre. En effet, le nombre moyen d'œufs par cocon est estimé à 1,7 par Casellato *et al.* (1992) contre 3,1 par Aston *et al.* (1968) et 2,2 dans notre étude. Pour récolter 6 cocons par individu, il faut 5 semaines selon Marchese et Brinkhurst (1996) contre 14 jours selon Aston (1968) et 30 jours dans notre étude. Ces différences sont principalement liées à la température du test et à la qualité nutritive du substrat.

Par ailleurs, d'autres expériences réalisées à partir d'organismes prélevés sur le terrain et acclimatés au laboratoire (dans des conditions expérimentales similaires à celles du test) ont montré que les reproductions successives sont synchrones et qu'elles sont espacées de 30 à 40 jours. Ces observations sont confirmées par Casellato *et al.*, (1992). Le comportement reproducteur d'oligochètes nés au laboratoire est donc différent de celui des organismes prélevés *in situ*.

En conclusion, les organismes âgés de 388 jours ont produit en moyenne 110 œufs pour deux cycles de ponte. Nous ignorons le nombre de pontes possibles au cours d'un cycle de vie dans nos conditions expérimentales. En réalisant le suivi de la population d'élevage, nous avons mis en évidence que les organismes prélevés sur le terrain et acclimatés au laboratoire sont capables de se reproduire au moins quatre fois.

La réalisation d'un test recouvrant entièrement le cycle de vie de l'organisme permettrait de savoir s'il est capable de se reproduire jusqu'à sa mort. Cependant, l'espérance de vie de l'oligochète est si longue qu'il est impossible, pour des raisons pratiques, de réaliser un tel test. Par ailleurs, la littérature ne nous fournit aucune information à ce sujet.

Hypothèses biologiques concernant la reproduction

Les organes de reproduction sont observables dès la fin du stade juvénile. La première reproduction survient lorsque les organismes ont atteint un poids minimal de 84,1 mg en moyenne (IC_{95%} : [57 ; 62]). Ceci implique que :

l'investissement énergétique pour la reproduction commence dès le stade juvénile ;

l'organisme pubère ne se reproduit que lorsqu'il possède suffisamment de réserves énergétiques pour fabriquer des œufs.

Le stockage d'énergie pour la reproduction implique l'existence d'un compartiment de stockage. Nous supposons que, comme chez les autres Tubificidae, les réserves énergétiques sont principalement stockées dans l'hépatopancréas (Lafont, 1989), et que la ponte est déclenchée par un stimulus chimique lorsque la quantité de réserves stockées dans l'hépatopancréas dépasse un certain seuil. De même, nous supposons que la régression des organes génitaux est déclenchée lorsque le compartiment de réserves est « vide ».

Comme chez *V. piscinalis*, la reproduction correspond à une série de pontes. Le nombre d'œufs par cocon étant constant au cours de la vie de l'organisme, un cocon représente toujours la même quantité d'énergie. Le nombre de cocons pondus par reproduction correspond donc au rapport entre l'énergie stockée dans les réserves et la quantité de réserves nécessaire pour réaliser la mise en places des tissus reproducteurs, la gamétogenèse, la fabrication des œufs et du cocon vitellin.

Des hypothèses biologiques au modèle

Nous avons vu que l'organisme ne cesse de grandir au cours de sa vie, et que l'appareil sexuel régresse après chaque reproduction. L'état adulte tel que nous l'avons défini (*i.e.* organisme capable de se reproduire) est donc « transitoire » chez *B. sowerbyi*. Nos données ne permettent pas de mettre clairement en évidence la durée d'un événement de reproduction. Dès lors, il est impossible de prendre en compte le caractère transitoire de l'état adulte dans nos modèles de reproduction.

La régression de l'appareil sexuel après la reproduction explique probablement pourquoi, contrairement à de nombreuses espèces aquatiques, la fécondité des organismes est indépendante de leur âge et de leur poids. Les modèles de reproduction basés sur ces deux critères sont donc inutilisables pour *B. sowerbyi*.

Par ailleurs, chez *B. sowerbyi*, la destruction de l'appareil génital par voie enzymatique libère de l'énergie qui peut être ajoutée aux réserves de l'organisme, et donc utilisée à nouveau pour la croissance et la reconstruction des organes génitaux. La théorie DEB suppose que l'énergie investie dans la fabrication de biomasse n'est pas re-mobilisable. Les modèles issus de cette théorie ne sont donc pas adaptés pour décrire la gestion de l'énergie destinée à la reproduction chez *B. sowerbyi*.

Pour les raisons évoquées ci dessus, la reproduction de *B. sowerbyi* ne peut pas être décrite grâce à une approche mécanistique. Nous utiliserons donc une approche descriptive classique pour l'analyse de nos données de fécondité. La fécondité cumulée peut être décrite de façon fiable par un modèle linéaire (Fig. 56).

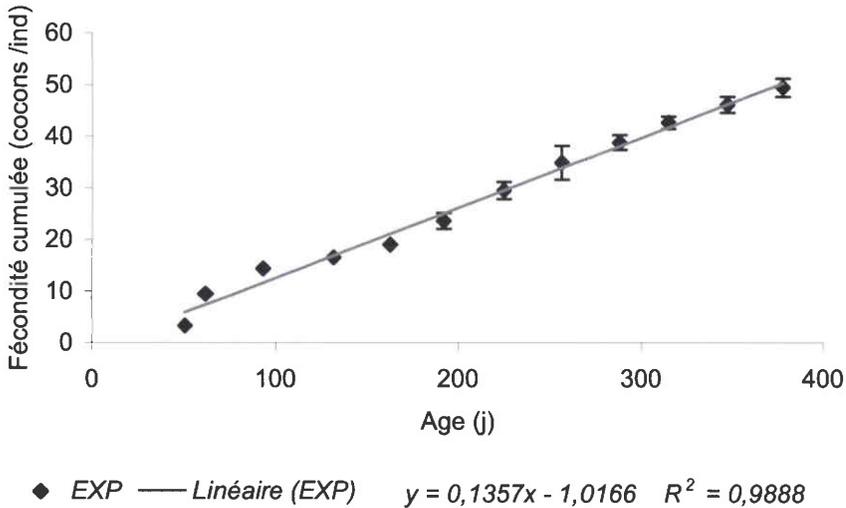


Figure 56. Evolution de la fécondité cumulée (et IC_{95%}) chez *Branchiura sowerbyi*

D'après ces résultats, la fécondité cumulée d'un individu adulte (N_c) s'écrit en fonction de son âge (t) selon la relation suivante :

$$N_c = 0,14 \times t - 1,02 \quad (20)$$

Cette équation ne permet ne peut pas être validée avec les données dont nous disposons. En effet :

- l'écart type autour des fécondités moyennes instantanées chez les témoins de l'essai de reproduction augmente avec l'âge des organismes. Il varie de 34 à 46 % de la valeur de la fécondité moyenne relevée à cette date.
- la racine de la somme des carrés des écarts entre ces données et les valeurs prédites grâce à l'équation 16 correspond à une erreur de 13 cocons pour 32 cocons étudiés, soit une erreur de 41%.

D'après ces résultats, l'erreur commise en évaluant la fécondité des organismes à partir de l'équation 16 est du même ordre de grandeur que la variabilité naturelle de la fécondité moyenne. Des tests de reproduction supplémentaires sont nécessaires afin de mieux caractériser l'erreur commise en utilisant cette équation.

3.3.6. Paramètre du cycle de vie de *Branchiura sowerbyi* dans nos conditions expérimentales : bilan

Le tableau XV présente une synthèse de la valeur des paramètres du cycle de vie de *B. sowerbyi* en conditions de laboratoire.

Tableau XV. Synthèse des paramètres du cycle de vie de *Branchiura sowerbyi* dans nos conditions expérimentales (21°C, nourriture ad libitum, autres conditions précisées au sous- chapitre 2)

<i>Stade de développement</i>	<i>Paramètre d'histoire de vie</i>	<i>Valeur en laboratoire (IC_{95%})</i>
Embryons	Taille des cocons	2,8 mm [2,7 ; 2,9]
	Durée moyenne de maturation des capsules	17 j +/-7
	Taux de survie embryonnaire	31,7 % [11,6 ; 58,1]
Nouveau-nés	Durée du stade	9 j
	Poids frais moyen en début de stade	0,5 mg [0,3 ; 0,8]
	Taux de survie	100%
	Apport de nourriture <i>ad libitum</i> ¹	1,6 mg de Tétramin®/ind./j ouvré
	Taux de croissance journalier moyen	0,5 mg/j
Juvéniles	Durée du stade	47 j
	Poids frais moyen en début de stade	5 mg ²
	Taux de survie	80%
	Apport de nourriture <i>ad libitum</i> ¹	1,6 mg de Tétramin®/ind./j ouvré
	Taux de croissance journalier moyen	1,6 mg/j
Adultes	Age moyen à la puberté	58 j
	Poids frais moyen à la puberté	84,1 mg [77,5 ; 90,6]
	Taux de survie (modélisé)	50% à 614 j
	Apport de nourriture <i>ad libitum</i> ¹	3,2 mg de Tétramin®/ind./j ouvré
	Taux de croissance journalier moyen	0,7 mg/j
	Poids maximal moyen à 378 jours	227,4 mg [194,0 ; 260,8]
	Nombre de reproductions/ind.	≥ 4
	Nombre moyen d'œufs par cocon	2,2 [1,8 ; 2,6]
	Fécondité moyenne à 378 j	141,4 œufs
	Nombre de cohortes/an	≥ 2
	Durée maximale du cycle de vie (modélisée)	1097 j

¹ Le sédiment naturel constitue un apport alimentaire équivalent à 1.8 mg de Tétramin®/ind./j ouvré .

² Aston *et al.*, 1982

3.4. SYNTHÈSE COMPARATIVE DES PARAMÈTRES VITAUX DE NOS TROIS ORGANISMES

Dans ce paragraphe, nous proposons une comparaison des valeurs des taux vitaux mesurés en laboratoire pour nos trois espèces (tableau XVI).

Tableau XVI. Comparaison des taux vitaux mesurés au laboratoire en conditions témoins (21°C, nourriture ad libitum) pour *C. riparius*, *V. piscinalis* et *B. sowerbyi*.

	<i>C. riparius</i>	<i>V. piscinalis</i>	<i>B. sowerbyi</i>
Durée maximale du cycle de vie (j)	20	673	1155
Apport alimentaire <i>ad libitum</i> (mg Tétramin®/ind./j)	0,6	0,8	3,2
Apport alimentaire provenant du sédiment (en équivalent mg Tétramin®/ind./j ¹)	≈0	0,1	1,8
Taux de croissance journalier moyen ² des juvéniles (mm/j)	1,25 mm/j	0,051 mm/j	1,0 mg/j
Taux de croissance journalier moyen des adultes	0 mm/j	0,005 mm/j	0,9 mg/j
Taux de survie embryonnaire (%)	50	94	32
Taux de survie juvénile (%)	80	84	80
Taux de survie des adultes (ind./j)	0,69	0,999	0,996
Age de 1ère reproduction/durée maximale du cycle de vie ³	0,83	0,08	0,05
Nombre de reproduction au cours du cycle de vie	1	≥ 4	≥ 3
Nombre d'œufs par masse	495 [443,9 ; 546,7]	13,2 [12,3 ; 14,1]	2,2 [1,8 ; 2,6]
Fécondité individuelle moyenne (œufs/ind./cycle de ponte)	495 [443,9 ; 546,7]	121 [89,8 ; 151,5]	54,5 [51,8 ; 58,2]

¹ en conditions *ad libitum*

² moyenne des taux de croissance journaliers aux stades nouveau-né et juvénile.

³ plus cette valeur est faible, plus la puberté survient de façon précoce dans le cycle de vie.

Les durées de vie en laboratoire sont très différentes pour nos trois espèces : de 20 jours chez le chironome à plus de 3 ans chez l'oligochète. Le stade juvénile représente 83 % de la durée de vie du chironome, tandis qu'il ne représente que 8 % et 5 % de la durée de vie de *V. piscinalis* et de *B. sowerbyi*.

Nos trois espèces présentent des courbes de survie bien différenciés : les stades embryonnaire et juvénile sont très résistants chez le gastéropode par rapport aux deux autres espèces étudiées. Le stade adulte est plus résistant chez le gastéropode et l'oligochète que chez le chironome. Parmi nos trois espèces, c'est donc le gastéropode qui survit le mieux dans nos conditions expérimentales.

Par ailleurs, nos trois espèces présentent des courbes de croissance différentes :

- le chironome présente une croissance finie (ce qui implique l'existence d'une taille maximale), tandis que l'oligochète et le gastéropode grandissent jusqu'à leur mort ;
- du fait des mues successives, la taille dépend de l'âge de façon linéaire chez les larves de chironome. Chez le gastéropode et l'oligochète, qui présentent un développement direct, la taille dépend de l'âge selon une fonction de type $1 - e^{-x}$ (courbe de croissance de Von Bertalanffy) ;
- le taux de croissance journalier augmente avec l'âge des larves de chironomes, tandis qu'il diminue avec l'âge chez l'oligochète et le gastéropode. Cette diminution est beaucoup plus marquée chez le gastéropode que chez l'oligochète : les adultes de *V. piscinalis* grandissent 10 fois moins vite que les juvéniles.

En terme de croissance c'est donc *B. sowerbyi* qui grandit le mieux dans nos conditions expérimentales : en effet, son taux de croissance journalier est très élevé au stade juvénile, et diminue peu au stade adulte. Un individu en fin de vie représente donc une biomasse considérable (à 378 jours, certains individus atteignent le poids moyen de 250 mg : ceci équivaut au poids de 10 gastéropodes adultes ou de 30 larves de chironomes ayant atteint leur taille maximale). Cependant, cette croissance coûte cher à l'organisme : l'oligochète se nourrit environ 8 fois plus que la larve de chironome et 6 fois plus que le gastéropode. Il est donc beaucoup plus exposé à l'absorption de toxique par la voie alimentaire que les deux autres espèces.

En dernier lieu, nos trois espèces présentent de modes de reproduction différents :

- la puberté survient de façon tardive chez le chironome, tandis qu'elle survient de façon précoce chez *V. piscinalis* et *B. sowerbyi* ;
- la reproduction du chironome consiste en une seule ponte qui comporte un nombre élevé d'œufs. Chez le gastéropode et l'oligochète, la reproduction consiste en une

succession de pontes au cours de la vie adulte, chaque ponte comportant relativement peu d'œufs.

Ces résultats nous permettent de caractériser grossièrement le cycle de vie des organismes. Chez *B. sowerbyi* et *V. piscinalis*, la durée de vie est longue, la croissance est continue tout au long de la vie et l'organisme se reproduit plusieurs fois au cours de sa vie. Chez le chironome au contraire, la durée de vie est courte, la croissance est finie et la reproduction est unique. Par ailleurs, les populations de chironome présentent un taux de croissance journalier élevé et des capacités de dispersion active : ceci souligne le caractère colonisateur de cet organisme.

Ces observations ont été mises en relation avec les principales caractéristiques qui définissent le deux grands types de stratégie d'histoire de vie en écologie d'après Southwood (1977) (tableau XVII).

Tableau XVII. Comparaison entre les traits d'histoire de vie de nos trois espèces et les caractéristiques des espèces de sélection *r* et *K* d'après Southwood (1977).

	<i>Espèces – r</i> « time efficient »	<i>Espèces –K</i> « food and space efficient »	<i>C.</i> <i>riparius</i>	<i>V.</i> <i>piscinalis</i>	<i>B.</i> <i>sowerbyi</i>
Temps de génération moyen	Court	Long	1 jour	41 jours	108 jours
Taille maximale	Faible	Elevée	10-15mm	5-10 mm	15-20 cm
Capacités de dispersion	Elevée Active	Faible Passive	Active	Passive	Passive
Taux de survie journalier adulte	Faible	Elevé	0,69	0,999	0,996
Fécondité moyenne (œufs/ind./ponte)	Elevée	Faible, avec soins parentaux éventuels	495	121	54,5

D'après ces observations, *V. piscinalis* et *B. sowerbyi* présentent une stratégie d'histoire de vie plutôt de type K, tandis que le chironome présente plutôt une stratégie de type r, caractéristique des espèces opportunistes.

4. CONCLUSIONS DU CHAPITRE III

- ❖ Nous disposons d'élevages pour les trois organismes étudiés. Ceci permet d'obtenir un matériel biologique de bonne qualité et suffisamment abondant pour réaliser les tests de toxicité.
- ❖ Le cycle de vie des organismes est étudié dans des conditions expérimentales similaires pour nos trois espèces.
- ❖ Des protocoles expérimentaux originaux ont été mis au point pour *V. piscinalis* et *B. sowerbyi*. Ces protocoles permettent de réaliser des tests recouvrant tous les stades de développement des organismes.
- ❖ Le cycle de vie des organismes au laboratoire est fortement modifié par rapport à leur cycle de vie sur le terrain, notamment pour le paramètre de reproduction chez *V. piscinalis* et *B. sowerbyi* (fécondité, nombre et cyclicité des reproductions).
- ❖ La relation avec le sédiment (en terme de ressource spatiale et nutritive) varie selon l'espèce considérée. En effet, tous les stades de développement se déroulent au contact du sédiment chez l'oligochète tandis que les stades précoces (œufs et nouveau-nés) se déroulent dans l'eau pour le chironome et *V. piscinalis*. Par ailleurs, le sédiment constitue une source d'alimentation secondaire dont l'importance en termes quantitatifs varie selon l'espèce étudiée : chaque espèce se caractérise donc par un régime alimentaire différent, même si l'aliment de base (Tétramin ®) est similaire pour toutes les espèces testées. C'est l'oligochète qui est l'espèce la plus inféodée au sédiment parmi les 3 espèces étudiées.
- ❖ Les caractéristiques du cycle de vie de *B. sowerbyi* (cycle de vie long, fécondité relativement faible par rapport aux autres espèces étudiées) s'oppose à celle du chironome (cycle de vie court, forte fécondité), dont le cycle de vie est typique d'un organisme colonisateur. *V. piscinalis* présente un cycle de vie dont les caractéristiques sont intermédiaires, avec un cycle de vie long, une survie et une fécondité élevée.

Ainsi, *B. sowerbyi* et *V. piscinalis* présentent une stratégie d'histoire de vie de type K, tandis que le chironome présente une stratégie de type r.

- ❖ La modélisation mécanistique est choisie comme outil d'aide à l'interprétation des résultats de test.
- ❖ Ces modèles sont basés sur la gestion de l'énergie par les organismes ; leurs hypothèses correspondent aux principes de la théorie DEB.
- ❖ Les modèles bioénergétiques mis au point afin d'analyser la croissance et la reproduction de nos trois espèces fournissent des résultats globalement satisfaisants. Toutefois, leur validation n'a été effectuée que sur les données provenant des témoins des expériences réalisées en présence de toxique. D'autres expériences seraient nécessaires afin de vérifier de façon plus pertinente la validité de ces modèles.

Liens avec les articles rédigés au cours de la thèse

Le lecteur trouvera une description détaillée des protocoles d'élevage et du cycle de vie de *V. piscinalis* dans l'article suivant : « Development of rearing and testing protocols for a new freshwater sediment test species : the Gastropod *Valvata piscinalis* » (Ducrot *et al.*, 2005).

CHAPITRE IV

EVALUATION DE LA TOXICITE AU NIVEAU DE L'INDIVIDU

Pour chacune des espèces étudiées, nous cherchons à évaluer l'effet d'un contaminant de référence, le zinc, sur les paramètres du cycle de vie impliqués dans la dynamique de population : survie et croissance aux différents stades de développement, et reproduction. Expérimentalement, ce travail implique l'exposition des organismes à un sédiment contaminé, et le suivi de la réponse biologique.

Dans ce chapitre, nous justifions tout d'abord le choix du zinc comme toxique de référence pour notre étude.

Nous présentons ensuite les méthodes de contamination des sédiments et rappelons le principe des tests de toxicité. La méthodologie générale de ces tests n'est que très peu abordée, puisqu'elle est similaire à celle utilisée pour les bioessais témoins (voir chapitre III). Nous présentons par ailleurs les modèles à fondement biologique utilisés afin de prédire les effets du contaminant au niveau des individus.

En dernier lieu, nous exposons les résultats des tests de toxicité réalisés pour chacune espèces étudiées. L'exploitation de ces résultats permet de répondre aux questions suivantes :

- Quels sont les effets du zinc sur les paramètres du cycle de vie des individus exposés ?
 - La gamme de concentrations en zinc provoquant des effets sur les individus est-elle similaire chez les trois espèces étudiées?
 - La gestion de l'énergie chez les organismes exposés est-elle modifiée de la même façon chez ces trois espèces ?

Les différents paramètres et équations utilisés sont recensés dans des tableaux récapitulatifs présentés en annexes 6 et 7.

1. TOXIQUE DE REFERENCE : LE ZINC

1.1. Critères de choix du toxique de référence

Nous avons vu au chapitre I que la sensibilité d'une espèce dépend :

- de sa physiologie, impliquée dans les processus de toxicité à l'échelle de la cellule ;
- de ses caractéristiques biologiques et écologiques, impliquées dans les processus de toxicité à l'échelle de l'individu et de la population.

Pour un produit donné, la plus grande part de la variabilité de sensibilité interspécifique provient des différences au niveau de la physiologie des organismes, en lien avec le mode d'action du toxique (Vaal *et al.*, 1997a). La variabilité résiduelle est liée aux différences biologiques et écologiques entre espèces. C'est cette variabilité résiduelle qui nous intéresse dans le cadre de notre travail. Afin de pouvoir l'étudier, il faut minimiser la part de variabilité due à la physiologie des organismes en utilisant un toxique dont le mode d'action chez les invertébrés aquatiques est le moins spécifique possible.

Les substances qui présentent le mode d'action le moins spécifique chez les invertébrés aquatiques sont les métaux essentiels, certains métaux lourds et les narcotiques non polaires : pour ces produits, la variabilité de sensibilité interspécifique est de l'ordre d'un facteur 10 (Vaal *et al.*, 1997a).

Pour des raisons de facilité de manipulation au laboratoire et de dosage dans les organismes, nous avons retenu un composé métallique. Parmi les métaux traces les plus fréquemment étudiés en écotoxicologie figurent le cuivre, le cadmium et le zinc. Le cadmium n'a pas été retenu du fait de sa toxicité potentielle pour l'homme et du manque de reproductibilité des essais réalisés avec ce composé (Environnement Canada, 1990). Le cuivre n'a pas été retenu du fait des problèmes de spéciation survenant lors de l'exposition des organismes, la variation de forme chimique de l'élément au cours de l'essai pouvant biaiser les résultats du test de toxicité (*loc.cit.*). Finalement, le zinc a été choisi aux vues des critères suivants (*loc.cit.*):

- facilité d'obtention à l'état pur ;
- stabilité en solution ;
- innocuité pour l'homme dans le cadre de l'utilisation en laboratoire.

Le zinc est apporté sous forme de sels hydratés ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, pureté chimique : 99,9%, Fluka chimie, GmbH, 9471 Buchs, CH ; Numéro CAS : 7446-20-0). Les sels hydratés sont préférés aux sels anhydres du fait de leur longue durée de conservation potentielle sous forme stable et de leur forte solubilité (Environnement Canada, 1990 ; Simpson *et al.*, 2004).

1.2. Mode d'action du zinc chez les invertébrés aquatiques

Puisque le mode d'action des produits chimiques détermine la plus grande part de la variabilité de sensibilité entre espèces (Vaal *et al.*, 1997), une étude bibliographique a été réalisée afin de comparer le mode d'action du zinc chez nos trois espèces tests.

Le zinc est un élément essentiel, impliqué dans la synthèse et le fonctionnement des enzymes, la synthèse des protéines et le métabolisme des carbohydrates : sa présence est nécessaire au développement des organismes (Doull *et al.*, 1980). Les organismes vivants possèdent donc des mécanismes d'absorption, de transport et d'élimination du zinc (Kranzberg et Stokes, 1989 ; Roesijadi, 1992 ; Hassler *et al.*, 2005).

Chez les invertébrés aquatiques, l'absorption du zinc n'est pas régulée. Ce métal est absorbé *via* l'activité respiratoire et alimentaire (Roesijadi, 1992). Il entre dans l'organisme par diffusion passive, à la faveur d'un gradient de concentration entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule (Simkiss et Taylor, 1995). La concentration intracellulaire est donc supposée proportionnelle à la concentration dans le milieu d'exposition. La diffusion se fait par l'intermédiaire de canaux ioniques hydrophiles qui constituent des pores dans la membrane. Plusieurs types de pores peuvent permettre le passage du zinc dans la cellule (*loc.cit.*).

- les pores non sélectifs, qui permettent de faire traverser la membrane à n'importe quel ion qui présente une taille inférieure au diamètre du pore ;
- les pores sélectifs, qui ne permettent le passage que d'un type défini d'ions, *e.g.* le calcium. En tant que cation divalent, le zinc se comporte comme un analogue du calcium et peut donc traverser la membrane *via* des canaux calciques (Markich et Jeffree, 1994).

La voie préférentielle de diffusion du zinc dans la cellule varie selon la voie d'absorption considérée : respiratoire ou alimentaire (Vercauteren et Blust, 1999).

Dans l'organisme, le zinc se retrouve dans les branchies, les muscles, les reins, mais surtout dans l'hépatopancréas (Al-Mohanna et Subrahmanyam, 2001). Une fraction du métal accumulé dans ces organes est stockée sous forme non toxique, tandis que la fraction restante reste disponible dans le cytoplasme des cellules (Rainbow, 2002).

Le stockage du zinc sous forme non toxique implique divers ligands intracellulaires. Le zinc peut être stocké dans des « granules », sécrétées naturellement par les cellules afin d'agglomérer les composés minéraux amorphes (Masala et O'Brien, 2002). Elles sont majoritairement composées de phosphates de calcium et de magnésium, mais peuvent aussi inclure des métaux traces. Cette forme de stockage a été observée dans les branchies, les reins et l'hépatopancréas. Les granules sont ensuite excrétées, permettant ainsi la détoxification des métaux lourds tels que le zinc (Hare, 1992). Ce mécanisme de détoxification est commun chez les invertébrés aquatiques (Masala *et al.*, 2002) : ces granules ont été observées chez de nombreuses espèces de mollusques (voir par exemple Pynnönen *et al.* (1987) chez la moule), ainsi que chez le chironome (Hare, 1992). La présence de ces granules n'a pas été étudiée chez les oligochètes.

Par ailleurs, le zinc peut être séquestré par des protéines de type métallothionéines. Une revue concernant la structure et le rôle de ces protéines a été proposée par Roesijadi (1992) et Nordberg (1998). Nous rappelons ici seulement quelques connaissances essentielles concernant ces molécules. Ces protéines de faible poids moléculaire sont caractérisées par un fort contenu en cystéine qui leur permettent de complexer les métaux. Elles sont impliquées dans le transport cellulaire et la régulation de la concentration interne des métaux essentiels, tels que le zinc et le cuivre. Elles interviennent aussi dans la détoxification des métaux non essentiels, en les séquestrant de façon irréversible. Une fois complexées à un ion métallique, la protéine est stockée dans les granules que nous avons évoquées précédemment, ou dégradée dans les lysosomes. Les métallothionéines sont présentes chez la plupart des espèces aquatiques. Leur présence a été observée :

- chez *C. riparius* (Yamamura *et al.*, 1983 ; Seidman *et al.*, 1986 ; Gillis *et al.*, 2002)
- chez des espèces voisines de *V. piscinalis*, notamment *Littorina littorea* (Bebianno et Langston, 1998) et *Thais haemastoma* (Rubio *et al.*, 1993)
- chez des espèces voisines de *B. sowerbyi*, notamment *Tubifex tubifex* (Sturmbauer *et al.*, 1999).

Elles sont principalement localisées dans les cellules de l'intestin, de l'hépatopancréas, des reins et des branchies. Ces protéines sont toujours présentes dans la cellule à un niveau de base suffisant pour assurer la régulation des métaux essentiels. Une augmentation de la concentration en métaux dans la cellule peut induire la synthèse de ces protéines détoxifiantes. Lorsque les populations sont exposées aux métaux de façon chronique, elles peuvent acquérir une tolérance adaptative à cette pollution (Barata *et al.*, 1998).

La toxicité du zinc est liée à la fraction métallique qui reste libre dans le cytosol. Les ions libres se lient sur les protéines cytosoliques de fort poids moléculaires ainsi que sur les organites (Roesijadi, 1992). Cette modification de structure des biomolécules perturbe ou empêche leur fonctionnement, ce qui se traduit par une perturbation du métabolisme cellulaire qui peut mener jusqu'à la nécrose.

D'après ces informations, nous supposons que le mode d'action sur les cellules est similaire chez nos trois espèces tests. En revanche, il existe probablement des différences (quantitatives et qualitatives) entre ces espèces concernant les modes d'absorption et d'élimination ou de neutralisation du zinc. Ces différences peuvent se traduire par des différences de capacité et de cinétique de bioaccumulation.

2. TECHNIQUE D'ANALYSE DES DONNEES : LA MODELISATION

Nous avons vu au chapitre I que l'utilisation des modèles à fondement biologique constitue la méthode la plus pertinente pour calculer des concentrations sans effets sur les organismes. Les modèles écotoxicologiques visent dans un premier temps à relier la concentration en toxique dans le milieu à sa concentration dans les tissus (concentration susceptible de générer un effet toxique). Cette première étape se réalise au moyen de modèles toxico-cinétiques basés sur la chimie et la biologie des organismes. La seconde étape vise à l'estimation des effets engendrés par la présence de toxique dans l'organisme. Cette étape nécessite des modèles d'effets biologiques, basés sur la physiologie.

Il existe plusieurs « familles » de modèles en écotoxicologie. Elles se différencient principalement par leurs hypothèses quant à la cinétique toxique, par la présence ou non d'hypothèses biologiques pour l'estimation des effets physiologiques du toxique et par le type de paramètre d'effet obtenu ($CE_{x\%}$, concentrations sans effet, etc.). Certains modèles sont basés sur l'hypothèse que les effets toxiques sont la résultante d'une perturbation de la gestion de l'énergie chez les organismes exposés par rapport aux témoins. Dans les paragraphes suivants, nous allons voir que cette approche bioénergétique est tout à fait pertinente pour prédire les effets toxiques observés au niveau des individus.

2.1. La clé d'interprétation des effets toxiques : l'énergie

Le principe de base en toxicologie est le suivant : les molécules toxiques entrent en interaction avec les molécules biologiques. Dès lors, les organismes exposés disposent de divers mécanismes de défense : évitement et / ou isolement, élimination active, neutralisation par complexation avec des protéines, excrétion et réparation des dommages provoqués par le toxique sur les protéines et l'ADN. Des études du métabolisme et de la production de biomasse chez les organismes exposés aux toxiques (résumées par Calow (1991)) ont mis en évidence que ces mécanismes de défense sont coûteux pour l'organisme en terme énergétique. Ces coûts de défense s'ajoutent aux coûts de maintenance : il existe donc une relation quantitative entre la capacité de défense de l'organisme (survie) et sa capacité de production de biomasse (croissance et reproduction). Dès lors, la modification de la gestion de l'énergie en présence de toxique constitue une base pertinente au développement de modèles

mécanistiques d'effets (Jager *et al.*, 2004). Chacun des modèles bioénergétiques évoqués au chapitre III (Scope For Growth, Dynamic Energy Budget et Metabolic Theory in Ecology) possède des modules mécanistiques permettant de prédire les effets toxiques sur les individus et la population. Dans le cadre de cette thèse, nous utilisons les modèles d'effets DEBtox (Kooijman et Bedaux, 1996) pour les raisons évoquées au sujet de la théorie DEB au chapitre III.

2.2. Hypothèses fondamentales et utilisation des modèles d'effets DEBtox.

Les modèles de type DEBtox sont basés sur des hypothèses biologiques simples.

Tout d'abord, le contaminant doit rentrer dans l'organisme pour pouvoir exercer un effet (notion de concentration interne mais aussi de cible). Ce processus est décrit par des lois toxico-cinétiques issues du modèle à un compartiment formulé par Chew et Hamilton (1985) : l'absorption du composé est proportionnelle à sa concentration en solution, et son élimination est proportionnelle à sa concentration interne.

Une fois que le toxique a pénétré dans l'organisme, il peut s'accumuler dans l'organisme sans provoquer d'effets jusqu'à une concentration interne seuil, dite concentration interne sans effets (CSE). Les effets toxiques ne se manifestent que lorsque la concentration dans les tissus dépasse la CSE.

Une fois la CSE franchie, chaque molécule de toxique exerce un effet similaire sur l'organisme. Les effets toxiques sont donc proportionnels à la différence au cours du temps entre la CSE et la concentration interne.

En définitive, ces modèles supposent que les effets pathologiques obéissent à des règles quantitatives dictées par les interactions entre les molécules et qu'ils ne se manifestent que si les capacités de défense de l'organisme sont insuffisantes par rapport au niveau de contamination.

Dans les modèles DEBtox, les effets toxiques s'exercent sur les paramètres de la théorie DEB (Kooijman, 2000) qui décrivent l'allocation d'énergie aux différentes fonctions vitales : survie, maintenance, croissance et reproduction. Ils sont déduits des principes d'allocation de l'énergie formulés dans la théorie DEB (voir chapitre III).

L'estimation des paramètres du modèle et de leurs intervalles de confiance à 95% (techniques s'appuyant sur le maximum de vraisemblance) pour le critère d'effet biologique étudié est réalisée à partir des courbes concentration-réponse obtenues grâce aux bioessais. Ces estimations requièrent l'utilisation du logiciel DEBtox (Kooijman et Bedaux, 1996) ou d'un programme équivalent rédigé par l'expérimentateur.

A partir des modèles ainsi paramétrés, nous pouvons calculer des concentrations sans effet sur la survie, la croissance et la reproduction des organismes. Nous pouvons aussi construire des courbes théoriques de survie, de croissance et de fécondité en fonction de la concentration en toxique dans le sédiment.

Dans les paragraphes suivants, nous allons voir comment les modèles de type DEBtox s'appliquent dans le cas de nos trois espèces.

2.3. Le modèle toxico-cinétique général

Nous supposons que la concentration interne obéit à une cinétique linéaire à un compartiment (Chew et Hamilton, 1985) chez nos trois organismes. Selon ce modèle, la variation de concentration interne $C_i(t)$ en toxique au cours du temps s'écrit :

$$\frac{dC_i}{dt}(t) = k_a \times c_e - k_e \times C_i(t) \quad (21)$$

où k_a et k_e représentent respectivement les taux d'absorption et d'élimination de la substance par l'organisme, et c_e la concentration en toxique dans le milieu d'essai.

Concrètement, les concentrations internes $C_{i(t)}$ ne sont pas mesurées lors de tous les tests de toxicité que nous avons réalisés. Il faut donc trouver un moyen de les exprimer dans notre modèle en fonction des éléments connus à la fin des tests :

- la concentration dans le milieu c_e (valeur mesurée) ;
- le facteur de bioconcentration en toxique dans l'organisme BCF (valeur mesurée) ;
- le taux d'élimination du toxique k_e (valeur estimée par nos modèles d'effets toxiques à partir des données issues des tests).

D'après Kooijman et Bedaux (1996), nous pouvons faire le lien entre la concentration interne et la concentration externe grâce à une nouvelle variable, la concentration interne « normalisée » ($c_{i(t)}$), qui s'écrit en fonction des taux d'absorption et d'élimination du toxique :

$$c_i(t) = C_i(t) \times BCF \quad (22)$$

$$\text{avec } \frac{k_a}{k_e} = BCF \quad (23)$$

La variable $c_{i(t)}$, est proportionnelle à $C_{i(t)}$ tout en étant homogène à la concentration dans le milieu : $c_{i(t)}$ est donc directement comparable à c_e (Péry 2003).

La variation de concentration interne en toxique s'écrit alors en fonction de $c_{i(t)}$:

$$\boxed{\frac{dC_i}{dt}(t) = k_e \times [c_e - c_i(t)]} \quad (24).$$

Le paramètre k_e (et son intervalle de confiance à 95%) est estimé à partir d'un jeu de données issues des bioessais. Le paramètre k_a est calculé en fonction du k_e (estimé) et du BCF (mesuré).

Si $k_e = 0$, alors d'après l'équation 21, $C_{i(t)}$ ne dépend que de la concentration dans le milieu et du taux d'absorption k_a . Sachant que c_e est une constante au cours de l'essai (voir paragraphe 3.3.2.), la concentration interne augmente linéairement avec le temps en fonction de k_a . Si k_e appartient à l'intervalle $[2 ; +\infty]$ et que l'unité de temps de référence vaut 1, d'après Kooijman et Bedaux (1996), nous pouvons alors faire l'approximation suivante : $c_{i(t)} = c_e$.

2.4. Effets sur la survie des organismes

Lorsqu'un organisme est exposé à un milieu toxique, il investit de l'énergie dans des mécanismes de défense, de réparation et de régénération des cellules. Nous supposons que l'allocation d'énergie à ces processus de maintenance est prioritaire par rapport à la croissance et à la reproduction chez tous les organismes (Kooijman et Bedaux, 1996). Nous supposons donc que nos trois espèces utilisent la même stratégie de gestion de l'énergie liée à leur survie. Nous proposons ainsi un modèle commun pour décrire la survie nos trois espèces, quel que soit leur stade de développement.

D'après les hypothèses formulées par Kooijman et Bedaux (1996), le risque de mortalité $h(t)$ dépend de la différence entre la concentration interne normalisée ($c_i(t)$) et la concentration sans effet sur la survie au cours du temps (CSE_s). Il s'écrit :

$$\begin{cases} h(t) = b \times (c_i(t) - CSE_s) + k & \text{si } c_i(t) > CSE_s \\ h(t) = k & \text{si } c_i(t) < CSE_s \end{cases} \quad (25)$$

où k représente le taux de mortalité en absence de toxique, supposé constant au cours de l'essai et b représente le taux de toxicité de la substance (« killing rate » des modèles DEBtox). Concrètement, b représente la gravité des effets d'une molécule toxique sur l'organisme une fois que la concentration sans effet est dépassée.

La probabilité de survie au cours du temps dépend du risque de mortalité à l'instant $h(t)$. D'après Kooijman et Bedaux (1996), elle s'écrit de la façon suivante :

$$q(t) = \exp \left[- \int_0^t h(\tau) d(\tau) \right] \quad (26)$$

où, pour un court intervalle de temps $d(\tau)$, $h(\tau)d(\tau)$ correspond à la probabilité de mourir entre le temps τ et $\tau + d(\tau)$ pour un organisme ayant survécu jusqu'à τ .

A partir des équations 25 et 26, nous pouvons alors prédire le nombre de survivants au temps t (soit $S(t)$) à partir de la concentration en zinc dans le milieu :

$$\begin{cases} S(t) = e^{-kt} & \text{si } c_{i(t)} < CSE_s \\ S(t) = e^{-[kt+bt(ci-CSE_s)]} & \text{si } c_{i(t)} > CSE_s \end{cases} \quad (27)$$

Les paramètres b et CSE_s (et leurs intervalles de confiance à 95%) sont estimés au maximum de vraisemblance à partir d'un jeu de données issues des bioessais. L'équation 27 nous fournit alors une courbe de survie théorique en fonction de la concentration en zinc.

2.5. Effets sur la croissance des organismes

2.5.1. Principes des modèles

Dans les modèles DEBtox, les effets sur la croissance se traduisent par une diminution du taux de croissance journalier des organismes. Cette diminution peut être due à trois mécanismes différents, qui impliquent soit une diminution de l'énergie allouée à la croissance, soit une augmentation du coût énergétique de la fabrication de biomasse sans modification de l'énergie allouée à la croissance (Kooijman et Bedaux, 1996).

La diminution d'énergie disponible pour la croissance peut être liée à :

- une diminution de la quantité de nourriture assimilée, qui correspond :
 - soit à une stratégie d'évitement du contaminant qui entre dans l'organisme par la voie alimentaire (Leppänen *et al.*, 1998) ;
 - soit à une conséquence de l'induction par le contaminant de déformations au niveau de l'appareil buccal de l'organisme (Servia *et al.*, 2000 ; Martinez *et al.*, 2001) ;
 - soit à une diminution de l'efficacité de la digestion de la nourriture (Kooijman et Bedaux, 1996) ;
- une augmentation des coûts de maintenance de l'organisme. En effet, la présence de toxique engendre un stress qui peut induire la mise en place de mécanismes de résistance au métal (*e.g.* synthèse de métallothionéines - Roesijadi , 1992). L'énergie allouée à la mise en place de ces mécanismes de défense peut être soustraite au budget consacré à la fabrication de biomasse (Liber *et al.*, 1996 ; Kooijman, 2000) ;

- une augmentation du coût énergétique de la croissance, qui est la conséquence d'une diminution du rendement de transformation des réserves en biomasse (S.A.L.M. Kooijman, Comm. Pers.). Cette baisse de rendement est probablement liée à l'action du polluant sur les mécanismes physiologiques impliqués dans la synthèse des biomolécules, *via* des processus d'inhibition ou de compétition. Les processus touchés ne sont pas clairement établis.

Ces trois mécanismes d'effets sont supposés indépendants et exclusifs : seul le processus d'allocation de l'énergie le plus « sensible » est affecté par le toxique (Kooijman et Bedaux, 1996). Or, les trois espèces étudiées présentent probablement des règles de gestion de l'énergie différentes. Il faut donc déterminer quel est le paramètre d'allocation de l'énergie qui est affecté par le toxique pour chaque espèce. Ceci implique de proposer des modèles décrivant les trois scénarii d'effets possibles pour chaque organisme. Ces modèles sont construits à partir des règles d'allocation d'énergie formulées en conditions témoins (voir chapitre III). Chaque scénario d'effet est ensuite testé en comparant les prédictions du modèle correspondant avec les données des tests de croissance.

2.5.2. Modélisation du retard de croissance chez les larves de chironome

Les coûts de maintenance étant négligeables devant l'investissement énergétique pour la croissance (Péry *et al.*, 2002), nous abandonnons l'hypothèse que les effets sur la croissance du chironome soient liés à une augmentation de l'énergie investie pour la maintenance. Deux modèles d'effets sur la croissance sont donc proposés. Le premier est basé sur l'hypothèse que les effets sont dus à l'augmentation du coût énergétique de la croissance. Le second suppose que les effets sont liés à une diminution de la quantité d'énergie assimilée.

En conditions d'alimentation *ad libitum*, le taux de croissance journalier γ de la larve s'écrit (voir chapitre III):

$$\frac{dl}{dt} = \gamma = \frac{f \times \beta}{3i \times \alpha} \quad (1)$$

avec :

- i la constante d'isomorphie ;
- β la fraction assimilable de la nourriture ;
- f la vitesse d'assimilation de la nourriture ;
- α le coût énergétique de fabrication d'une unité de biomasse.

D'après Kooijman et Bedaux (1996), les paramètres f ou α sont affectés de façon proportionnelle à la différence entre la concentration interne normalisée $c_{i(t)}$ et la concentration interne sans effet pour la croissance (CSE_c), une fois que ce seuil est dépassé :

$$\alpha_{ce} = \alpha_0 \times [1 + b \times (c_{i(t)} - CSE_c)] \quad (28) \quad \text{ou} \quad f_{ce} = f_0 \times [1 - b \times (c_{i(t)} - CSE_c)] \quad (29)$$

avec :

- α_{ce} et f_{ce} le coût énergétique de croissance et la vitesse d'assimilation de la nourriture pour une concentration externe en zinc c_e ,
- α_0 et f_0 le coût énergétique de la croissance et la vitesse d'assimilation de la nourriture chez les témoins
- et b le taux de toxicité de la substance testée.

A partir des équations 1 et 28, nous proposons un modèle d'augmentation des coûts de croissance en présence de toxique (modèle ACC) :

$$\frac{dl}{dt} = \frac{f_0 \times \beta}{3i \times \alpha_0 \times 1 + [b \times (c_{i(t)} - CSE_c)]} \quad (30)$$

La quantité de nourriture assimilée par l'organisme n'étant pas affectée par la présence de toxique, nous pouvons faire l'approximation $f_0 = 1$ en conditions d'alimentation *ad libitum*, (Kooijman et Bedaux, 1996). L'équation 30 se simplifie à partir de l'équation 1 :

$$\boxed{\frac{dl}{dt} = \frac{\gamma_0}{1 + b \times (c_{i(t)} - CSE_c)}} \quad (31)$$

avec γ_0 le taux de croissance journalier chez les témoins en conditions d'alimentation *ad libitum*.

A partir des équations 1 et 29, nous proposons un modèle de diminution de l'assimilation en présence de toxique (modèle DA) :

$$\frac{dl}{dt} = \frac{\beta \times f_0 \times [1 - b \times (c_{i(t)} - CSE_c)]}{3i \times \alpha_o} \quad (32)$$

Là encore, nous pouvons faire l'approximation $f_0=1$ si les témoins sont nourris *ad libitum* et que leur vitesse d'assimilation n'est pas perturbée. L'équation 31 se simplifie alors à partir de l'équation 1 :

$$\boxed{\frac{dl}{dt} = \gamma_0 \times [1 - b \times (c_{i(t)} - CSE_c)]} \quad (33)$$

Les paramètres du modèle b , CSE_c (et leurs intervalles de confiance à 95%) sont estimés au maximum de vraisemblance à partir d'un jeu de données issues des bioessais. Les équations 31 et 33 nous fournissent des courbes de croissance théoriques en fonction de la concentration en zinc.

2.5.3. Modélisation du succès à l'émergence et de la probabilité d'accouplement des chironomes

Modélisation du succès à l'émergence

Les modèles DEBtox prennent en compte la cinétique du toxique dans l'organisme. Afin de paramétrer ces modèles, il est donc nécessaire de réaliser plusieurs observations du critère d'effet au cours du temps. Or, la nymphose ne dure que 24 h : pratiquement, il est fastidieux de procéder à plusieurs observations successives des nymphes en un temps si court. L'approche par les modèles DEBtox n'est donc pas utilisable pour la prédiction d'effets sur l'émergence des chironomes.

Ces effets sont abordés par une approche statistique classique : une courbe concentration-réponse de type logistique est ajustée aux données afin de calculer une CE_{50} pour l'émergence. L'intervalle de confiance de la CE_{50} est obtenu par bootstrapping. Cette technique d'inférence repose sur des simulations qui permettent de générer aléatoirement une distribution de données. Par exemple, pour une simulation de $N=1000$ données, nous étudions la distribution des $b(x)$ données avec x appartenant à l'intervalle $[1 ; 1000]$. L'intervalle de

confiance de la CE_{50} au risque α correspond à l'ensemble des valeurs telles que la probabilité d'une valeur $b(x)$ d'être comprise dans cet intervalle soit égale à $1-2\alpha$. Les bornes de l'intervalle de confiance correspondent alors à $b(N\alpha)$ et $b(N(1-\alpha))$. Par exemple, pour $N=1000$, l'intervalle de confiance de la CE_{50} est le suivant [$b(50)$; $b(950)$].

Probabilité d'accouplement en présence de toxique

Dans le cas d'une croissance normale, le décalage entre l'émergence des mâles et des femelles est d'un jour seulement, ce qui permet à l'ensemble des femelles émergentes d'être fécondées. La présence de toxique dans le milieu peut provoquer un retard de croissance suffisant pour désynchroniser partiellement les émergences des mâles et des femelles. Ceci a pour conséquence une diminution de la probabilité de rencontre des individus de sexe opposé. Il devient alors nécessaire de modéliser la probabilité de fécondation en fonction de la concentration toxique dans le milieu.

L'étude de la distribution des émergences des larves permet de calculer le nombre de mâles et de femelles présents chaque jour dans la population en fonction de la concentration en zinc. A partir de ces effectifs journaliers, il est possible de calculer la probabilité d'accouplement des organismes en se basant sur les hypothèses suivantes (Downe, 1973) :

- les organismes peuvent se reproduire toute leur durée de vie adulte ;
- la capacité moyenne de reproduction des mâles est de 1 femelle fécondée par jour ;
- chaque femelle ne peut être fécondée qu'une seule fois : elle se reproduit, puis meurt.

2.5.4. Modélisation du retard de croissance chez *V. piscinalis* et *B. sowerbyi*

Contrairement au chironome, nous ne pouvons pas supposer que les coûts de maintenance sont négligeables chez *V. piscinalis* et *B. sowerbyi*. La possibilité d'une diminution de la croissance liée à une augmentation de l'énergie investie pour la maintenance doit donc être prise en compte dans les scénarii d'effets proposés. Trois modèles d'effets sur la croissance de *V. piscinalis* et *B. sowerbyi* sont donc proposés : effets liés à l'augmentation du coût énergétique de la croissance, effets liés à une diminution de la quantité de nourriture

assimilée et effets liés à une augmentation des coûts de maintenance. Nous utilisons les mêmes modèles d'effets sur la croissance pour *V. piscinalis* et *B. sowerbyi*, car :

- ces deux espèces présentent le même type de courbe de croissance en conditions témoins (modèle de Von Bertalanffy, voir chapitre III) ;
- ce sont les mêmes paramètres qui sont affectés par la présence de toxique chez ces deux organismes (la taille asymptotique et le taux de croissance).

Nos modèles d'effets sont basés sur l'étude de la taille des organismes. Dans le cas de *B. sowerbyi*, nous obtenons des valeurs de tailles homogènes aux poids mesurés pendant les essais en prenant la racine cubique de ce poids.

En conditions d'alimentation *ad libitum*, la taille des organismes témoins au cours du temps $l(t)$ s'écrit en fonction de son âge t (voir chapitre III):

$$\frac{dl}{dt} = \gamma_0 (l_{\infty,0} - l) \quad (16)$$

avec :

- γ_0 le taux de croissance journalier ;
- $l_{\infty,0}$ la taille asymptotique ;
- l la taille de l'organisme à l'âge t .

D'après Kooijman et Bedaux (1996), la présence de toxique affecte soit la taille asymptotique (l_{∞}), soit le taux de croissance journalier (γ), soit les deux paramètres à la fois, en fonction du scénario d'effet envisagé (respectivement diminution de la quantité de nourriture ingérée, augmentation des coûts de croissance et augmentation des coûts de maintenance). La taille des organismes exposés en zinc s'écrit alors :

$$\frac{dl}{dt} = \gamma_{ce,t} (l_{\infty,ce,t} - l) \quad (34)$$

avec :

- γ_{ce} le taux de croissance journalier des organismes exposés à une concentration c_e en toxique ;
- $l_{\infty,ce}$ la taille asymptotique des organismes exposés à une concentration c_e en toxique ;
- l la taille de l'organisme à l'instant t .

La valeur des paramètres $l_{\infty,ce}$ et γ_{ce} pour chaque scénario d'effet envisagé est proposée dans le tableau XVIII.

Tableau XVIII. Expression des paramètres décrivant la croissance de *Valvata (Cincinna) piscinalis* et *Branchiura sowerbyi* en présence de toxique pour les trois scénarii d'effets envisagés (d'après Kooijman et Bedaux, 1996)

Scénario d'effet supposé	Taille	Taux de croissance
	asymptotique $l_{\infty,ce}$ (mm)	journalier γ_{ce} (mm/j)
Diminution assimilation (DA)	$l_{\infty,0} \times (1 - s_{(ce)})$	γ_0
Augmentation coûts de croissance (ACC)	$l_{\infty,0}$	$\gamma_0 \times \frac{1+g}{1+g \times (1+s_{(ce)})}$
Augmentation coûts de maintenance (ACM)	$\frac{l_{\infty,0}}{1+s_{(ce)}}$	$\gamma_0 \times (1+s_{(ce)})$

avec :

- $l_{\infty,0}$ la taille asymptotique chez les témoins ;
- γ_0 le taux de croissance journalier chez les témoins ;
- g le rendement de la croissance somatique (« investment ratio » des modèles DEB). En conditions d'alimentation *ad libitum*, nous pouvons faire l'approximation $g=1$ (Kooijman et Bedaux, 1996).

L'expression $s(c_e)$, appelée « stress function », rend compte de l'hypothèse que les effets sur la croissance des organismes augmentent linéairement avec la concentration interne normalisée en toxique $c_i(t)$, une fois que la concentration sans effet sur la croissance (CSE_{cx}) est dépassée. La valeur de cette fonction de stress varie selon le scénario d'effet envisagé (x) car elle dépend de la concentration sans effet correspondante (CSE_{cx}) :

$$s(c_e) = \frac{c_i - CSE_{cx}}{tc_x} \quad (35)$$

avec tc_x la concentration tolérée (« tolerance concentration » du modèle DEBtox). Le paramètre tc_x est une constante dont la valeur dépend du scénario d'effet envisagé.

Les paramètres du modèle CSE_{cx} et tc sont estimés grâce au logiciel DEBtox (Kooijman et Bedaux, 1996) à partir des données issues des tests de croissance en présence de

zinc. Ces valeurs servent alors au calcul de γ_c et $l_{\infty,c}$ pour chacune des concentrations testées, d'après les formules reportées dans le tableau XVIII. Nous ne calculons pas d'intervalle de confiance pour ces paramètres. Les courbes de croissance théoriques en fonction de la concentration en zinc correspondant à nos trois modèles d'effets sont alors obtenues à partir de l'équation 34.

2.6. Effets sur la reproduction des organismes

2.6.1. Principes des modèles

Les modèles de reproduction DEBtox décrivent l'effet des toxiques sur la fécondité des organismes. La diminution de la fécondité individuelle en présence de toxique peut être due à 5 mécanismes différents (Kooijman et Bedaux, 1996) :

- une mortalité des femelles durant l'oogenèse ;
- une diminution de l'énergie disponible pour la reproduction, *via* :
 - une augmentation de l'énergie investie pour la maintenance ;
 - une augmentation de l'énergie investie pour la croissance ;
 - une diminution de la quantité de nourriture assimilée ;
- une augmentation du coût énergétique de fabrication des œufs, sans modification de l'énergie disponible pour la reproduction.

La mobilisation des réserves énergétiques pour l'oogenèse génère une grande quantité de radicaux libres, qui provoquent une augmentation des adduits à l'ADN et du nombre des protéines non fonctionnelles chez les femelles (Kooijman et Bedaux, 1996). Ainsi, les modèles DEBtox font l'hypothèse que les femelles sont potentiellement plus sensibles aux effets des toxiques en période d'oogenèse que pendant le reste de leur vie. Durant cette période, le couplage entre les effets liés à l'utilisation des réserves et les effets du toxique aurait pour conséquence une mortalité accrue chez les femelles exposées par rapport aux femelles témoins. Concrètement, la mortalité des femelles gravides correspondrait à un processus de vieillissement intense qui s'exercerait sur une période courte. Ce modèle d'effet n'a pas été testé chez nos organismes, car nous n'avons jamais observé d'augmentation

significative de la mortalité des femelles exposées au toxique par rapport aux témoins aux concentrations testées dans les essais de reproduction.

La diminution de l'énergie disponible pour la reproduction peut être une conséquence des effets du toxique sur la croissance de l'organisme. En effet, nos modèles de croissance supposent soit que l'organisme assimile moins d'énergie, soit qu'il investit plus d'énergie dans la maintenance, soit qu'il investit plus d'énergie dans la croissance. Selon la théorie DEB, ces trois processus sont prioritaires sur l'allocation d'énergie à la reproduction : selon la loi de conservation de l'énergie, il reste donc moins d'énergie disponible pour la reproduction. La gestion de l'énergie dans le temps est aussi modifiée : le déclenchement d'effets sur la croissance peut provoquer un report du début de la reproduction chez les organismes contaminés. Expérimentalement, l'observation d'un délai à la première reproduction est une bonne indication pour savoir si les effets sur la reproduction sont dus à des effets sur la croissance.

L'augmentation du coût de fabrication des œufs est liée, comme dans le cas de l'augmentation des coûts de la croissance, à une diminution du rendement de transformation des réserves en biomasse.

Comme précédemment, ces mécanismes d'effets sont supposés indépendants et exclusifs, sous l'hypothèse que seul le processus d'allocation de l'énergie le plus « sensible » est affecté par le toxique (Kooijman et Bedaux, 1996). Nous proposons des modèles décrivant les 3 scénarii d'effets possibles pour chacune des 3 espèces que nous étudions. Chaque scénario d'effet est ensuite testé en comparant les prédictions du modèle correspondant avec les données des tests de reproduction.

2.6.2. Modélisation des effets sur la reproduction chez le chironome

D'après Péry (2003), les coûts de maintenance sont négligeables par rapport aux coûts de croissance et de reproduction chez le chironome. Nous ne construisons donc pas le modèle qui suppose que les effets sur la reproduction sont liés à une augmentation des coûts de maintenance.

En absence de toxique, nous avons vu au chapitre III que la fécondité s'exprime en fonction de la quantité d'énergie mise en réserve durant la phase larvaire et du coût d'un œuf :

$$N_0 = \frac{Q \times f \times \beta \times D}{\delta_0} \quad (4)$$

avec :

- Q la quantité de nourriture apportée quotidiennement aux organismes (0,6 mg/individu/jour) ;
- f la vitesse d'assimilation de la nourriture par les organismes ;
- β la fraction assimilable de la nourriture fournie ($\beta = 70\%$ pour la Tétramin® ; Péry *et al.*, 2002) ;
- D la durée de la phase d'investissement énergétique pour la reproduction ($D = 5$ jours) ;
- δ le coût énergétique de fabrication des œufs ($\delta_0 = 0,0019$ mg de Tétramin® /œuf).

La présence de toxique peut affecter la fécondité des femelles exposées *via* l'augmentation du coût énergétique de production d'un œuf (paramètre δ). Dans ce cas, la fécondité attendue en présence de toxique s'écrit d'après l'équation 4 :

$$N_{ce} = \frac{Q \times f_0 \times \beta \times D}{\delta_{ce}} \quad (36).$$

avec N_{ce} la fécondité et δ_{ce} le coût de fabrication d'un œufs pour la concentration en zinc c_e dans le milieu.

Selon Kooijman et Bedaux (1996), l'augmentation du coût de fabrication d'un œuf est supposée proportionnelle à la concentration interne normalisée en toxique dans l'organisme $c_{i(t)}$ une fois que la concentration externe sans effet pour la reproduction (CSE_r) est franchie :

$$\delta_{ce} = \delta_0 \times [1 + b \times (c_{i(t)} - CSE_r)] \quad (37)$$

avec b le taux de toxicité de la substance testée.

La fécondité N_{ce} des femelles exposées s'écrit alors selon les équations 36 et 37 (modèle ACO) :

$$\boxed{N_{ce} = \frac{N_0}{1 + b(c_{i(t)} - CSE_r)}} \quad (38)$$

La présence de toxique est par ailleurs susceptible de diminuer la quantité d'énergie assimilée par l'organisme, prise en compte dans nos modèles par le paramètre f . Ceci a pour conséquences une diminution de la quantité d'énergie stockée durant la période d'investissement pour la reproduction et se traduit par une baisse de fécondité. Dans ce cas, la fécondité en présence de toxique peut être prédite à partir de l'équation 36 par :

$$N_{ce} = \frac{Q \times f_{ce} \times \beta \times D}{\delta_0} \quad (39)$$

avec N_{ce} la fécondité et f_{ce} la vitesse d'assimilation de la nourriture pour la concentration en zinc c_e dans le milieu.

Selon Kooijman et Bedaux (1996), une fois la CSE_r dépassée, la vitesse d'assimilation f_{ce} est affectée de façon proportionnelle à la concentration interne en toxique $c_{i(t)}$:

$$f_{ce} = f_0 \times [1 - b \times (c_{i(t)} - CSE_r)] \quad (40)$$

D'après les équations 38 et 39, la fécondité N_{ce} des femelles exposées s'écrit alors (modèle DA) :

$$\boxed{N_{ce} = N_0 \times [1 - b \times (c_{i(t)} - CSE_r)]} \quad (41)$$

Les paramètres du modèle b et CSE_r (et leurs intervalles de confiance à 95%) sont estimés au maximum de vraisemblance à partir d'un jeu de données issues des bioessais. Les équations 38 et 41 nous fournissent des valeurs de fécondité théorique en fonction de la concentration en zinc.

2.6.3. Modélisation des effets sur la reproduction chez *V. piscinalis* et *B. sowerbyi*

Comme pour la croissance, nos modèles de reproduction pour *V. piscinalis* et *B. sowerbyi* sont basés sur les hypothèses biologiques de la théorie DEB (Kooijman, 2000). En effet, ces hypothèses s'appliquent aussi bien au gastéropode qu'à l'oligochète :

- les coûts de maintenance ne peuvent pas être négligés ;
- l'organisme adulte investit de l'énergie pour sa croissance ;
- la maintenance et la croissance étant des fonctions vitales prioritaires sur la reproduction, l'énergie nécessaire à leur maintien en présence de toxique est soustraite du budget énergétique alloué à la reproduction chez les témoins.

Contrairement au chironome, la modélisation des effets sur la reproduction chez *V. piscinalis* et *B. sowerbyi* nécessite donc de prendre en compte les effets sur les autres paramètres de vie, tels que la croissance et la maintenance. Les modèles qui en résultent sont donc plus complexes.

Nous avons vu au chapitre III que la fécondité instantanée des témoins nourris *ad libitum* dépend :

- de la taille relative à l'instant t (L , « scaled length » des modèles DEB) ;
- de la croissance des organismes, définie par les tailles relatives à la naissance (L_b) et à la puberté (L_p) et par la taille asymptotique l_∞ ;
- de l'effort maximal de reproduction N_{max} , exprimé en nombre d'œufs.

La fécondité instantanée s'écrit alors selon l'équation suivante (Kooijman, 2000) :

$$N(l) = \frac{N_{max}}{1 - L_p^3} \times \left(\frac{L^2 + L^3}{2} - L_p^3 \right) \quad (17)$$

$$\text{avec } L = \frac{l}{l_\infty} \text{ et } L_p = \frac{l_p}{l_\infty}$$

D'après Kooijman et Bedaux (1996), les effets sur la fécondité peuvent être dus :

- soit à l'augmentation du coût énergétique de fabrication d'un œuf ;
- soit à une augmentation de la quantité d'énergie utilisée pour la maintenance ;
- soit à une augmentation de la quantité d'énergie utilisée pour la croissance ;

- soit à une diminution de la quantité d'énergie assimilée.

Ces 4 types d'effets sont supposés indépendants et exclusifs (Kooijman et Bedaux, 1996). Nous avons formulé les modèles correspondant à chacun de scénarii d'effets de la façon la plus simple possible.

En présence de toxique, l'équation 17 devient, d'après Kooijman (2000) :

$$N(l) = \frac{R \times N_{\max}}{1 - L_p^3} \times C \times M \left[\frac{L^2}{C+1} \times \left(\frac{A}{M} + L \right) - L_p^3 \right] \quad (42)$$

avec :

- R une fonction qui représente les coûts de reproduction ;
- A une fonction qui représente l'efficacité de l'assimilation, par rapport au témoin ;
- M une fonction qui représente les coûts de maintenance ;
- C une fonction qui représente les coûts de croissance ;
- $L = \frac{l}{l_{\infty, ce}}$ avec $l_{\infty, ce}$ la taille asymptotique des organismes exposés à une concentration ce en toxique.

Chacune de ces 5 variables de stress rend compte du fait que les effets toxiques augmentent linéairement avec la concentration interne normalisée en toxique $c_i(t)$, une fois que la concentration sans effet sur la reproduction (CSE_{rx}) est dépassée. La valeur de ces variables dépend du scénario d'effets envisagé : elle est reportée dans le tableau XIX.

L'expression $s_{(ce)}$, appelée « stress function », à déjà été rencontrée dans les modèles d'effets sur la croissance de *V. piscinalis* et *B. sowerbyi*. Sa valeur varie selon le scénario d'effet envisagé (x) car elle dépend de la concentration sans effet correspondante (CSE_{rx}) :

$$s_{(ce)} = \frac{c_i - CSE_{rx}}{tc_x} \quad (35)$$

avec tc_x la concentration tolérée (constante dont la valeur est fournie par le modèle et dépend du scénario d'effet envisagé).

Tableau XIX. Expression des paramètres décrivant la reproduction de *Valvata (Cincinnati) piscinalis* et *Branchiura sowerbyi* en présence de toxique pour les 4 scénarii d'effet envisagés (d'après Kooijman, 2000).

<i>Scénario d'effet supposé</i>	<i>R</i>	<i>A</i>	<i>M</i>	<i>C</i>	<i>Taille asymptotique</i>
Diminution assimilation (DA)	1	$1 - s_{(ce)}$	1	1	$l_{\infty,0} \times (1 - s_{(ce)})$
Augmentation coûts de croissance (ACC)	1	1	1	$1 + s_{(ce)}$	$l_{\infty,0}$
Augmentation coûts de maintenance (ACM)	1	1	$1 + s_{(ce)}$	1	$\frac{l_{\infty,0}}{1 + s_{(ce)}}$
Augmentation du coût de fabrication des œufs (ACO)	$(1 + s_{(ce)})^{-1}$	1	1	1	$l_{\infty,0}$

Afin de choisir quel est le modèle le plus approprié, nous regardons si les effets sur la fécondité sont corrélés avec les effets sur la croissance :

- si tel est le cas, alors les effets sur la reproduction sont dus soit à une diminution de l'assimilation, soit à une augmentation des coûts de croissance ou de maintenance. Pour choisir lequel de ces scénarii est le plus plausible, nous déterminons lequel de ces trois modèles fournit les estimations les plus fiables par rapport aux données du test de reproduction.
- sinon, nous admettons que les effets sur la reproduction sont liés à une augmentation du coût de fabrication des œufs. Les valeurs de taille nécessaires pour modéliser la fécondité chez l'oligochète sont obtenues en prenant la racine cubique du poids mesuré durant les essais.

Les paramètres du modèle choisi (N_{max} , CSE_{rx} et tc_x) sont estimés au maximum de vraisemblance à partir des données issues des tests chroniques de reproduction. Nous ne calculons pas d'intervalle de confiance pour ces paramètres.

En conclusion, deux cas se présentent à nous lorsque nous étudions les effets du zinc sur la reproduction :

- soit le zinc affecte « directement » la fécondité des organismes, *via* une augmentation du coût de fabrication des œufs (modèle ACO). Dans ce cas, les effets du zinc sur la reproduction sont indépendants des effets sur la croissance. La fécondité attendue en présence de zinc est alors prédite grâce à l'équation 42 ;

- soit le zinc affecte indirectement la fécondité des organismes, *via* une diminution de l'énergie disponible pour la reproduction (modèles ACC, ACM et DA). Dans ce cas, les effets du zinc sur la reproduction ne sont pas indépendants des effets sur la croissance. La fécondité attendue en présence de zinc est donc prédite à partir de l'équation 34 (qui décrit les effets sur la croissance) et de l'équation 42 (qui décrit les effets sur la reproduction).

3. LES METHODES D'EVALUATION DE LA TOXICITE DU ZINC AU NIVEAU DE L'INDIVIDU

3.1. Principe et méthodes des bioessais de toxicité

Le bioessai consiste à exposer des organismes à une gamme de concentration en zinc, dans des conditions expérimentales contrôlées, pendant une durée déterminée. Les conditions expérimentales ont été définies dans le chapitre III. La durée de l'essai varie selon le critère d'effet étudié.

Le but de l'essai est d'évaluer la réponse biologique des organismes mis en présence de toxique, pour l'un des paramètres du cycle de vie impliqués dans la dynamique de population (survie et croissance aux différentes stades de développement, reproduction).

Lors d'un bioessai, les organismes peuvent être exposés au contaminant étudié *via* la colonne d'eau ou *via* le sédiment. Dans le cadre de cette thèse, les organismes sont exposés au toxique *via* le sédiment. Ceci permet de déterminer des relations concentration-réponse dans un contexte réaliste vis-à-vis de la niche écologique des invertébrés benthiques (Burton, 1992). Ceci permet par ailleurs d'éviter une surmortalité des organismes liée au stress provoqué par l'absence de substrat (Harkey *et al.*, 1994 ; Bat *et al.*, 1998). Nous utilisons le même sédiment que lors des élevages et des bioessais témoins (sédiment prélevé sur le site de Port Galland ; propriétés physico-chimiques en annexe 4).

3.2. Enrichissement du sédiment en zinc

Le sédiment de Port-Galland est prélevé *in situ* avant chaque bioessai et tamisé à 500 µm afin d'éliminer les organismes endogènes ainsi que les particules végétales de grande taille (US EPA, 1998). A chaque prélèvement, nous déterminons son taux d'humidité, sa densité et sa concentration naturelle en zinc (faible, mais non nulle). Sa granulométrie ainsi que la quantité de carbone organique sont suivies annuellement.

Ces sédiments sont ensuite enrichis en toxique au laboratoire en les mettant en contact avec une solution de zinc. Cette solution est obtenue par dilution (avec de l'eau d'élevage) d'une solution mère jusqu'à la concentration nominale désirée. Les solutions diluées sont préparées dans l'ordre croissant des concentrations, afin d'éviter les contaminations croisées entre concentrations *via* le matériel (Murdoch *et al.*, 1997). Le volume de solution ajouté est équivalent au volume de sédiment préparé, afin de faciliter l'adhérence des particules entre elles lors de leur agitation. C'est cette étape d'agitation qui conduit à l'adsorption des molécules de zinc sur les particules du sédiment (Ditsworth *et al.*, 1990).

Une agitation par rotation pendant 6 heures à une vitesse de 100 rotations par minute permet une incorporation homogène du toxique au sédiment (Northcott et Jones, 2000). Les sédiments témoins subissent aussi cette agitation. Nous utilisons un système d'agitation rotatif similaire à celui décrit par Ditsworth *et al.* (1990) - (Fig. 57).



Figure 57. Système d'agitation utilisé pour la contamination en zinc du sédiment naturel au laboratoire.

Les sédiments ainsi contaminés sont stockés à température ambiante durant 20 jours afin de permettre la mise en place de l'équilibre chimique entre le sédiment et l'eau interstitielle (Simpson *et al.*, 2004). Ce temps d'équilibration conditionne le rendement de l'enrichissement en toxique dans les différentes phases du milieu. Une courte agitation quotidienne (jours ouvrés) des flacons permet la ré-homogénéisation du sédiment et de l'eau interstitielle, assurant ainsi une distribution uniforme du toxique dans le sédiment.

Le rendement de l'enrichissement est évalué en mesurant la concentration en zinc total par spectrométrie de masse (ICP-MS) pour chacune des concentrations nominales testées, à partir :

- d'un échantillon de sédiment et d'eau surnageante, prélevés dans les béciers d'exposition ;
- d'un échantillon d'eau interstitielle, extraite du sédiment par centrifugation.

Les échantillons sont recueillis :

- en début, milieu et fin d'essai lors de bioessais d'une durée supérieure à un mois (croissance et reproduction de *B. sowerbyi* et *V. piscinalis*). La concentration réelle utilisée pour interpréter les tests correspond à la moyenne de ces trois valeurs ;
- en fin d'essai seulement lors de bioessais de durée inférieure à un mois.

Cette analyse permet de connaître le rendement de l'enrichissement en contaminant ainsi que le profil de partage du toxique dans chaque phase du milieu d'exposition. Les rendements obtenus sont indépendants de la concentration nominale testée : il existe une relation linéaire entre la concentration nominale et la concentration réelle en zinc dans les différentes phase du milieu d'exposition (Fig. 58).

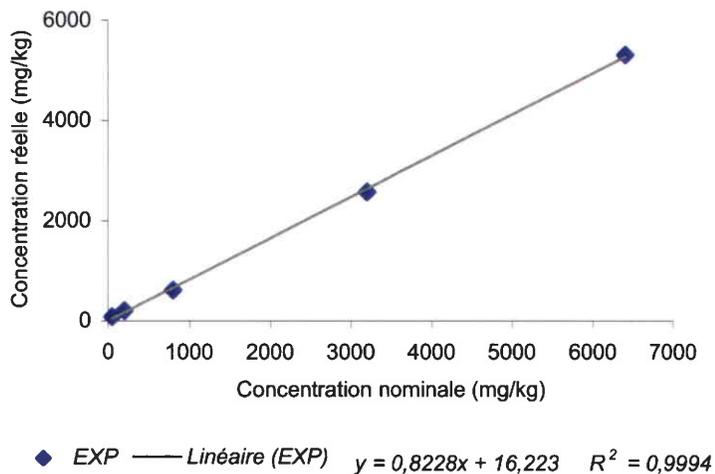


Figure 58. Relation entre la concentration nominale et la concentration en zinc mesurée en fin d'essai dans le sédiment contaminé au laboratoire (données issues des pré-tests de survie pour *Valvata (Cincinna) piscinalis*).

Le rendement moyen, calculé sur tous les enrichissements réalisés durant la thèse, est de 75,8 % (IC_{95%} : [62,7 ; 78,8]). Ce rendement est satisfaisant aux vues des rendements maximaux possibles avec la méthode d'enrichissement utilisée (90% sur sable de Fontainebleau (Péry, 2003) et 65 % sur le sédiment de Port-Galland dans de précédents essais réalisés avec du cuivre par Péry *et al.* (2004b).

La variabilité autour de ce rendement est de l'ordre de 11%. Les protocoles standardisés préconisent une variabilité de l'ordre de 5%, mais autorisent une variabilité inférieure ou égale à 20 % (ASTM, 2000). Nous jugeons donc que la répétabilité de rendements au cours de cette thèse est satisfaisante.

Le suivi de la concentration en zinc dans le milieu lors des bioessais chroniques (202 jours) montre que la concentration totale en zinc dans le sédiment ne varie pas significativement au cours du test. Cependant, nous n'avons pas d'informations quant à l'évolution de sa biodisponibilité. Nous supposons donc que la concentration biodisponible est constante au cours du test sans avoir vérifié cette hypothèse.

3.3. Voies de contamination des organismes

Les enceintes expérimentales contiennent de l'eau propre et du sédiment contaminé, dans les proportions définies au chapitre III. Ce système d'exposition est basé sur l'hypothèse que le zinc susceptible de contaminer les organismes benthiques se trouve principalement sous forme particulaire dans le sédiment et sous forme dissoute dans l'eau interstitielle.

La colonne d'eau n'est pas considérée comme une voie d'exposition importante pour nos espèces, car leur durée de contact avec ce compartiment est courte ou nulle (voir chapitre III).

La nourriture pour poisson, qui constitue la source majeure d'alimentation des organismes, n'est pas contaminée par le zinc. En revanche, la nourriture issue du sédiment (matière organique et flore bactérienne) est potentiellement contaminée. Cette source de contamination n'est pas prise en compte dans notre mesure de la concentration en zinc dans le sédiment. Nous ne pouvons donc pas distinguer quelle est la part de la contamination acquise *via* la nourriture (zinc en phase particulaire), par rapport à la part acquise par la respiration et le contact tégumentaire (zinc en phase dissoute).

3.4. Tests de toxicité

Nous décrivons brièvement ici les tests de toxicité réalisés (durée et concentrations testées) afin de déterminer l'effet du zinc sur les paramètres du cycle de vie des trois espèces étudiées. Tous les essais ont été réalisés suivant les méthodes présentées au chapitre III. Rappelons seulement que les bioessais ont été réalisés à une température de 21°C et que les organismes ont été nourris *ad libitum* pendant les tests.

3.4.1. Tests réalisés chez *Chironomus riparius*

Les œufs, les larves de 1^{er} stade et les nymphes vivent dans la colonne d'eau. Par ailleurs, les adultes sont aériens. Ainsi, les organismes ne sont pas en contact avec le sédiment contaminé durant ces phases du développement.

La concentration en zinc dans la colonne d'eau (après équilibration avec le sédiment contaminé) n'atteint pas des niveaux toxiques pour ces organismes (résultats de tests en eau seule, non présentés dans ce manuscrit). Nous considérons donc que le zinc introduit dans notre système expérimental n'a pas d'effet sur ces stades de développement. Les tests de toxicité ne sont donc réalisés que sur les stades larvaires benthiques (larves de second, troisième et quatrième stade).

La sensibilité des chironomes aux contaminants varie selon le stade larvaire étudié, en lien avec les modifications anatomiques et physiologiques survenant au cours du développement des larves (Ingersoll *et al.*, 1995 ; Watts et Pascoe, 1996 ; Naylor et Howcroft, 1997). Les effets du zinc sur la survie et la croissance ont donc été étudiés grâce à trois bioessais différents, chaque essai correspondant à l'étude d'un stade larvaire. Les effets sur l'émergence et la reproduction ont été évalués grâce à un seul test. Les caractéristiques techniques des tests sont présentées dans le tableau XX.

Tableau XX. Tests de toxicité réalisés afin de déterminer l'effet du zinc sur les paramètres du cycle de vie de *Chironomus riparius*

<i>Critère d'effet</i>	<i>Survie & Croissance</i>	<i>Emergence & Reproduction</i>
Tests réalisés	1 essai / stade larvaire (= 3 essais)	1 essai démarré au 3 ^{ème} stade
Age en début de test (jours)	2, 4, 6	4
Durée du test (jours)	2, 2, 4	26
Gamme de concentrations mesurées (mg zn/kg de sédiment sec)	52, 523, 953, 1382, 1794, 2157	52, 300, 523, 953, 1382, 1794
Apport alimentaire (mg de Tétramin®/ind./jour ouvré)	0,6	0,6

3.4.2. Tests réalisés chez *Valvata (Cincinna) piscinalis*

Chez *V. piscinalis*, les œufs sont pondus dans la colonne d'eau, et les embryons se nourrissent de vitellus : ils ne sont pas en contact avec le sédiment ou avec la nourriture contaminée. La concentration en zinc dans la colonne d'eau (après équilibration avec le sédiment contaminé) n'atteint pas des niveaux toxiques pour les embryons (résultats de test en eau seule, non présentés dans ce manuscrit). Nous considérons donc que le zinc ne provoque pas d'effet sur ce stade de développement.

Les nouveau-nés peuvent être utilisés dès la naissance pour les bioessais. En pratique, nous utilisons des organismes de taille supérieure ou égale à 1 mm, afin de pouvoir facilement les retrouver dans le sédiment dès le début du test. Ces organismes proviennent de la même cohorte et sont élevés jusqu'à atteindre 1 mm dans de l'eau d'élevage (14 jours à 21°C avec apport alimentaire *ad libitum* – voir annexe 5). Ces organismes sont utilisés afin de réaliser les tests de survie juvénile (étude des effets aigus du zinc), ainsi que les tests de croissance et de reproduction (étude des effets chroniques du zinc impliquant l'exposition pendant le stade juvénile en entier et une partie du stade adulte).

Afin de vérifier si les effets potentiellement observés sur la reproduction correspondent ou non à des effets indirects sur la croissance des juvéniles, nous réalisons un second test de reproduction démarré avec des organismes pubères (de taille moyenne proche de 3 mm). Ces

organismes sont prélevés dans l'élevage au moyen d'un tamisage sélectif (ouverture des tamis entre 3 et 3,5 mm). Les organismes sont ensuite répartis de telle sorte que la biomasse finale du lot d'individus soit homogène. Nous procédons de la même façon pour démarrer les tests de survie des adultes. Les caractéristiques techniques des tests sont présentées dans le tableau XXI.

Tableau XXI. Tests de toxicité réalisés afin de déterminer l'effet du zinc sur les paramètres du cycle de vie de *Valvata (Cincinna) piscinalis*

Critère d'effet	Survie		Croissance		Reproduction
	CT ¹ juvéniles	CT adultes	LT ² juvéniles	LT juvéniles	CT adultes
Taille souhaitée en début de test (mm)	1	3- 3,5	1	1	3-3,5
Durée du test (jours)	28	28	56	202	49
Nombre d'observations	3	3	3	22	7
Date de première observation (jour du test)	14	14	21	48	7
Intervalle entre les observations (jours)	7	7	14	7	7
Gamme de concentrations mesurées (mg Zn/kg de sédiment sec)	60, 1202, 1468, 1716, 2339, 2664.	64, 846, 1540, 2460, 3181, 3764.	60, 200, 624, 1217, 2417.	61, 228, 403, 516, 725, 993, 1367.	41, 786, 1157, 1529, 1848.
Apport alimentaire (mg Tétramin®/ind./jour ouvré)	0,4	0,6	0,4	0,4	0,6

¹ court terme

² long terme

Nous avons choisi d'étudier les effets du zinc sur la survie, la croissance et la reproduction des organismes grâce à l'utilisation de modèles mécanistiques. Ces modèles permettent de prédire les effets attendus au cours du temps en fonction de la concentration en toxique dans le milieu à partir d'hypothèses toxico-cinétiques. Afin de paramétrer ces modèles, nous avons donc besoin, pour chaque concentration testée, d'informations sur l'évolution de la réponse biologique des organismes au cours de l'essai. Pour chaque essai, nous réalisons donc au moins trois arrêts qui correspondent à des durées d'expositions croissantes. A chacun de ces arrêts, nous évaluons la réponse biologique et la concentration interne :

- de 30 organismes par concentration (3 réplicats de 10 organismes) pour les tests de survie et de croissance ;
- de 60 organismes par concentration (6 réplicats de 10 organismes) pour les tests de reproduction : nous doublons le nombre de réplicats car la variabilité autour de la fécondité individuelle moyenne est plus élevée que la variabilité autour de la survie et de la croissance (voir les graphiques obtenus en conditions témoins au chapitre III).

Dans le cas des tests de survie et de croissance, les observations sont indépendantes : nous mesurons des organismes différents à chaque arrêt de test. Dans le cas des tests de reproduction, les observations ne sont pas indépendantes : nous suivons la fécondité du même lot d'organismes au cours du temps. Il est impossible de travailler sur des lots indépendants pour des raisons pratiques : en effet, il nous faudrait 6468 lots différents de dix organismes afin d'évaluer la reproduction de façon hebdomadaire pendant 202 jours pour 7 concentrations. Nous tenons compte du fait que les données ne sont pas indépendantes lors de nos tests statistiques.

3.4.3. Tests réalisés chez *Branchiura sowerbyi*

Contrairement à *C. riparius* et *V. piscinalis*, *B. sowerbyi* pond ses œufs dans le sédiment. Il est donc nécessaire de déterminer les effets du zinc sur la survie des embryons. Ceci a été réalisé en exposant des cocons (prélevés dans l'élevage) aux sédiments contaminés pendant 28, 35 et 42 jours. Nous réalisons trois dates d'arrêt afin de tenir compte d'un éventuel retard à l'éclosion des œufs exposés au zinc.

Les effets du zinc sur la survie et la croissance des juvéniles ont été étudiés grâce à un même essai de 28 jours. Chez les adultes, ces effets ont été étudiés grâce à un essai de 42 jours. Les effets sur la reproduction ont été évalués grâce à deux tests : un premier test a été réalisé en exposant les organismes depuis leur naissance et un second test a été réalisé en exposant uniquement les adultes. Ces deux tests permettent de voir si les effets sur la reproduction correspondent à une conséquence indirecte des effets sur la croissance des juvéniles. Les caractéristiques techniques de ces tests sont présentées dans le tableau XXII.

Tableau XXII. Tests de toxicité réalisés afin de déterminer l'effet du zinc sur les paramètres du cycle de vie de *Branchiura sowerbyi*

Critère d'effet	Survie & Croissance			Reproduction	
	CT ¹ embryon	CT juvéniles	CT adultes	LT ² juvéniles	CT adultes
Tests réalisés					
Durée totale (jours)	42	28	42	179	42
Nombre d'observations	3	3	3	3	3
Date de première observation (jour du test)	28	14	28	123	21
Intervalle entre les observations (jours)	7	7	7	28	7
Gamme de concentrations mesurées (mg Zn/kg de sédiment sec)	60, 307, 551, 826, 1133, 1821, 1909, 2315	65, 1307, 1819, 2325, 2789, 2961	60, 307, 551, 826, 1133, 1821, 1909, 2315	72, 409, 1050, 728, 1362, 1651	60, 307, 551, 826, 1133, 1821, 1909, 2315
Apport alimentaire (mg de Tétramin®/ind./jour ouvert)	0	1,6	3,2	1,6	3,2

¹ court terme

² long terme

Comme pour *V. piscinalis*, la concentration interne en zinc et la réponse biologique des organismes ont été régulièrement évaluées durant les tests. La réalisation d'une observation nécessite 3 réplicats de 10 organismes (6 dans le cas des tests de reproduction). Toutes les observations sont indépendantes.

3.5. Méthodologie de dosage de la concentration interne en zinc

Afin d'estimer les capacités et les cinétiques de bioaccumulation chez nos trois espèces, nous avons suivi l'évolution de la concentration interne en zinc lors des tests de toxicité chronique.

Pour *C. riparius*, le dosage du zinc a été réalisé sur les larves de 4^{ème} stade issues des tests de croissance après 2 jours et 4 jours d'exposition. Ce dosage n'a pas été réalisé avec les larves de 2^{ème} et 3^{ème} stades car un réplicat de 10 organismes séchés représente une biomasse trop faible (< 5 mg) pour pouvoir quantifier le zinc. Pour réaliser ce dosage, il faudrait augmenter le nombre de réplicats mis en place, ce qui résulte en une manipulation trop lourde à réaliser dans notre laboratoire.

Pour *V. piscinalis*, le dosage du zinc a été réalisé sur les organismes issus du test de croissance après 28, 35 et 56 jours d'exposition. La fraction dosée correspond à l'animal entier (corps mou et coquille).

Pour *B. sowerbyi*, le dosage du zinc a été réalisé sur les organismes provenant du test de reproduction après 123, 151 et 173 jours d'exposition.

Les organismes sont retirés du milieu contaminé et introduits dans de l'eau propre pour une période de 24 h. Ceci permet d'évacuer le sédiment contaminé présent dans leur tube digestif, et évite ainsi un biais dans la mesure de la concentration interne en zinc. Chez *C. riparius* et *V. piscinalis*, les organismes d'un même réplicat sont rassemblés dans un seul bécher pendant ces 24 h. Chez *B. sowerbyi*, l'absence de sédiment provoque une réaction d'agrégation des individus qui se solde par la mort des organismes. Afin d'éviter cette réaction, les organismes d'un même réplicat sont isolés dans des tubes à essais. Aucune mortalité n'est observée dans les tubes individuels après 24 h.

Après cette phase de dépuración, les organismes sont introduits pendant 5 minutes dans un bain d'EDTA (solution à 1g/l) afin de désorber le contaminant présent à la surface de leur tégument ou de leur coquille (Péry *et al.*, 2005). Ils sont ensuite tués de façon quasi-instantanée par congélation (-80°C, 24 h) puis séchés en lyophilisateur (-60°C ; 0,420 mB ; 2 h pour *C. riparius* et *V. piscinalis* ; 6 h pour *B. sowerbyi*). Leur poids sec est évalué grâce à une balance de précision au dixième de milligramme près.

Le résidu sec est alors digéré en ambiance acide selon le protocole suivant. Les organismes secs sont placés dans des tubes en verre résistants à la pression et à la chaleur. La minéralisation est réalisée grâce à l'ajout de 1 ml d'acide nitrique supra-pur, concentré à 65%. Les tubes sont hermétiquement fermés et chauffés grâce à un concentrateur d'échantillons (80°C, 10 h).

Après refroidissement des tubes, le digestat est repris avec 3 fois 5 ml d'eau ultra-pure sous agitation, puis dilué à l'eau ultra-pure (qsp 20 ml). Les échantillons sont stockés en chambre froide jusqu'à leur analyse par spectroscopie d'absorption atomique à four graphite (limite de détection du zinc : 0,05 mg/l).

L'ensemble du matériel utilisé pour ces manipulations est soigneusement nettoyé dans un bain d'acide nitrique dilué à 10% (24 h de trempage puis rinçage à l'eau déminéralisée) avant chaque utilisation.

Trois blancs acides (20 ml) et 3 réplicats de matériel de référence (hépatopancréas de homard : TORT 2® (NRC, Canada), 30 mg) sont réalisés lors de chaque minéralisation. Le dosage de ces échantillons a mis en évidence que la quantité de zinc retrouvée dans les blancs acides est inférieure au seuil de détection. Ceci montre que notre protocole expérimental de minéralisation ne génère pas de contamination des échantillons par du zinc provenant de l'air, de l'eau, de l'acide ou des instruments utilisés durant la minéralisation des organismes.

Par ailleurs, la quantité de zinc retrouvée dans les échantillons de matériel de référence correspond à la valeur attendue d'après la composition chimique de ce matériel : le rendement moyen des minéralisations effectuées au laboratoire varie entre 94% et 100%. Ce rendement permet de valider notre protocole de dosage de la concentration interne en zinc par rapport aux critères de qualité utilisés en écotoxicologie : en effet, le seuil d'acceptabilité des rendements de minéralisation est communément fixé à 95 % (Sokolowski *et al.*, 2003).

4. EVALUATION DE LA TOXICITE AU NIVEAU DE L'INDIVIDU : APPLICATION EXPERIMENTALE

4.1. Effets du zinc chez *Chironomus riparius*

4.1.1. Qualité globale des données expérimentales

La survie moyenne chez les témoins vaut respectivement:

- 87%, 90% et 97% lors des tests de survie et de croissance (expositions aiguës, réalisées pour les second, troisième et quatrième stades larvaires) ;
- 90% lors du test de reproduction (exposition chronique, du troisième stade larvaire aux adultes).

Ces taux de survie témoins se situent au-dessus du seuil d'acceptabilité de 70% préconisé par les protocoles standards américains (US EPA, 1994 ; ASTM, 2000) et européens (OECD, 1998). Les protocoles de bioessais utilisés nous permettent donc d'obtenir des données fiables. Notons que pour un même essai à court terme, cette survie moyenne témoin augmente du second au quatrième stade larvaire. Ce résultat confirme de nombreuses d'études qui ont démontré que la sensibilité du chironome aux facteurs abiotiques diminue lors de son développement larvaire (Fargasova, 2001).

4.1.2. Cinétique du toxique

La concentration interne en zinc chez les larves de quatrième stade augmente linéairement avec la concentration d'exposition (Fig. 59). Ce résultat permet de valider l'utilisation du modèle de toxico-cinétique linéaire à un compartiment pour prédire l'évolution de la concentration interne des organismes exposés. Ces résultats confirment ceux de Timmermans *et al.* (1992) et Péry *et al.* (2003a) chez *C. riparius* et Harrahy et Clements (1997) chez *C. tentans*.

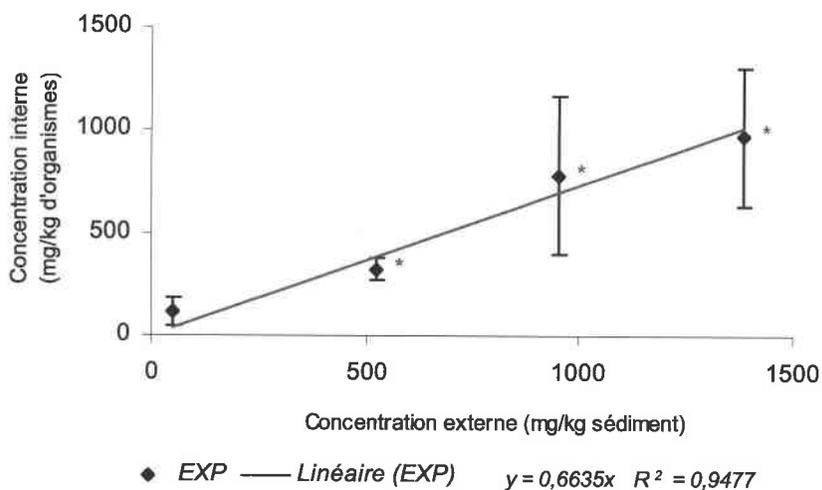


Figure 59. Bioaccumulation du zinc présent dans le sédiment contaminé chez les larves de chironome (quatrième stade) après 4 jours d'exposition (et IC 95%). Les différences significatives par rapport aux témoins sont signalées par un astérisque.

D'après les mesures de concentration interne réalisées sur les larves de quatrième stade, la cinétique de contamination des organismes par le zinc est rapide : la concentration interne en zinc a déjà atteint son plateau à 48 h. Ces résultats sont confirmés par notre modèle toxico-cinétique. En effet, d'après les estimations des taux d'élimination k_e (>2 dans tous les essais réalisés), la concentration interne est à l'équilibre dès 24 h d'exposition pour tous les stades larvaires étudiés. Concrètement, ceci signifie que la cinétique de contamination des larves par le zinc est rapide.

Le facteur de bioconcentration moyen des larves de quatrième stade correspond au rapport entre la concentration interne (normalisée par la valeur mesurée chez les témoins) et la concentration externe. Il est estimé à 0,56 (IC 95% [0,39 ; 0,74]).

4.1.3. Effets comportementaux du zinc chez le chironome

Dès le second stade larvaire, le comportement d'enfouissement peut être considéré comme un bon indicateur du niveau de stress de l'organisme (Péry, 2003). Ce comportement est lié à la fois à la survie de la larve, le fourreau le protégeant des éventuels prédateurs, et à sa croissance : les larves ne se nourrissent pas tant qu'elles ne disposent pas de ce fourreau protecteur (Péry *et al.*, 2003b).

Dans nos expériences sur sédiment sain, l'enfouissement des larves dans le substrat a lieu en quelques minutes, dès leur introduction dans l'enceinte de test. Ce comportement est modifié en présence de sédiment contaminé pour les plus fortes concentrations testées (1794 et 2157 mg/kg). Les larves introduites dans la colonne d'eau s'y agitent, évitant le contact avec le substrat. Ce comportement d'évitement du substrat suggère une éventuelle capacité des organismes à détecter une contamination élevée au sein du substrat puis à se disperser. Ce comportement d'évitement a aussi été mis en évidence lors de l'exposition de *C. riparius* au cuivre (Ducrot *et al.*, 2002), ainsi que lors de l'exposition de *C. tentans* au zinc et au cadmium (Wentzel *et al.*, 1977).

La tentative de dispersion (qui se traduit par la « nage » dans les enceintes d'essai) dure quelques heures, après quoi les chironomes se réfugient quand même dans un fourreau sédimentaire. Durant la dispersion, les larves sont particulièrement exposées à la prédation. La mortalité générée par le jeu de la prédation peut donc être considérée comme un effet indirect de la présence du zinc dans le sédiment. Cette mortalité indirecte n'est pas prise en compte dans nos modèles de survie.

4.1.4. Effets du zinc sur la survie

La présence de zinc dans le sédiment provoque une diminution linéaire des taux de survie des larves de second stade exposées par rapport aux témoins. Cette diminution n'est significative que lorsque la concentration en zinc dans le milieu dépasse 1794 mg/kg. Cette diminution est relativement faible puisque nous ne relevons que 23 % de survie en moins par rapport aux témoins dans la plus forte concentration testée (Fig. 60).

Aux concentrations testées, nous observons aussi une diminution linéaire (non significative) de la survie au troisième stade (Fig. 61). Cette diminution est de l'ordre de 29 % dans la plus forte concentration testée par rapport aux témoins. D'après ces résultats, la réponse biologique à la présence de zinc est similaire au second et au troisième stade.

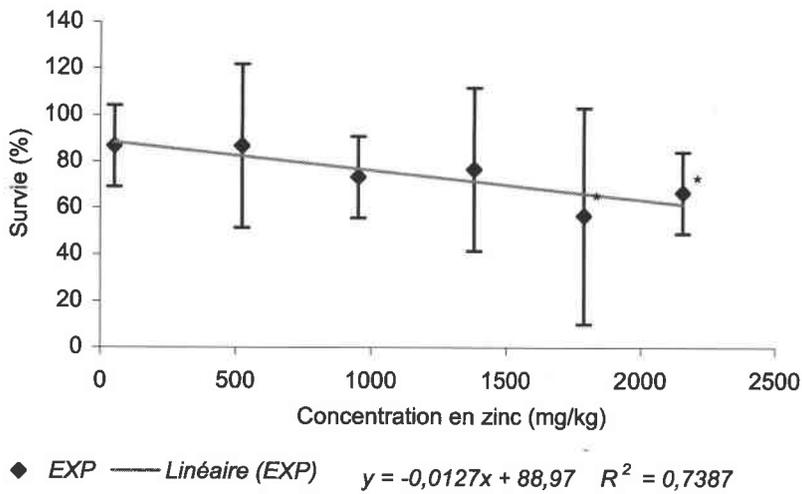


Figure 60. Relation entre la survie moyenne des larves de second stade (et IC 95%) et la concentration en zinc dans les sédiments après 2 jours d'exposition. Les différences significatives par rapport au témoin sont signalées par un astérisque.

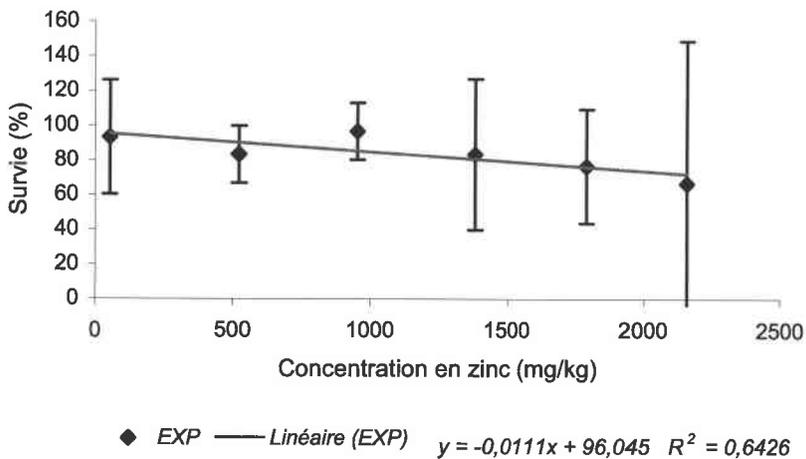


Figure 61. Relation entre la survie moyenne des larves de troisième stade (et IC 95%) et la concentration en zinc dans les sédiments après 2 jours d'exposition.

Nous n'observons pas de diminution de la survie moyenne des larves de quatrième stade après deux jours d'exposition aux concentrations testées. Cette moindre sensibilité à court terme du quatrième stade larvaire est communément admise chez *C. riparius* pour divers métaux (voir Naylor et Howcroft (1997) pour une revue).

Concrètement, les effets provoqués par le toxique sur les larves de chironomes sont faibles, car bien que la concentration maximale en zinc testée soit très élevée (2157 mg/kg)¹¹ :

- la présence de zinc n'affecte pas la survie les larves de quatrième stade à court terme ;

- pour les stades qui subissent une réduction de survie, cette réduction est faible : en effet, la diminution maximale de survie observée n'est que de 29% par rapport aux témoins à 2157 mg/kg. Cette valeur est du même ordre de grandeur que la variabilité expérimentale pour la survie des témoins dans notre laboratoire (résultats de la carte de contrôle, non présentés dans la thèse).

Ces données sont utilisées afin de paramétrer notre modèle d'effets sur la survie. Les paramètres d'effets à estimer sont la mortalité naturelle journalière (k), le seuil de toxicité du zinc sur la survie (CSE_s) ainsi que la gravité des effets pour chaque stade larvaire (b) (estimations présentées dans le tableau XXIII). La survie des larves étant peu affectée par le zinc, notre jeu de données ne nous permet pas d'estimer les intervalles de confiance à 95% pour ces paramètres.

Tableau XXIII. Estimations des paramètres du modèle de survie (et IC 95%), pour les larves de second et troisième stades exposées aux sédiments contaminés par le zinc.

	b	CSE_s	k	% d'estimation erronées ¹	SCE^2
2 ^{ème} stade	0,00010	413	0,070	9	257
3 ^{ème} stade	0,00025	863	0,053	7	151

¹. par rapport au nombre d'estimations réalisées

². somme des carrés des écarts entre la prédiction et la donnée

Connaissant ces paramètres, nous pouvons calculer la survie prédite par le modèle en fonction de la concentration en zinc dans le milieu. Toutes les prédictions fournies par notre modèle de survie appartiennent à l'intervalle de confiance de la donnée (Fig. 62). Ceci signifie que le modèle produit ne produit aucune estimation erronée.

¹¹ A titre d'indication, les concentrations en zinc moyennes sur le terrain sont de l'ordre de 130 mg/kg dans le bassin Rhône-Méditerranée-Corse et 294 mg/kg) dans le bassin Artois-Picardie (Garric, 2002).

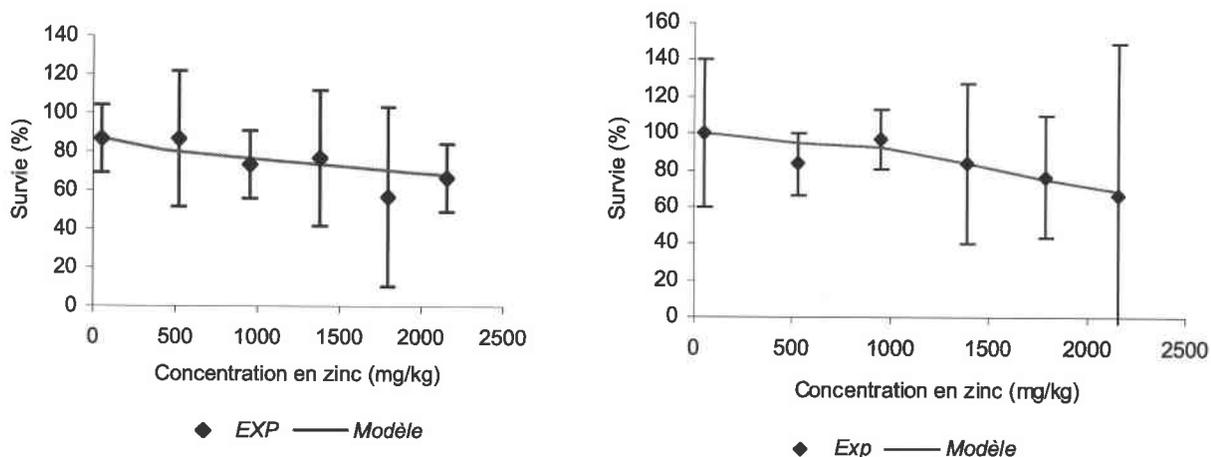


Figure 62. Survies moyennes des larves de second et troisième stades (et IC_{95%}) après 2 jours d'exposition aux sédiments contaminés par le zinc : comparaison des estimations fournies par nos modèles (lignes) aux données (points).

Les écarts entre les prédictions du modèle et les données sont relativement faibles (voir tableau XXIII). En effet, la racine de la somme des carrés des écarts entre le nombre de survivants prédits par le modèle et le nombre de survivants observés dans les tests correspond à une erreur respective de 16 et 12 survivants de 2^{ème} et de 3^{ème} stades sur les 180 organismes exposés. D'après le test de Fisher, cette erreur n'est pas significative ($p = 0,051$ au 2^{ème} stade et $p = 0,48$ au 3^{ème} stade). Ceci montre que notre modèle est capable de prédire la survie des larves de 2^{ème} et 3^{ème} stades de façon fiable. Nous pouvons donc l'utiliser pour prédire les effets du zinc sur la survie des larves de chironomes lors de notre étude des effets au niveau de la population.

4.1.5. Effets du zinc sur la croissance des larves

La taille des larves après deux jours d'exposition diminue significativement par rapport aux témoins lorsque la concentration en zinc dans le sédiment dépasse (Fig. 63) :

- 953 mg/kg pour les organismes de second stade ;
- 1382 mg/kg pour les organismes de troisième stade ;
- 953 mg/kg pour les organismes de quatrième stade.

D'après ces résultats, les effets du zinc se manifestent pour des concentrations relativement similaires pour les trois stades larvaires testés.

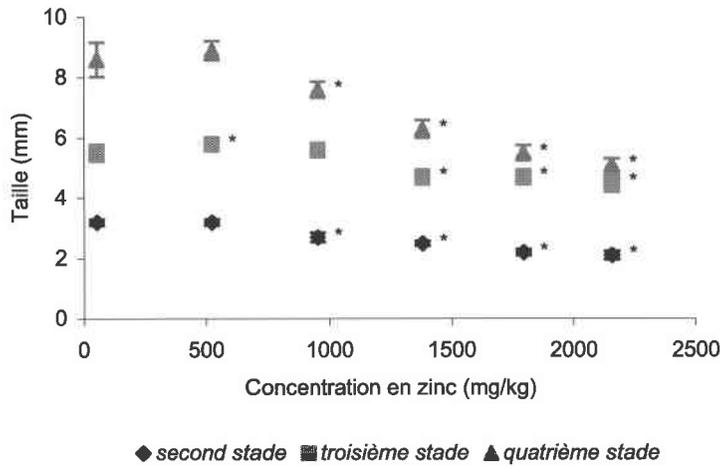
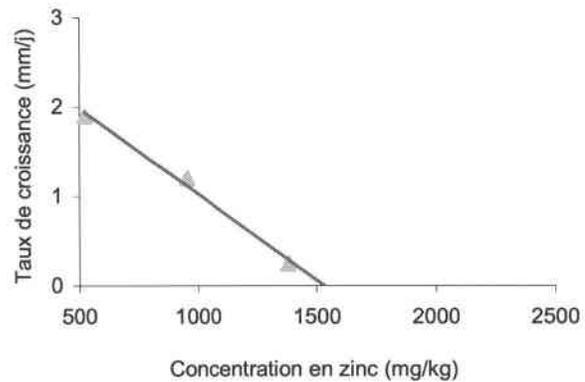
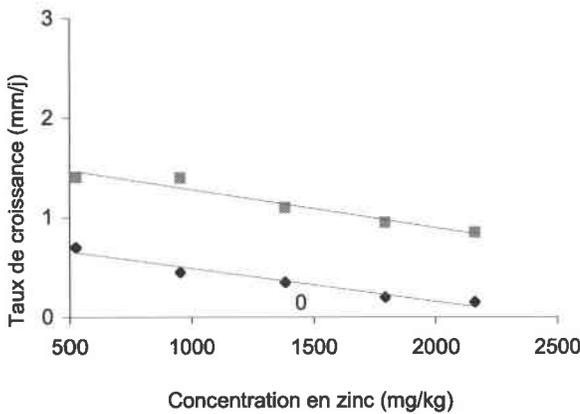


Figure 63. Effets du zinc sur la taille moyenne des larves de chironomes (et IC_{95%}) après 2 jours d'exposition aux sédiments contaminés. Les différences significatives par rapport au témoin sont signalées par un astérisque.

Le taux de croissance journalier spécifique de chaque stade larvaire diminue linéairement par rapport aux témoins lorsque la concentration en toxique augmente (Fig. 64). Le zinc engendre donc une diminution de la vitesse de croissance, qui se traduit par un allongement de la durée de tous les stades larvaires.



◆ *second stade* $y = -0,0004x + 1,7415$ $R^2 = 0,9723$

■ *troisième stade* $y = -0,0003x + 0,8198$ $R^2 = 0,9556$

▲ *quatrième stade* $y = -0,0019x + 2,9465$ $R^2 = 0,9923$

Figure 64. Evolution du taux de croissance journalier des larves de chironomes en fonction de la concentration en zinc dans le sédiment (pour des concentrations situées dans la gamme qui provoque un effet significatif sur la croissance des larves).

La gravité des effets du zinc sur la croissance (représentée par la pente de la droite de régression) est similaire au second et au troisième stades. Ces effets s'aggravent au quatrième stade. Ceci indique concrètement que, à concentrations égales, le retard de croissance enclenché au deuxième stade se maintient avec la même intensité au troisième stade mais s'aggrave au quatrième stade. Pour la plus forte concentration testée, le taux de croissance des larves de quatrième stade est réduit de 85% par rapport aux témoins : le zinc exerce donc un effet délétère très marqué sur la croissance larvaire.

Ces données ont été utilisées afin d'estimer les paramètres des modèles d'effets du zinc sur la croissance des larves (CSE_c et b), ainsi que leurs intervalles de confiance à 95%. Les estimations obtenues sont présentées dans le tableau XXIV.

Tableau XXIV. Estimation des paramètres d'effets des modèles de croissance des larves de chironome (et $IC_{95\%}$)

Stade larvaire	Modèle	b	CSE_c	% d'estimations erronées ³	SCE ⁴
II	ACC ¹	0,002]0,0015 ; 0,0025[695]560 ; 785[1	0,05
	DA ²	0,00047]0,0004 ; 0,0005[360]180 ; 500[0	0,02
III	ACC	0,0006]0,0003 ; 0,0008[900]550 ; 1100[0	0,18
	DA	0,0003]0,0001 ; 0,0004[725]700 ; 950[1	0,25
IV	ACC	0,012]0,005 ; 0,025[900]800 ; 950[0	1,2
	DA	0,001]0,0005 ; 0,005[U]0,008 ; 0,01[500]400 ; 950[0	1,1

1. modèle supposant une augmentation des coûts de croissance

2. modèle supposant une diminution de la quantité de nourriture assimilée

3. par rapport au nombre d'estimations réalisées

4. somme des carrés des écarts entre la prédiction et la donnée

Nos deux modèles diffèrent dans la façon de prédire les effets toxiques. Concrètement, le modèle augmentation des coûts de croissance (ACC) suppose que le seuil de tolérance des larves au zinc est relativement élevé, et prévoit une forte diminution du taux de croissance journalier une fois ce seuil dépassé. Le modèle diminution de la quantité d'énergie (DA)

prévoit un seuil de tolérance plus faible, mais des effets moins graves que le modèle ACC une fois que ce seuil est dépassé.

Afin de choisir quel modèle nous allons utiliser pour prédire les effets du zinc sur la croissance des larves de chironomes lors de notre étude des effets au niveau de la population, nous évaluons la pertinence des estimations obtenues pour les paramètres CSE_c et b , puis étudions la fiabilité des prédictions obtenues grâce au modèle de croissance par rapport aux données.

Les concentrations sans effet sur la croissance (CSE_c) prédites par le modèle ACC ne diffèrent pas significativement entre les stades larvaires. Le modèle DA prévoit une CSE_c significativement plus faible pour les organismes de second stade que pour les organismes plus âgés. Ce résultat ne corrobore pas les données expérimentales, puisque les NOECs sont équivalentes au second et au quatrième stade.

Le paramètre b représente la gravité des effets survenant après dépassement de la CSE_c . Nos deux modèles prédisent que les effets attendus au quatrième stade larvaire sont significativement plus graves que les effets attendus aux stades précédents. Ce résultat confirme l'analyse présentée en figure 64. Le modèle ACC prévoit que les effets observés au troisième stade larvaire sont plus graves que les effets observés au second stade : ce résultat ne corrobore pas les données.

Les deux modèles décrivent de façon fiable les courbes concentration-réponse des larves de chironome au zinc pour tous les stades larvaires étudiés (Fig. 65. et 66.).

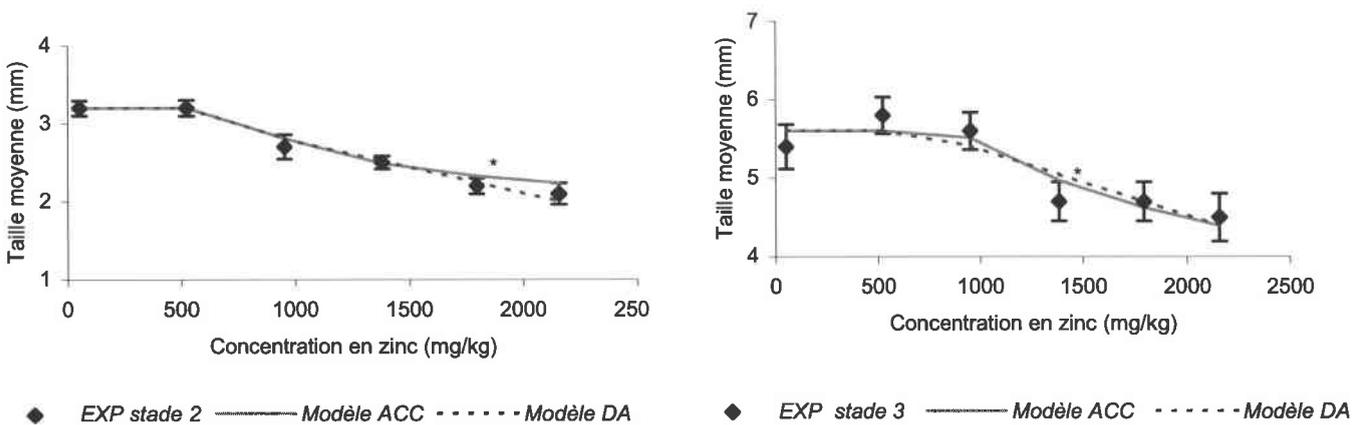


Figure 65. Effets du zinc sur la croissance des larves de second et de troisième stades exposées pendant 2 jours aux sédiments contaminés (et IC 95%). Les différences significatives entre les données (points) et les prédictions (lignes) sont signalées par un astérisque.

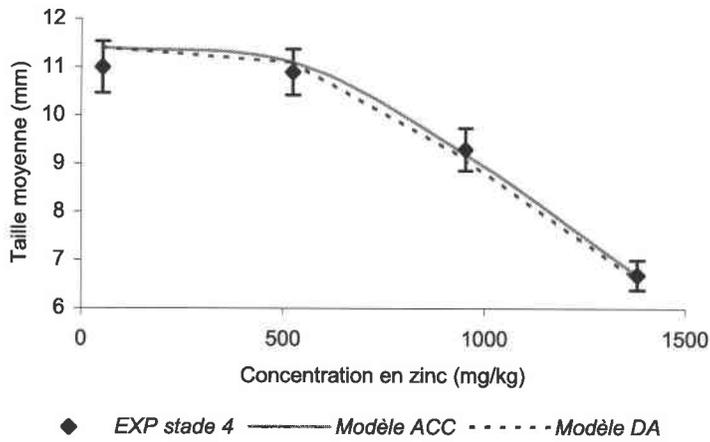


Figure 66. Effets du zinc sur la croissance des larves de quatrième stade après 5 jours d'exposition aux sédiments contaminés (et IC 95%) : comparaison des estimations fournies par nos modèles (lignes) aux données (points).

La fréquence de production d'estimations erronées¹² est équivalente pour les deux modèles proposés (voir tableau XXIV). La fiabilité des prédictions est évaluée en mesurant la somme des carrés des écarts (SCE) entre les modèles et les données. En considérant l'erreur commise par les modèles sur l'étude de l'ensemble des stades larvaires, les racines des SCE obtenues avec nos deux modèles sont équivalentes. Elles correspondent à une erreur respective de 1,19 et 1,17 mm pour le modèle ACC et le modèle DA. D'après le test de Fisher, cette erreur est non significative dans les deux cas ($p = 0,47$ pour le modèle DA et $p = 0,41$ pour le modèle ACC). D'après ces résultats les deux modèles sont donc aussi fiables l'un que l'autre pour décrire les effets du zinc sur la croissance des larves. Il est impossible de conclure quant au mécanisme d'effet toxique en nous basant seulement sur les résultats des tests de croissance.

¹² rapport entre le nombre d'estimations significativement différentes de la donnée et le nombre d'estimations réalisées

4.1.6. Effets du zinc sur l'émergence

Effets sur l'émergence

Le nombre d'émergents dans les lots exposés diminue significativement par rapport aux témoins lorsque la concentration en zinc dépasse 953 mg/kg (Fig. 67). La CE_{50} estimée à partir de ces données vaut 1588 mg/kg ($IC_{95\%}$ [1529 ; 1638]).

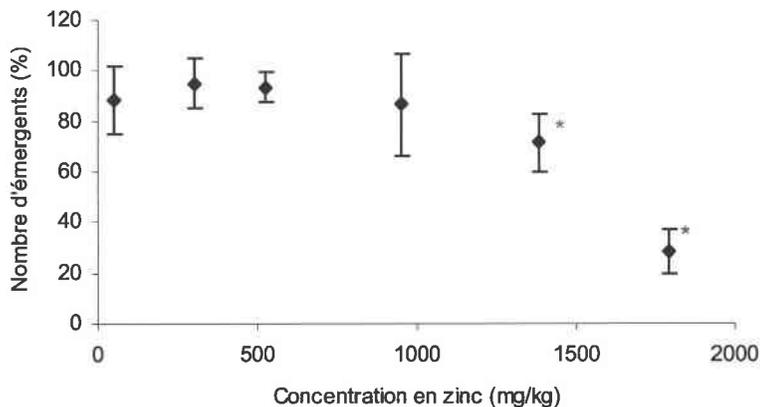


Figure 67. Nombre moyen d'émergents (et $IC_{95\%}$) en fonction de la concentration en zinc dans le milieu pour une exposition des larves en début de troisième stade larvaire. Les différences significatives par rapport au témoin sont signalées par un astérisque.

Dans notre expérience, nous n'avons pas observé de mortalité chez les nymphes. La diminution du nombre d'émergents est donc liée à une incapacité des larves de quatrième stade à enclencher le processus de nymphose. Ces résultats confirment ceux de Timmermans *et al.* (1992). Il existe donc une mortalité larvaire à long terme (exposition supérieure à 2 jours) au quatrième stade. Le nombre de larves survivant à l'issue du quatrième stade est réduit de 68% par rapport aux témoins pour une concentration de 1794 mg/kg.

Par ailleurs, nous observons un retard à l'émergence par rapport aux témoins, aussi bien chez les mâles que chez les femelles exposés au zinc (Fig. 68).

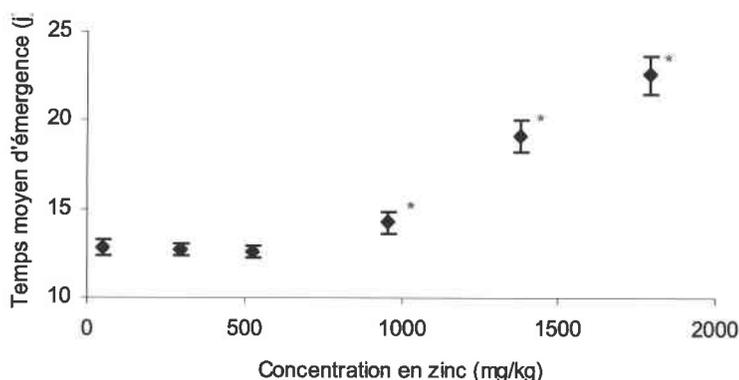


Figure 68. Temps moyen d'émergence (et $IC_{95\%}$) des larves de chironome exposées à des sédiments contaminés en zinc durant les troisième et quatrième stades larvaires. Les différences significatives par rapport au témoin sont signalées par un astérisque.

Ce retard est significatif lorsque la concentration en zinc dépasse 523 mg/kg, concentration à partir de laquelle se manifestent les effets sur la croissance. Le retard à l'émergence est donc une conséquence des effets du zinc sur la croissance des larves.

Ce retard est plus important chez les femelles que chez les mâles : l'émergence des femelles exposées survient entre 2,5 et 3,2 jours après l'émergence des mâles, alors que ce décalage est de 1,5 jours en moyenne chez les témoins. La probabilité de survie des mâles est de 3 à 4 jours. Ainsi, cette augmentation du décalage d'émergence entre mâles et femelles génère une diminution de leur probabilité de rencontre, et donc de leur probabilité de reproduction. La probabilité de fécondation des femelles en fonction de la concentration en zinc est décrite dans le tableau XXV. Pour les concentrations générant un retard de la croissance des larves, seulement la moitié des femelles (51,3% en moyenne) parviennent à se reproduire.

Tableau XXV. Probabilité de fécondation des femelles (calculée par rapport à celle des individus témoins) suite à l'exposition des larves de troisième et quatrième stades au sédiments contaminés en zinc.

Concentration en zinc (mg/kg)	52	300	523	953	1382	1794
Probabilité de fécondation (%)	100	100	100	40	70	44

En conclusion, l'augmentation de la concentration en zinc dans le milieu modifie significativement le nombre total d'émergents et introduit un délai par rapport au profil d'émergence témoin. Ce retard à l'émergence implique une diminution significative de la probabilité de reproduction des individus. Des résultats similaires ont été observés chez *C. tentans* lors de l'exposition de larves à un régime alimentaire limitant dans un sédiment non contaminé (Liber *et al.*, 1996 ; Sibley *et al.*, 1997) et à un sédiment contaminé en métaux (Wentzel *et al.*, 1978).

Retour d'expérience sur les modèles de croissance à partir des données d'émergence

L'allongement du temps moyen d'émergence est la conséquence directe du retard de croissance généré par la présence de zinc dans le sédiment. Nous attendons donc des effets significatifs sur le temps moyen d'émergence lorsque la concentration dans le milieu dépasse la concentration sans effet sur la croissance (CSE_c) prédite par nos modèles au second stade larvaire.

Le modèle ACC prévoit des effets sur la croissance des larves pour des concentrations supérieures à 695 mg/kg. Le retard à l'émergence est significatif pour des concentrations supérieures à 523 mg/kg. Les effets sur l'émergence sont donc bien observés dans la zone d'effets prédite par le modèle ACC. Ceci permet de valider l'estimation de la CSE_c obtenue au second stade avec le modèle ACC. En revanche, l'estimation de CSE_c fournie par le modèle DA (360mg/kg) surestime la toxicité du zinc sur la croissance.

Par ailleurs, la désynchronisation de l'émergence des mâles et des femelles est corrélée à la modification des taux de croissance respectifs des organismes au quatrième stade. Cette désynchronisation est significative pour des concentrations supérieures à 953 mg/kg. Cette valeur expérimentale confirme l'estimation de la CSE_c obtenue au quatrième stade grâce au modèle ACC (900 mg/kg). Là encore, le modèle DA surestime la toxicité du zinc sur les larves de quatrième stade : il prévoit une désynchronisation significative de l'émergence des mâles et des femelles dès 500 mg/kg. Or, cette désynchronisation n'est pas observée pour la concentration testée la plus proche de 500 mg/kg (soit 523 mg/kg).

Aux vues de ces résultats, les estimations de CSE_c fournies par le modèle ACC sont plus fiables que celles fournies par le modèle DA. Des résultats similaires ont été obtenus en

réalisant des tests de croissance en présence de cuivre chez *C. riparius* (Péry *et al.*, 2003a). Par ailleurs, nos résultats confirment les observations de Faria *et al.* (2002), qui ont mis en évidence que la présence de métaux ne provoque pas une réaction de diminution de la prise alimentaire chez les larves de chironomes. Nous utiliserons donc le modèle ACC pour prédire les effets du zinc sur la croissance des larves de chironomes lors de notre étude des effets au niveau de la population.

4.1.7. Effets du zinc sur la reproduction

D'après nos données, la date d'émergence de la femelle n'influence pas sa fécondité. Pour l'étude des effets toxiques sur la fécondité, nous ne tenons donc pas compte du retard à l'émergence et rassemblons les données de fécondité individuelle relevées aux différentes dates d'émergence pour chaque concentration.

Pour des concentrations en zinc inférieures ou égales à 1382 mg/kg, 75% en moyenne des femelles prélevées dans les enceintes d'essai se reproduisent. Au-delà de 1974 mg/kg, seulement 13 % des femelles prélevées à l'émergence ont accès à la reproduction.

La fécondité des organismes exposés durant le développement larvaire diminue linéairement avec la concentration en zinc dans le sédiment par rapport aux témoins (Fig. 69).

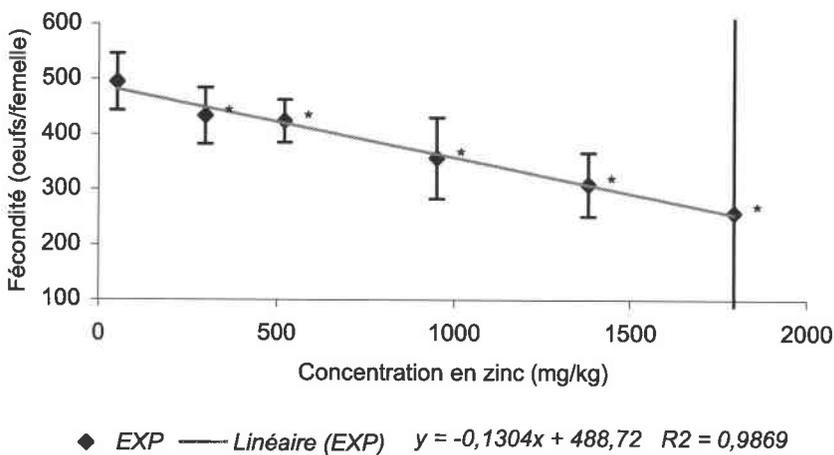


Figure 69. Fécondité moyenne des femelles de chironome (et IC 95%) exposées à des sédiments contaminés en zinc durant les troisième et quatrième stades larvaires. Les différences significatives par rapport au témoin sont signalées par un astérisque.

La gamme de concentrations choisie ne nous a pas permis d'identifier une concentration sans effet observé sur la fécondité (NOEC) : la première concentration testée (300 mg/kg) génère déjà une diminution significative de la fécondité (12,4% par rapport aux témoins). Ceci n'est pas un problème pour l'estimation des concentrations sans effet grâce aux modèles DEBtox.

Les estimations des concentrations sans effet sur la fécondité (CSE_r) réalisées à partir de ces données pour les modèles d'effets diminution de la quantité d'énergie assimilée (DA) et augmentation du coût énergétique de fabrication des œufs (ACO) ne diffèrent pas significativement entre elles (tableau XXVI). Dans les deux cas, la CSE_r n'est pas significativement différente de 0 mg/kg. D'après nos modèles, la présence de zinc dans le sédiment, même en quantité infime, affecte donc substantiellement la fécondité des chironomes.

Tableau XXVI. Estimation des paramètres d'effets des modèles de reproduction du chironome (et $IC_{95\%}$) obtenues suite à l'exposition des larves aux sédiments contaminés en zinc durant les troisième et quatrième stades larvaires.

	b	CSE_r	% d'estimations erronées ³	SCE^4
Modèle ACO ¹	0,00053 [0,00052 ; 0,00054]	0 [0 ; 300]	0	972
Modèle DA ²	0,00034 [0,00034 ; 0,00040]	0 [0 ; 300]	0	503

1. modèle supposant une augmentation du coût des œufs

2. modèle supposant une diminution de la quantité de nourriture assimilée

3. par rapport au nombre d'estimations réalisées

4. somme des carrés des écarts entre la prédiction et la donnée

Ce résultat est surprenant au vu du caractère biogène du zinc, démontré chez de nombreux insectes (Doull *et al.*, 1980). Notons qu'il n'est basé que sur un seul bioessai. Il convient donc d'évaluer la variabilité autour de cette mesure et de s'assurer de sa reproductibilité en

réalisant d'autres essais similaires. Par ailleurs, un gain de précision pourrait être obtenu en resserrant la gamme de concentrations testées.

Soulignons par ailleurs que ce résultat, s'il est validé dans de prochaines études, est embarrassant dans le cadre de la gestion du risque pour cette substance : le législateur doit-il, sur cette base, interdire tout rejet de cuivre dans l'environnement s'il désire protéger la communauté benthique ? Afin de répondre à cette question, il faut savoir si ces effets prédits au niveau individuel se répercutent ou non au niveau populationnel.

Connaissant ces paramètres, nous pouvons calculer les fécondités prédites par nos deux modèles en fonction de la concentration en zinc dans le milieu. Aucune des estimations proposées par nos modèles d'effet n'est significativement différente des données (Fig. 70).

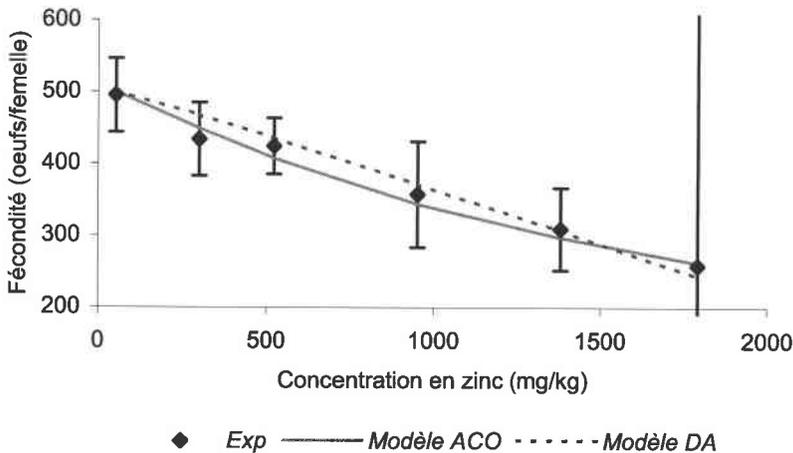


Figure 70. Fécondité moyenne des femelles (et IC_{95%}) après exposition des larves de troisième et quatrième stades au sédiment contaminé en zinc : comparaison des estimations des modèles (lignes) aux données (points).

L'erreur commise par nos deux modèles est équivalente : la racine de la somme des carrés des écarts entre les prédictions et les données correspond à une erreur de 31 œufs pour le modèle ACO contre 22 œufs pour le modèle DA. Au vu de la variabilité de la fécondité des témoins, et des résultats du test de Fisher ($p = 0,46$ pour le modèle ACO contre $p = 0,49$ pour le modèle DA), cette erreur est négligeable dans les deux cas. Les données du test de reproduction ne nous permettent donc pas de rejeter l'un ou l'autre des deux scénarii d'effets proposés. Lors de l'étude de la croissance, nous avons montré que le zinc agit probablement sur le coût de la croissance, sans provoquer de diminution de l'assimilation. Par cohérence

avec ces résultats, nous supposons que la diminution de la fécondité des chironomes provient d'une augmentation du coût de fabrication des œufs, et non d'une diminution de l'assimilation. Nous utiliserons donc le modèle ACO pour prédire les effets du zinc sur la fécondité du chironome lors de notre étude des effets au niveau de la population.

4.1.8. Effets du zinc sur les paramètres du cycle de vie du chironome : bilan

Dans nos conditions expérimentales, les paramètres du cycle de vie du chironome qui sont modifiés par la présence de zinc sont les suivants :

- survie et croissance à tous les stades larvaires ;
- émergence ;
- probabilité d'accouplement ;
- fécondité.

La présence de zinc dans le sédiment affecte peu la survie des larves. En revanche, elle déclenche un retard de croissance chez les larves de second stade. Ce retard se maintient au troisième stade et s'amplifie au quatrième stade. Ces effets sur la croissance ont pour conséquences une diminution du nombre d'émergents, ainsi qu'une désynchronisation de l'émergence des mâles et des femelles. Ils aboutissent à une diminution de la probabilité d'accouplement des organismes. La fécondité des organismes ayant réussi à s'accoupler est relativement peu touchée. Ce sont donc les effets sur la croissance des larves qui sont à l'origine de la perturbation des autres paramètres du cycle de vie.

Les paramètres du cycle de vie peuvent être classés par ordre de sensibilité décroissante en comparant les concentrations à partir desquelles leurs valeurs sont modifiées par la présence de zinc (ces concentrations correspondent aux concentrations sans effet (CSE) prédites par nos modèles ACC et ACO) :

- fécondité ($CSE_r = 0$ mg/kg) ;
- croissance ($CSE_{c, 2ème\ stade} = 695$ mg/kg) ;
- survie ($CSE_{s, 2ème\ stade} = 1392$ mg/kg).

En définitive, le paramètre le plus sensible (*i.e.* paramètre affecté pour les plus faibles concentrations en zinc testées) du cycle de vie du chironome correspond à la fécondité. Le

paramètre le plus gravement affecté par la présence de zinc correspond à la croissance. Le second stade larvaire est le plus sensible. Le quatrième stade est le moins sensible, mais le plus touché une fois que le seuil de sensibilité est dépassé.

4.2. Effets du zinc chez *Valvata (Cincinna) piscinalis*

4.2.1. Qualité globale des données expérimentales

La survie moyenne chez les témoins pour les différentes dates d'arrêt des bioessais réalisés est présentée dans le tableau XXVII. Seuls 2 essais sur 10 présentent des survies en fin de tests inférieures à 70 %, valeur qui constitue le seuil d'acceptabilité préconisé par les protocoles standards américains (US EPA, 1994 ; ASTM, 2000) et européens (OECD, 1998). Nos protocoles d'essai nous permettent donc globalement d'obtenir des données fiables par rapport aux critères de qualité des tests standardisés.

Tableau XXVII. Survie moyenne dans les lots témoins (et écart type) des essais réalisés sur les juvéniles et les adultes de Valvata (Cincinna) piscinalis.

<i>Expérience</i>	<i>Survie moyenne des témoins (%)</i>
Survie juvénile 14 j	86,7 +/- 15
Survie juvénile 21 j	53,3 +/- 6
Survie juvénile 28 j	76,7 +/- 12
Survie adulte 14 j	87 +/- 6
Survie adulte 21 j	90,0 +/- 17
Survie adulte 28 j	86,7 +/- 6
Croissance juvénile 21 j	93,3 +/- 6
Croissance juvénile 35 j	93,3 +/- 1
Croissance juvénile 56 j	76,7 +/- 3
Reproduction juvénile 202 j	56,7 +/- 2
Reproduction adulte 49 j	66,7 +/- 2

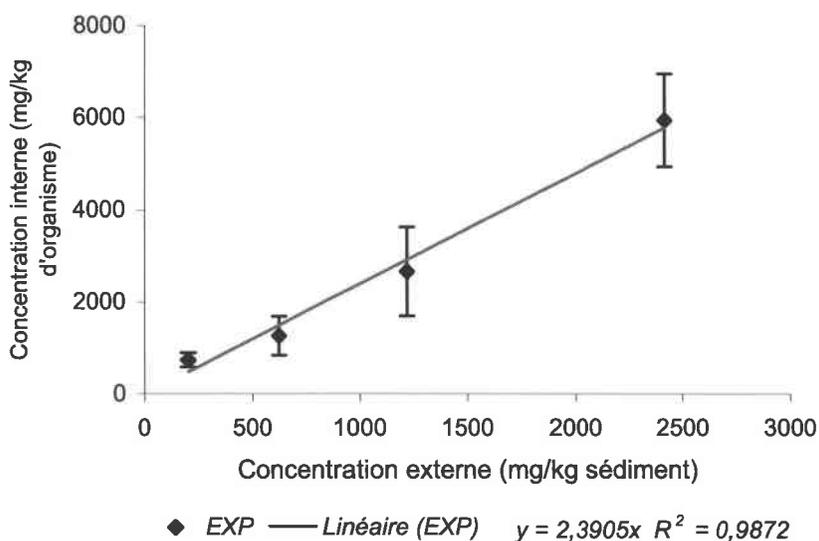
Lorsque la survie des témoins est inférieure au seuil d'acceptabilité que nous nous sommes fixé, nous mettons en doute la fiabilité du test. Faut-il utiliser ou non les données de ces tests ?

Dans le cas du test de survie à 21 jours chez les juvéniles, nous ne connaissons pas la cause de la faible survie de nos témoins. Les données obtenues ne sont pas donc utilisées.

Dans le cas du test de reproduction de 202 jours, nous supposons que la mortalité observée correspond à une mortalité naturelle des adultes après la première reproduction. Cette hypothèse est basée sur des observations de populations naturelles, dans lesquelles la plus grande partie des organismes meurent quelques semaines après la fin de la reproduction (Cleland 1954). Comme nous disposons de 6 réplicats, nous pouvons ignorer les données issues des réplicats où les survies sont inférieures à notre seuil d'acceptabilité. Afin de pouvoir conserver le maximum de données possibles pour l'analyse statistique et la modélisation, nous avons ramené ce seuil à 50 % pour les tests de reproduction.

4.2.2. Cinétique du toxique

Les organismes issus de l'essai croissance ont été minéralisés après différentes durées d'exposition (28, 35 et 56 jours) afin de suivre l'évolution de leur concentration interne en zinc. Comme chez le chironome, la relation entre les concentrations interne et externe en zinc est linéaire (Fig. 71). Ceci permet de valider l'utilisation du modèle linéaire à un compartiment pour prédire l'évolution de la concentration interne des organismes au cours du



temps.

Figure 71. Bioaccumulation du zinc présent dans le sédiment contaminé chez *Valvata (Cincinna) piscinalis* (moyenne des concentrations interne mesurées pour les différentes durées d'exposition et IC_{95%}).

Le facteur de bioconcentration ne varie pas significativement en fonction de la durée d'exposition des organismes. Ceci implique que les concentrations internes et externes sont à l'équilibre avant 28 jours. Ce résultat est confirmé par notre modèle de toxico-cinétique : d'après les valeurs du taux d'élimination k_e estimés par nos modèles (supérieures à 2 pour tous les bioessais), la concentration interne en zinc atteint un plateau (situation d'équilibre avec la concentration externe en zinc) au bout de 48 h. La cinétique de contamination des organismes par le zinc est donc rapide. Le facteur de bioconcentration moyen au cours du cycle de vie est estimé en calculant le rapport entre la concentration interne (normalisée par la valeur mesurée chez les témoins) et la concentration externe. Il est estimé à 2,0 (IC_{95%}: [1,6 ; 2,5]) : cette valeur est quatre fois plus élevée que chez le chironome.

4.2.3. Effets comportementaux du zinc au cours du cycle de vie

Lors de nos tests de toxicité sur sédiment naturel, nous avons remarqué une diminution de l'activité exploratoire du gastéropode (liée à la recherche de nourriture) par rapport aux témoins pour des concentrations supérieures ou égales à 1530 mg/kg. La migration hors du sédiment à l'occasion de la reproduction est bien observée, signe que le comportement reproducteur des organismes exposés est normal.

Afin de mieux caractériser ces troubles comportementaux, nous avons réalisé une étude complémentaire dans un milieu eau contaminée / sable de fontainebleau propre. L'utilisation d'un tel milieu facilite le suivi du comportement de chaque individu : les organismes sont toujours visibles (car ils ne s'enfouissent pas dans ce substrat grossier) et il est possible de voir s'ils se déplacent ou non car ils laissent des traces en se déplaçant sur le substrat.

Cette expérience a été réalisée en exposant de jeunes adultes. Pour des concentrations inférieures à 10 mg/l, leur activité de recherche de nourriture diminue proportionnellement au niveau de contamination du milieu. Pour des concentrations supérieures ou égales à 10 mg/l, les organismes cessent leur activité exploratoire et ne se nourrissent plus. Ils s'isolent du milieu en s'enfermant dans leur coquille, réduisant ainsi l'entrée de contaminant à la seule voie respiratoire. Cet arrêt de la prise alimentaire ne provoque pas la mort de l'organisme à court terme : en effet, une expérience complémentaire en eau seule a montré que les adultes

peuvent survivre plus d'un mois sans manger. Ainsi, cette stratégie d'évitement permet potentiellement aux organismes adultes d'augmenter leur probabilité de survie à court terme en milieu contaminé. En revanche, ce comportement d'évitement s'opère au détriment de la croissance et de la reproduction.

Cette expérience montre que la présence de zinc à de fortes concentrations déclenche des mécanismes de régulation comportementale chez *Valvata (Cincinna) piscinalis*. Cependant, elle est insuffisante pour quantifier la diminution d'activité du gastéropode liée à la contamination en zinc. Une telle mesure impliquerait par exemple une étude respirométrique ou une étude par analyse d'image de la surface de sédiment prospectée par les organismes en un temps donné. Cette diminution d'activité a été prise en compte indirectement dans nos modèles, *via* la mesure des effets sur la croissance et la reproduction.

4.2.4. Effets du zinc sur la survie

La présence de zinc dans le sédiment affecte la survie des juvéniles exposés par rapport aux témoins lorsque la concentration dépasse 1202 mg/kg (Fig. 72). Les effets ne sont significatifs qu'à partir de 1716 mg/kg.

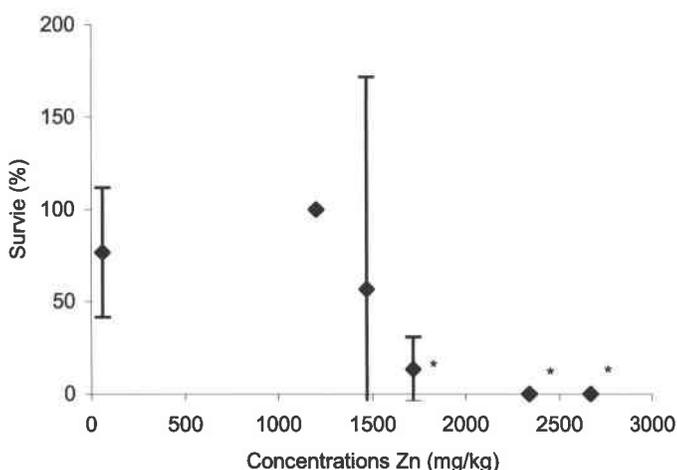


Figure 72. Effets du zinc sur la survie moyenne de juvéniles (et IC_{95%}) de *Valvata (Cincinna) piscinalis* exposés au sédiment contaminé durant 28 jours. Les différences significatives par rapport aux témoins sont signalées par un astérisque.

Dans cette gamme de concentrations, la survie moyenne observée diminue linéairement avec l'augmentation de la concentration en zinc. Tous les organismes exposés pendant 28 jours à des concentrations supérieures ou égales à 2339 mg/kg sont morts. Une fois la concentration sans effet franchie, la survie des juvéniles est donc fortement perturbée par la présence de zinc.

Nous utilisons ces données afin de paramétrer notre modèle de survie. Les paramètres estimés sont présentés dans le tableau XXVIII.

Tableau XXVIII. Estimations des paramètres du modèle de survie (et IC_{95%}) pour les juvéniles de *Valvata (Cincinna) piscinalis* exposés aux sédiments contaminés par le zinc.

<i>b</i>	<i>CSE_s</i>	<i>k</i>	% d'estimation erronées ¹	<i>SCE</i> ²
0,0002 [0,00015 ; 0,0003]	1407 [1300 ; 1450]	0,0055 [0,002 ; 0,01]	17	0,05

¹. par rapport au nombre d'estimations réalisées

². somme des carrés des écarts entre la prédiction et la donnée

Connaissant les paramètres du modèle, nous pouvons construire la courbe de survie attendue en fonction de la concentration en zinc dans le milieu. La courbe concentration-réponse obtenue grâce à notre modèle est relativement correcte puisque la fréquence d'estimations erronées¹³ est de 17% (Fig. 73).

¹³ rapport entre le nombre d'estimations significativement différentes de la donnée et le nombre d'estimations réalisées

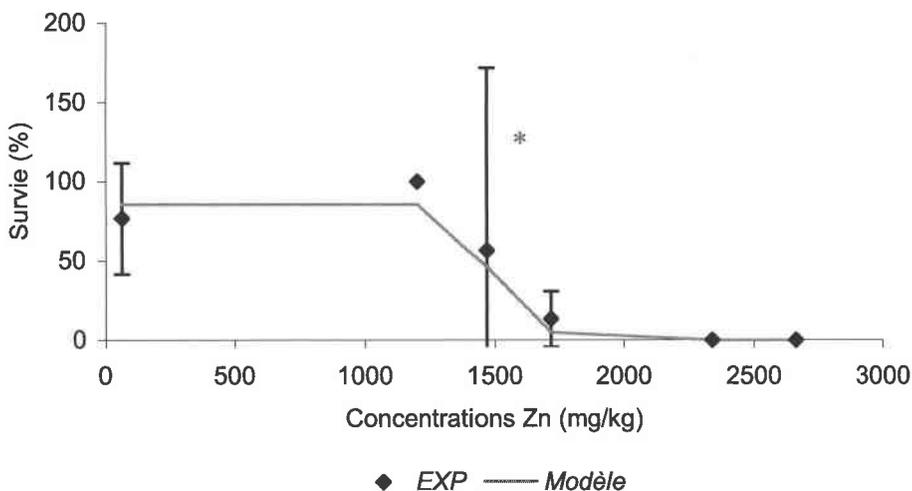


Figure 73. Effets du zinc sur la survie moyenne de juvéniles (et IC 95%) de *Valvata (Cincinna) piscinalis* exposés au sédiment contaminé durant 28 jours : comparaison des prédictions du modèle de survie (ligne) aux données (points). Les différences significatives sont signalées par un astérisque.

La racine de la somme des carrés des écarts entre les données et les prédictions correspond à une erreur de 6 survivants sur 30 organismes observés par concentration testée (ce qui représente une erreur de 20% pour chaque concentration testée). Cette erreur est du même ordre de grandeur que la variabilité expérimentale dans les lots témoins. Par ailleurs, le test de Fisher indique que la somme des carrés des écarts entre les prédictions du modèle et les données est suffisamment faible pour ne pas rejeter le modèle ($p = 0,48$). Nous considérons donc que les écarts au modèles sont acceptables, et utiliserons ce dernier pour prédire les effets du zinc sur la survie des juvéniles lors de notre étude des effets au niveau de la population.

La présence de zinc dans le sédiment affecte significativement la survie des adultes pour des concentrations supérieures ou égales à 3674 mg/kg (Fig. 74) pour le test d'une durée de 14 jours. Ce résultat n'est pas validé lors de l'essai 28 jours, pour lequel même la plus forte concentration testée ne provoque pas d'effets sur la survie adulte.

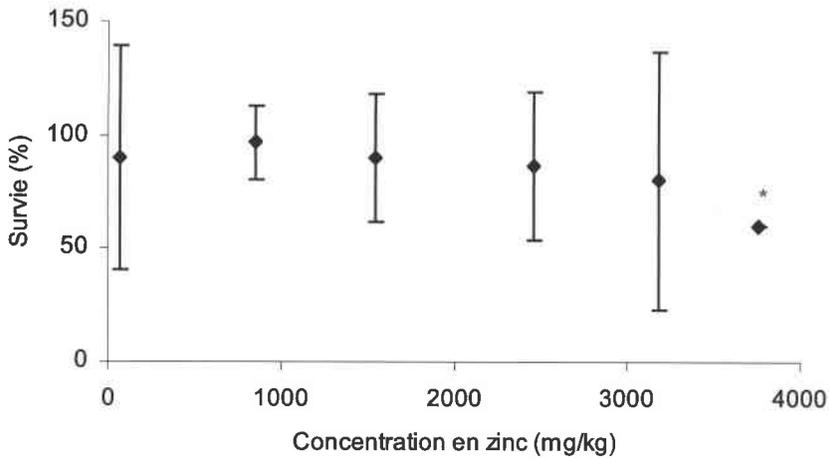


Figure 74. Effets du zinc sur la survie moyenne d'adultes (et IC 95%) de *Valvata (Cincinna) piscinalis* exposés au sédiment contaminé durant 14 jours. Les différences significatives par rapport aux témoins sont signalées par un astérisque.

D'après ces résultats, les adultes tolèrent de très fortes concentrations en zinc : les valeurs qui provoquent un effet significatif sur la survie sont de l'ordre de dix à trente fois les valeurs moyennes observées sur le terrain (Garric, 2002). Nous considérons donc que le zinc ne provoque pas d'effet sur la survie des adultes.

4.2.5. Effets du zinc sur la croissance

La présence de zinc dans le sédiment provoque une diminution significative du rythme de croissance des juvéniles par rapport aux témoins dès la plus faible concentration testée, soit 200 mg/kg (Fig. 75). Le taux de croissance journalier diminue linéairement lorsque la concentration en zinc augmente dans le sédiment. Pour la plus forte concentration testée (1217 mg/kg), ce taux de croissance est réduit de 46% par rapport aux témoins.

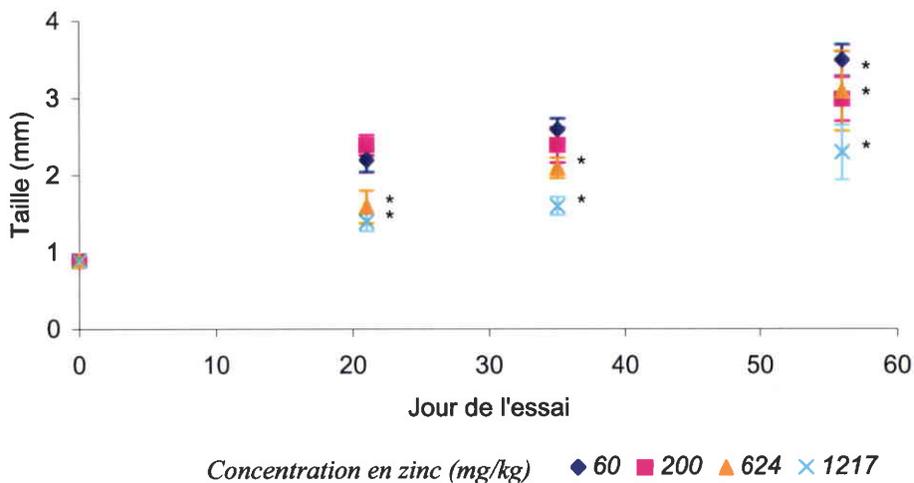


Figure 75. Evolution de la taille moyenne de juvéniles de *Valvata (Cincinna) piscinalis* (et IC 95%) exposés aux sédiments contaminés par le zinc durant 56 jours. Les différences significatives par rapport aux témoins sont signalées par un astérisque.

Cette diminution du rythme de croissance a pour conséquence un allongement du temps nécessaire à un organisme pour atteindre la taille à la puberté par rapport aux témoins. La proportion d'individus pubères à la fin du test dépend linéairement de la concentration en zinc (Fig. 76). Seuls 10% des organismes sont pubères pour la plus forte concentration testée. La présence de zinc dans le sédiment induit donc un retard à l'acquisition de la puberté par rapport aux témoins, qui se traduit par un allongement de la durée du stade juvénile du gastéropode.

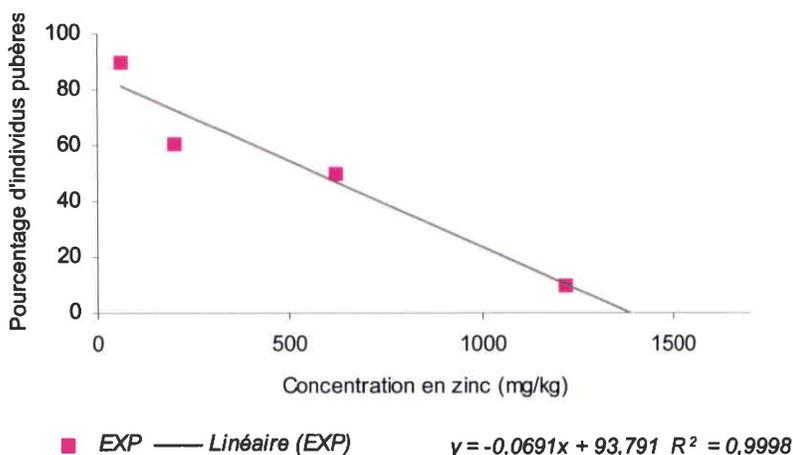


Figure 76. Proportion d'individus pubère après 56 jours d'exposition aux sédiments contaminés par le zinc. Les organismes sont alors âgés de 70 jours.

Les données de l'essai de croissance ont été utilisées pour paramétrer nos trois modèles d'effets : diminution de la quantité d'énergie assimilée (DA), augmentation des coûts de maintenance ou des coûts de croissance (ACM ou ACC). Les paramètres obtenus sont reportés dans le tableau XXIX.

Tableau XXIX. Paramètres des modèles d'effet sur la croissance de *Valvata (Cincinna) piscinalis* (et IC_{95%}).

Paramètre d'effet	$l_{\infty,0}$	CSE_c	t_c	% d'estimations erronées ⁴	SCE ⁵
Modèle DA ¹	4,45	37 [0 ; 213]	2884	37	9,1
Modèle ACM ²	4,42	60 [0 ; 509]	1132	37	0,8
Modèle ACC ³	4,50	77 [0 ; 475]	387	12	0,58

^{1.} modèle supposant une diminution de la quantité de nourriture assimilée

^{2.} modèle supposant une augmentation des coûts de maintenance

^{3.} modèle supposant une augmentation des coûts de croissance

^{4.} par rapport au nombre d'estimations réalisées

^{5.} somme des carrés des écart entre la prédiction et la donnée

Afin de comparer la pertinence des modèles DA, ACM et ACC, les tailles prédites par chacun des 3 modèles d'effets ont été comparées aux tailles observées dans notre test de croissance, concentration par concentration.

Les estimations de la taille par le modèle DA en fonction de la concentration en zinc dans le milieu sont fiables dans 62,5% des cas (Fig. 77). Les estimations erronées sont réparties entre les concentrations, signe que le modèle n'est pas biaisé du point de vue toxicologique. Cependant, toutes les estimations erronées sont observées aux deux premiers arrêts du test (jours 28 et 35 de l'essai). Il y a donc un biais temporel dans notre modèle : il surestime la taille des juvéniles lorsque leur âge est inférieur à 56 jours.

Ce modèle suppose que le taux de croissance journalier (γ_c) n'est pas affecté par la présence de toxique : le paramètre γ_c prend alors la valeur observée chez les témoins. Or cette valeur provient des expériences menées sans toxique ($\gamma_0 = 0,0208$ mm/j), et nous avons vu au chapitre III que cette valeur est trop grande pour décrire la croissance des juvéniles dans leurs premiers jours de vie.

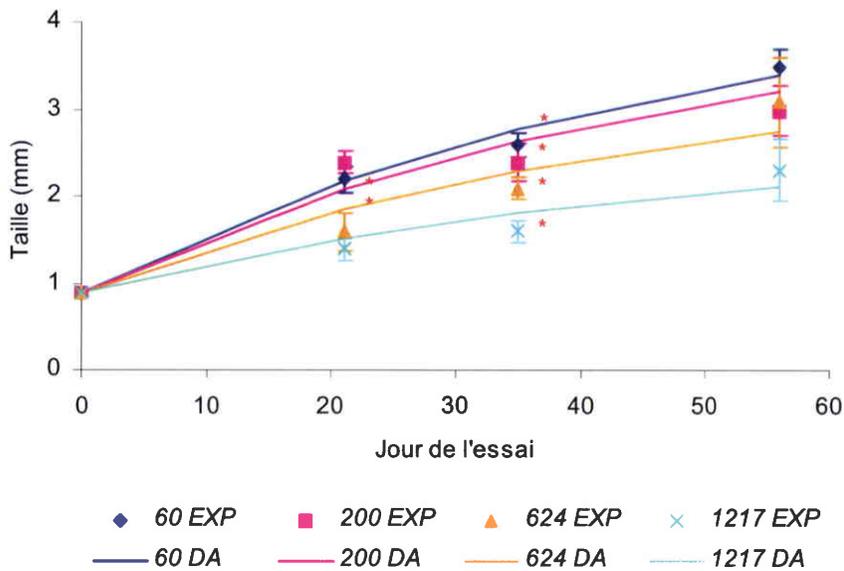


Figure 77. Evolution de la taille moyenne de juvéniles de *Valvata (Cincinna) piscinalis* (et IC 95%) exposés aux sédiments contaminés par le zinc durant 56 jours, et comparaison avec les prédictions du modèle d'effets supposant une diminution de l'assimilation. Les différences significatives entre donnée (point) et estimation (ligne) sont signalées par un astérisque.

L'utilisation d'un γ_0 calculé à partir de la croissance des témoins du test ne résout pas ce problème. Le biais temporel du modèle DA n'est donc pas lié à une erreur d'estimation du paramètre γ_0 . Nous supposons que c'est l'hypothèse $\gamma_c = \gamma_0$ qui ne s'applique pas dans ce cas. Le modèle DA n'est pas donc capable de rendre compte des effets toxiques de façon fiable.

Le modèle supposant une augmentation des coûts de maintenance présente une fréquence d'erreur similaire au modèle DA (62,5% d'estimations fiables – Fig. 78). Les estimations erronées sont réparties sur les différents jours de mesure : il n'y a pas de biais temporel dans le modèle ACM. En revanche, ce modèle sous-estime les effets aux fortes concentrations : 83 % de ses prédictions sont significativement différentes des données dans la gamme de concentration où les effets sur la croissance sont significatifs (concentrations 624 et 1217 mg/kg). Par ailleurs, pour les concentrations 624 et 1217 mg/kg, les tailles mesurées en fin d'essai sont supérieures à la taille asymptotique prédite par le modèle. Le modèle ACM n'est pas donc capable de rendre compte des effets toxiques de façon fiable.

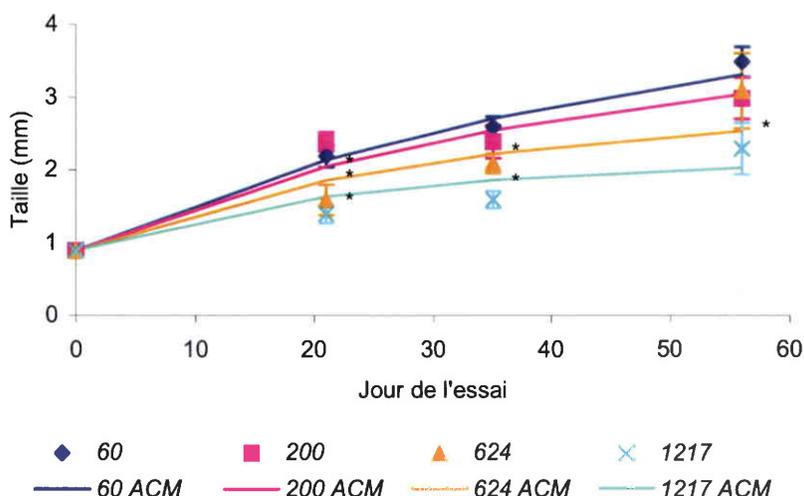


Figure 78. Evolution de la taille moyenne de juvéniles de *Valvata (Cincinna) piscinalis* (et IC 95%) exposés aux sédiments contaminés par le zinc durant 56 jours : comparaison des prédictions du modèle d'effets supposant une augmentation des coûts de maintenance (ligne) aux données (points).

Le modèle qui suppose une augmentation des coûts de croissance fournit des estimations fiables dans 88% des cas (Fig. 79). Il décrit les données de façon satisfaisante : la somme des carrés des écarts entre les prédictions du modèle et les données est faible (voir tableau XXIX, test de Fisher : $p = 0,43$). D'après ces résultats, c'est le modèle augmentation des coûts de croissance, qui décrit le mieux les effets du zinc sur la croissance de *V. piscinalis*. C'est donc ce modèle que nous utiliserons pour prédire les effets du zinc au niveau de la population.

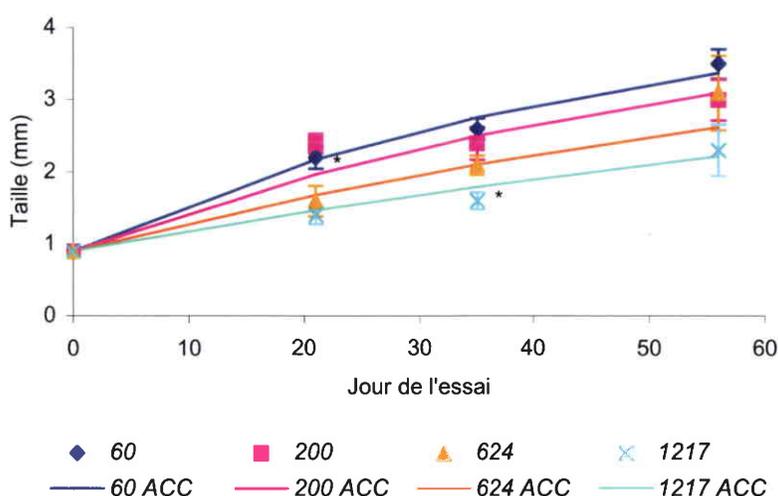


Figure 79. Evolution de la taille moyenne de juvéniles de *Valvata (Cincinna) piscinalis* (et IC 95%) exposés aux sédiments contaminés par le zinc durant 56 jours : comparaison des prédictions du modèle d'effets supposant une augmentation des coûts de croissance (ligne) aux données (points).

4.2.6. Effets du zinc sur la reproduction

Retour d'expérience sur les modèles de survie et de croissance en conditions témoins

Le premier test de reproduction que nous avons effectué consiste à exposer des organismes aux sédiments contaminés dès le stade juvénile. La survie moyenne dans les lots contaminés n'est pas significativement différente de la survie témoin, ni de la survie prédite à 202 jours par le modèle de Weibull. Par ailleurs, la taille des organismes témoins en fin de test n'est pas significativement différente de la taille prédite par le modèle de Von Bertalanffy à 202 jours. En conclusion, les taux de survie et de croissance des témoins dans le test de reproduction sont égaux aux valeurs attendues d'après les modèles de survie et de croissance en condition témoins. Ceci permet de valider nos modèles de survie et de croissance en conditions témoins chez le gastéropode.

Par ailleurs, une diminution significative de la taille finale des organismes par rapport aux témoins est observée dans les concentrations supérieures ou égales à 403 mg/kg. Ce résultat est cohérent avec les résultats du test de croissance (NOEC = 200 mg/kg ; LOEC = 624 mg/kg).

Effets du zinc sur la reproduction des organismes

Aux concentrations testées, la présence de zinc n'empêche pas les organismes exposés depuis le stade juvénile de se reproduire. Nous n'avons pas observé de retard à la première reproduction dans les lots contaminés par rapport aux lots témoins, bien que des effets significatifs sur la croissance (observés sur taille finale) surviennent dès 403 mg/kg. Rappelons que nous avons observé un délai pour la date moyenne d'acquisition de la puberté pour les concentrations supérieures ou égales à 200 mg/kg dans le test croissance. Nous attendions donc un retard du début de la reproduction chez les organismes exposés à plus de 200 mg/kg par rapport aux témoins. Nous avons donc un problème de reproductibilité entre ces deux tests, malgré que ceux ci soient réalisés dans des conditions expérimentales similaires.

Pour un nombre d'œufs pondus équivalent, la durée d'un cycle de ponte augmente dans tous les lots contaminés par rapports aux témoins. Cette durée est estimée à 130 jours (IC_{95%} : [110 ; 149]) dans la plus forte concentration testée, ce qui correspond à une valeur 4 fois plus élevée que dans les lots témoins. Concrètement, les organismes exposés au sédiment contaminé en zinc mettent donc quatre fois plus de temps pour pondre une quantité d'œufs équivalente à celle pondue par les témoins. Ceci implique que le nombre de reproductions potentielles au cours du cycle de vie est plus faible chez les organismes exposés aux toxiques que chez les témoins.

Par ailleurs, la fécondité diminue significativement pour des concentrations en zinc supérieures à 993 mg/kg (Fig. 80). Notons que la fécondité moyenne est très variable d'un réplicat à l'autre. Elle est réduite de 49,8% dans la plus forte concentration testée (1367 mg/kg) par rapport aux témoins.

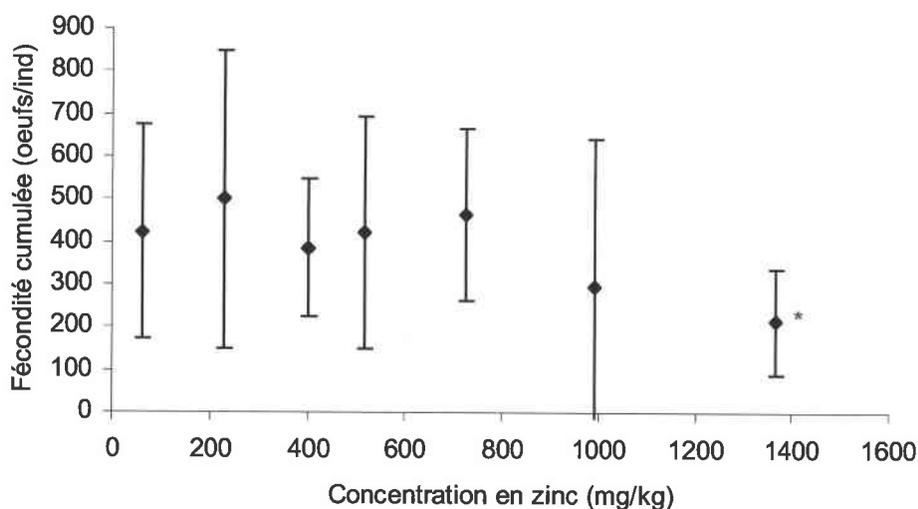


Figure 80. Fécondité moyenne cumulée de *Valvata (Cincinna) piscinalis* âgés de 202 jours (et IC_{95%}) après exposition aux sédiments contaminés en zinc. Les différences significatives par rapport au témoin sont signalées par un astérisque.

Ces résultats (obtenus en exposant les organismes dès le stade juvénile) ont été comparés aux résultats du test de reproduction à court terme, dans lequel les organismes ont été exposés seulement au stade adulte.

Les adultes se sont reproduits dans toutes les concentrations testées, ce qui confirme les résultats observés dans le test de reproduction réalisé en exposant les organismes depuis le stade juvénile : la présence de zinc à des concentrations inférieures ou égales à 1848 mg/kg n'empêche pas le gastéropode de se reproduire.

Par ailleurs, la présence de zinc provoque un retard du début de la reproduction chez les individus pubères (Fig. 81). Afin de décrire ce phénomène de façon simple, nous supposons que ce retard dépend linéairement de la concentration en zinc. Il peut alors être décrit selon l'équation suivante :

$$R = 0,025 \times c_e - 21,5 \quad (43)$$

avec R le retard au début de la reproduction chez les organismes exposés par rapport aux témoins, et c_e la concentration en zinc dans les sédiments.

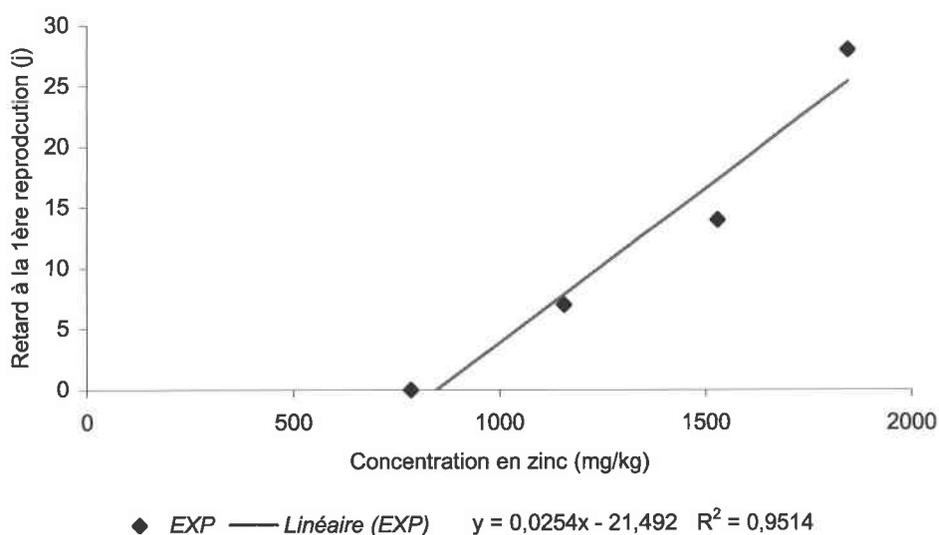


Figure 81. Retard à la première reproduction des organismes pubères exposés au sédiment contaminé par le zinc par rapport aux témoins chez *Valvata (Cincinna) piscinalis*.

Une fois la reproduction commencée, nous attendons une augmentation de la fécondité hebdomadaire. En effet, les organismes se trouvent en début de pic de reproduction au début du test : leur fécondité hebdomadaire est donc supposée augmenter de façon linéaire avec le temps, jusqu'à ce que la fécondité maximale soit atteinte (voir chapitre III). Cette augmentation est observée dans toutes les concentrations testées.

Le rythme d'augmentation de la fécondité a été calculé pour chaque concentration : il correspond à la pente de la droite de régression linéaire entre le temps et l'augmentation hebdomadaire de la fécondité pour les trois premières semaines de la reproduction, indépendamment de la date de début de reproduction. Ce calcul a mis en évidence que l'augmentation de fécondité ne se fait pas au même rythme dans les différents lots

d'organismes exposés : la présence de zinc à des concentrations supérieures à 786 mg/kg ralentit ce phénomène (Fig. 82).

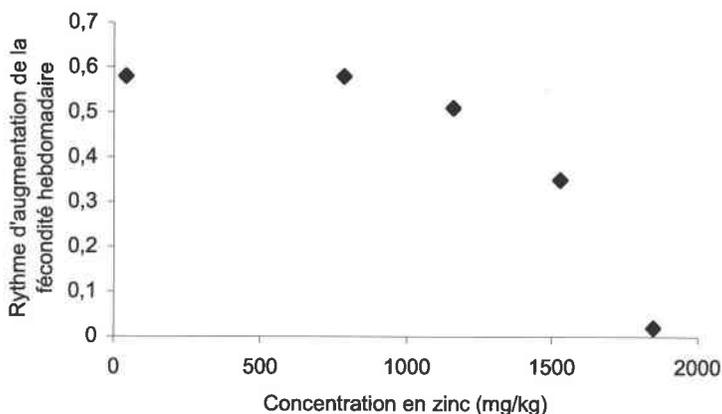


Figure 82. Effets du zinc sur le rythme d'augmentation de la fécondité hebdomadaire chez *Valvata (Cincinna) piscinalis* pendant les 3 premières semaines de la reproduction.

Les organismes exposés à des concentrations supérieures ou égales à 786 mg/kg vont donc mettre plus de temps à atteindre leur pic de fécondité maximale : la durée d'un cycle de ponte sera plus longue que celle des témoins. Ce résultat confirme l'allongement de la durée de reproduction observé dans le test de reproduction réalisé en exposant les organismes depuis le stade juvénile.

Par ailleurs, ce test permet de confirmer que la présence de zinc affecte la fécondité des organismes. En effet, la fécondité individuelle diminue significativement, et de façon linéaire, dès la première concentration testée (Fig. 83).

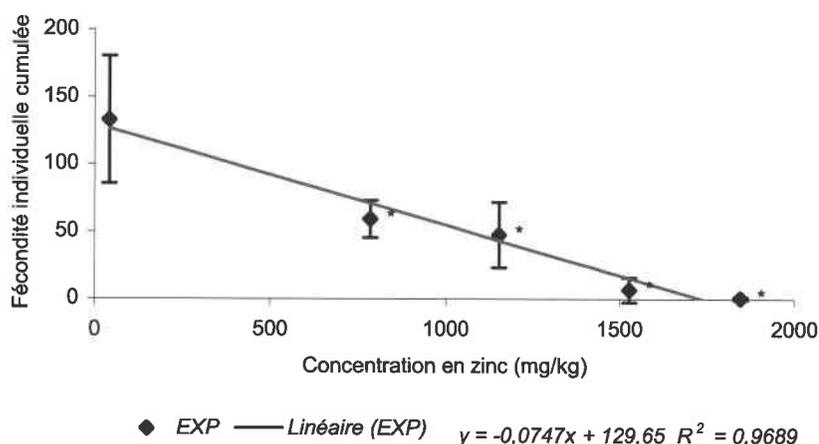


Figure 83. Fécondité moyenne cumulée (et IC_{95%}) de *Valvata (Cincinna) piscinalis* après 49 jours d'exposition aux sédiments contaminés en zinc. Les différences significatives par rapport au témoin sont signalées par un astérisque.

D'après les résultats de nos deux tests de reproduction, nous pouvons conclure que la présence de zinc dans le sédiment provoque un délai dans le début de la reproduction des organismes pubères exposés par rapport aux témoins. Lorsque la reproduction démarre, elle se déroule à un rythme significativement plus faible que dans les témoins, ce qui implique que la durée d'un cycle de ponte est plus longue chez les organismes exposés que chez les témoins. L'augmentation de cette durée ne permet pas de compenser la diminution de la fécondité des organismes exposés par rapport aux témoins.

En définitive, un organisme exposé au zinc se reproduit donc moins souvent au cours de son cycle de vie qu'un organisme témoin, et sa fécondité à chaque reproduction est plus faible que celle des témoins. La présence de zinc dans le sédiment provoque donc une modification importante des paramètres liés à la reproduction de notre gastéropode.

Afin de choisir quel est le modèle d'effet le plus approprié parmi les quatre scénarii d'effets possibles (DA, ACM, ACC, et ACO), nous regardons si les effets sur la fécondité sont corrélés avec les effets sur la croissance. D'après les données du test de 202 jours (exposition depuis le stade juvénile), la diminution de la fécondité des organismes est indépendante de leur vitesse de croissance et de leur taille finale. La perturbation de la reproduction des organismes n'est donc pas liée à une perturbation de la croissance. En conséquence, nous supposons que les effets du zinc sur la reproduction sont liés à une augmentation du coût de fabrication des œufs.

Nous testons cette hypothèse en comparant les fécondités prédites par le modèle ACO aux données du test de reproduction réalisé chez les adultes, dont la croissance n'a pas été perturbée par la présence de zinc. Les paramètres du modèle sont reportés dans le tableau XXX.

Tableau XXX. Paramètres du modèle d'effets sur la reproduction de *Valvata (Cincinna) piscinalis* supposant une augmentation du coût de fabrication des œufs

<i>Paramètre d'effet</i>	N_{max}	CSE_r	t_c	% <i>d'estimations erronées</i> ¹	SCE ²
Modèle ACO	7.3	628	111	25	760

^{1.} par rapport au nombre d'estimations réalisées

^{2.} somme des carrés des écarts entre la prédiction et la donnée

Trois estimations sur cinq diffèrent significativement des données (Fig. 84) : aux fortes concentrations, notre modèle sous-estime les effets du zinc sur la fécondité. Cependant, les écarts entre les prédictions du modèle et les données sont faibles. En effet, la racine de la somme des carrés des écarts entre les données et les prédictions correspond à une erreur de 27 œufs sur 247 œufs pondus lors du test. Au vu de la variabilité de la fécondité des témoins et des résultat du test de Fisher ($p = 0,38$), cette erreur est acceptable. Notre modèle est donc capable de prédire la fécondité des adultes de *V. piscinalis* de façon correcte. Ainsi, nous utiliserons donc le modèle ACO afin de prédire les effets du zinc sur la population.

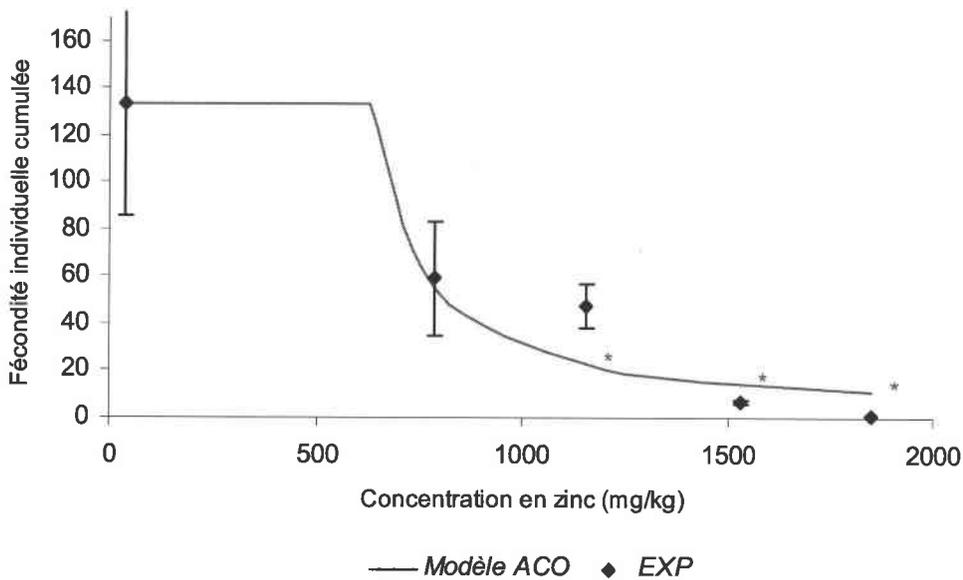


Figure 84. Fécondité moyenne cumulée de *Valvata (Cincinna) piscinalis* après 49 jours d'exposition aux sédiments contaminés en zinc : comparaison entre les prédictions du modèle qui suppose une augmentation du coût des œufs (ligne) et les données (points). Les différences significatives sont signalées par un astérisque.

4.2.7. Effets du zinc sur les paramètres du cycle de vie de *Valvata (Cincinna) piscinalis* : bilan

La présence de zinc dans le sédiment modifie les paramètres suivants chez les organismes exposés par rapport aux témoins :

- survie juvénile ;
- croissance ;
- âge à la première reproduction chez les organismes pubères ;
- fécondité.

La présence de zinc à des concentrations inférieures à 1200 mg/kg ne modifie pas la survie des juvéniles exposés, mais provoque un ralentissement de 50 % de leur vitesse de croissance par rapport aux témoins. Ce ralentissement a pour conséquence un retard de l'acquisition de la puberté, et donc un allongement de la durée du stade juvénile. Ce retard à la puberté s'accompagne d'un retard à la première reproduction chez les organismes pubères. Par ailleurs, dans cette gamme de concentrations, la fécondité des adultes est réduite de 50% et la durée de chaque reproduction est rallongée par rapport aux témoins. Les capacités de reproduction de l'organisme sont donc affectées par le zinc à la fois directement, *via* la diminution de fécondité, et indirectement, *via* l'augmentation de l'âge à la première reproduction et l'allongement de la durée moyenne des cycles de ponte. L'organisme se reproduit donc moins souvent, et produit moins d'œufs à chaque ponte. La fécondité cumulée est donc particulièrement touchée par la présence de zinc.

Lorsque la concentration dans le milieu dépasse 1200 mg/kg, la survie des juvéniles est significativement affectée par la présence de toxique. Les effets sur ce paramètre sont graves, puisque seulement 13% des juvéniles exposés arrivent à survivre 28 jours pour des concentrations de l'ordre de 1700 mg/kg.

Ces paramètres peuvent être classés par ordre de sensibilité décroissante à partir des valeurs de concentrations sans effet (CSE) prédites par nos modèles (ACC et ACO):

- croissance ($CSE_c = 77$ mg/kg) ;
- fécondité ($CSE_r = 628$ mg/kg) ;
- survie ($CSE_s = 1407$ mg/kg).

Les paramètres les plus sensibles sont la croissance et la fécondité. Ces deux paramètres sont affectés par le zinc de façon comparable : une concentration proche de 1000 mg/kg entraîne une réduction de 50% de la vitesse de croissance ainsi qu'une diminution de 50% de leur fécondité. Cependant, du fait du couplage des effets sur la croissance et sur la fécondité, la fécondité cumulée de l'organisme est particulièrement touchée par la présence de zinc

En conclusion, tous les paramètres biologiques et tous les stades de développement benthiques sont touchés par la présence de zinc chez *V. Piscinalis*. Nous ne pouvons pas dégager un paramètre particulièrement vulnérable chez cet organisme, car la croissance est le paramètre le plus sensible, mais les effets les plus graves s'exercent à la fois sur la survie et sur la fécondité cumulée.

4.3. Effets du zinc chez *Branchiura sowerbyi*

4.3.1. Qualité globale des données expérimentales

La survie moyenne chez les témoins pour les différentes dates d'arrêt des bioessais réalisés est présentée dans le tableau XXXI. Pour les tests réalisés avec des juvéniles et des adultes, la survie en fin de test est toujours supérieure à 70 %, valeur qui constitue le seuil d'acceptabilité préconisé par les protocoles standards américains (US EPA, 1994 ; ASTM, 2000) et européens (OECD, 1998). Nos protocoles d'essai nous permettent donc d'obtenir des données fiables par rapport aux critères de qualité des tests standardisés.

Tableau XXXI. Survie moyenne dans les lots témoins (et écart type) des essais réalisés sur les juvéniles et les adultes de Branchiura sowerbyi

<i>Expérience</i>	<i>Survie moyenne des témoins (%)</i>
Survie embryon 42 j	0
Survie / croissance juvénile 14 j	100
Survie / croissance juvénile 21 j	100
Survie / croissance juvénile 28 j	96,7+/- 6
Survie adulte 14 j	100
Survie adulte 21 j	90,0
Survie adulte 28 j	93,3 +/- 6
Reproduction juvénile 123 j	93,3 +/- 6
Reproduction juvénile 151 j	85,0+/- 21
Reproduction juvénile 179 j	100
Reproduction adulte 28 j	100
Reproduction adulte 35 j	100
Reproduction adulte 42 j	100

Lors du test de survie des embryons, aucun œuf n'a éclos dans les lots témoins. En fin de test, les cocons étaient intacts, mais les œufs qu'ils protégeaient ne se sont pas développés. Certains œufs sont restés en quiescence, d'autres ont dégénéré (ils prennent alors une couleur noire). Ce résultat n'a été observé que dans les lots témoins. Nous en ignorons la cause. En conséquences, les données de ce test peuvent être discutées, mais elles sont inutilisables pour le calcul de concentrations sans effet sur les embryons. Ces résultats montrent que des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour mieux comprendre quels sont les facteurs de vulnérabilité des cocons en conditions témoins, et améliorer ainsi nos protocoles d'étude des effets toxiques chez l'embryon de *B. sowerbyi*.

4.3.2. Cinétique du toxique

Les concentrations internes mesurées après différentes durées d'exposition (123, 151 et 179 jours) sur les individus issus du test de croissance ne sont pas significativement différentes en fonction du jour de mesure. La concentration interne en zinc a donc atteint son plateau à 123 jours. Ce résultat est confirmé par notre modèle toxico-cinétique ($ke > 2$ pour les bioessais réalisés). La cinétique de contamination des organismes par le zinc est donc rapide.

Par ailleurs, la concentration interne moyenne (obtenue en faisant la moyenne des concentrations mesurées à 123, 151 et 179 jours) n'augmente pas significativement en fonction de la concentration en zinc testée (Fig. 85). Ceci indique que *B. sowerbyi* ne bioaccumule pas le zinc.

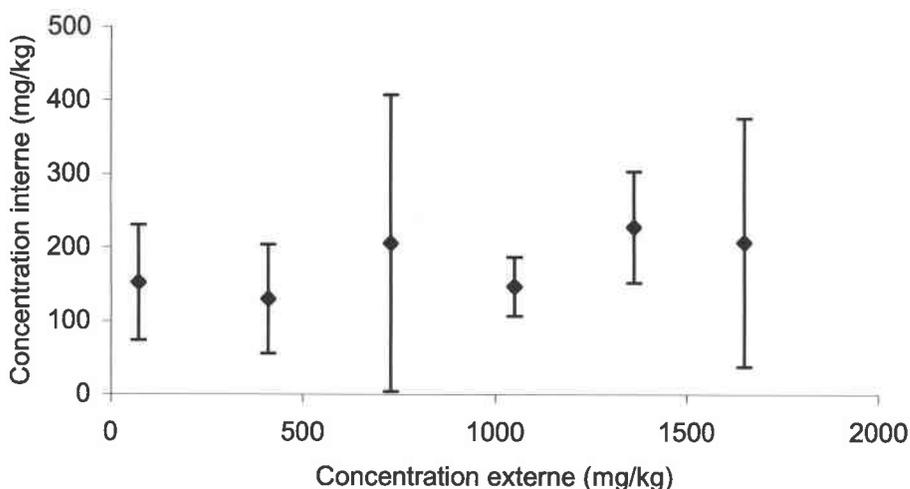


Figure 85. Relation entre la concentration en zinc dans le sédiment et la concentration interne moyenne (et IC_{95%}) après 179 jours d'exposition des juvéniles de *Branchiura sowerbyi*

Cet organisme est donc capable de réguler l'absorption et / ou l'élimination de ce composé. Nous avons vu au chapitre III que l'absorption du zinc est généralement passive pour les invertébrés aquatiques. Ainsi, le fait que *B. sowerbyi* n'accumule pas de zinc indique que cet organisme élimine probablement le toxique à la même vitesse qu'il l'absorbe, et ceci pour toutes les concentrations que nous avons testées. Ce phénomène n'est pas rare chez les invertébrés (Luoma et Rainbow, 2005). La production de fèces riches en zinc est l'un des mécanismes mis en place chez les invertébrés pour réguler leur concentration interne en zinc (Zygmunt *et al.*, 2005).

4.3.3. Effets comportementaux du zinc au cours du cycle de vie

Nous n'avons relevé aucun effet comportemental du zinc sur les organismes aux concentrations testées : leur comportement fouisseur ainsi que leur répartition dans le sédiment est normale.

4.3.4. Effets du zinc sur la survie

Le zinc provoque une diminution significative de la survie des juvéniles exposés par rapport aux témoins pour des concentrations supérieures à 1819 mg/kg (Fig. 86). Dans cette gamme de concentrations, la survie diminue de façon linéaire en fonction de la concentration en zinc dans le sédiment. Pour la plus forte concentration testée (2961 mg/kg), la survie des juvéniles exposés pendant 28 jours diminue de 62% par rapport aux témoins : ceci indique que, une fois la concentration sans effet franchie, la survie des juvéniles est fortement perturbée par la présence de zinc.

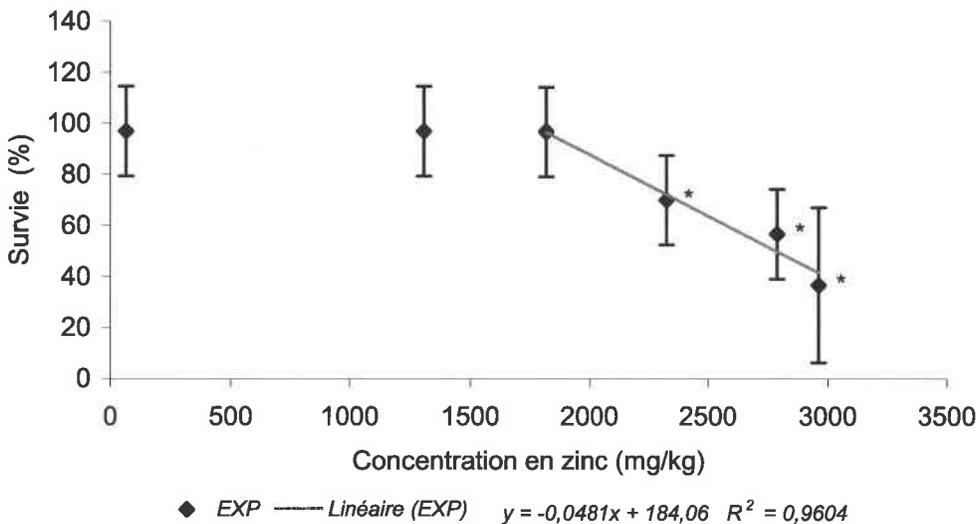


Figure VIII.86. Effets du zinc sur la survie moyenne (et IC 95%) de juvéniles de *Branchiura sowerbyi* après 28 jours d'exposition au sédiment contaminé. Les différences significatives par rapport au témoin sont signalées par un astérisque

Nous utilisons ces données afin d'estimer les paramètres de notre modèle de survie. Ces estimations sont présentées dans le tableau XXXII.

Tableau XXXII. Estimations des paramètres du modèle de survie (et IC_{95%}), pour les juvéniles de *Branchiura sowerbyi* exposés aux sédiments contaminés par le zinc.

<i>b</i>	<i>CSE_s</i>	<i>k</i>	% d'estimation erronées ¹	<i>SCE</i> ²
0,000034 [0,000024 ; 0,000052]	1929 [1590 ; 2210]	0.0012 [0,0012 ; 0,0034]	0	342

^{1.} par rapport au nombre d'estimations réalisées

^{2.} somme des carrés des écarts entre la prédiction et la donnée

Aucune des prédictions du modèle de survie n'est significativement différente des données (Fig. 87). Notre modèle nous fournit donc des estimations fiables des taux de survie des juvéniles en fonction de la concentration en zinc dans le sédiment. La racine de la somme des carrés des écarts entre le nombre de survivants prédits par le modèle et le nombre de survivants observés dans le test équivaut à une erreur de 18 individus sur les 180 individus observés. Cette erreur est acceptable, puisqu'elle est de l'ordre de l'erreur expérimentale commise en dénombrant le nombre de survivants. Nous utiliserons donc ce modèle pour prédire les effets du zinc au niveau de la population.

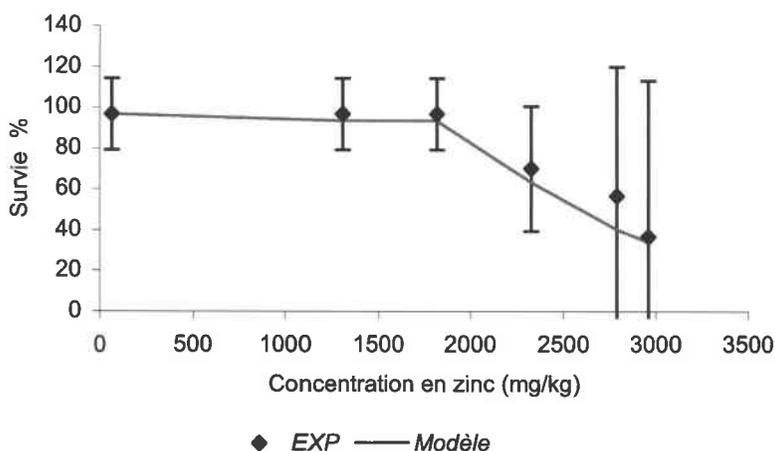


Figure 87. Effets du zinc sur la survie moyenne de juvéniles (et IC_{95%}) de *Branchiura sowerbyi* exposés aux sédiments contaminés durant 28 jours : comparaison des prédictions du modèle de survie (ligne) aux données (points).

Après 28 jours d'exposition des adultes au sédiment contaminé, le zinc ne provoque pas d'effet significatif sur la survie pour des concentrations inférieures à 4390 mg/kg (Fig. 88). D'après ces résultats, les adultes de *B. sowerbyi* tolèrent de très fortes concentrations en zinc : les valeurs qui provoquent un effet significatif sur leur survie sont de l'ordre de trente fois les valeurs moyennes observées sur le terrain (Garric, 2002). Nous considérons donc que le zinc ne provoque pas d'effets sur la survie des adultes.

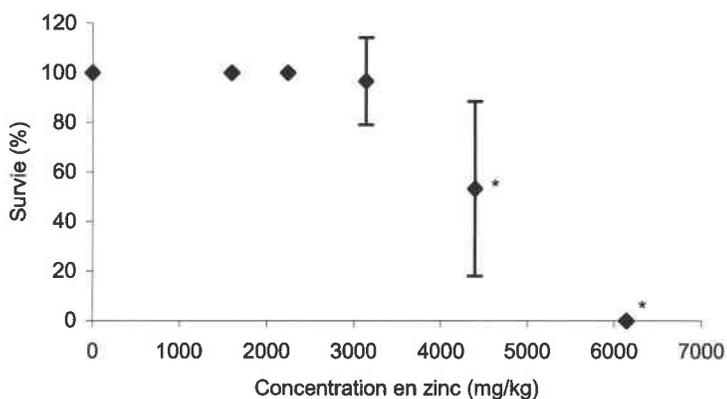


Figure 88. Effets du zinc sur la survie moyenne des adultes (et IC_{95%}) de *Branchiura sowerbyi* exposés au sédiment contaminé durant 28 jours. Les différences significatives par rapport aux témoins sont signalées par un astérisque.

4.3.5. Effets du zinc sur la croissance

La présence de zinc dans le sédiment provoque une diminution significative de la taille des juvéniles (âgés de 14 jours environ (+/- 10) en début de test) après 28 jours d'exposition à des concentrations supérieures à 1307 mg/kg (Fig. 89) par rapport aux témoins. La diminution de la croissance des organismes est linéaire dans la gamme de concentrations provoquant des effets. Pour la plus forte concentration testée (2961 mg/kg), la survie des juvéniles exposés pendant 28 jours diminue de 71% par rapport aux témoins : ceci indique que, une fois la concentration sans effet franchie, la survie des juvéniles est fortement perturbée par la présence de zinc. Cette courbe concentration-réponse est relativement similaire à celle obtenue pour la survie. Comme pour *C. riparius* et *V. piscinalis*, le ralentissement du rythme de croissance en présence de zinc implique un retard de l'âge à la puberté chez les organismes exposés par rapport aux témoins.

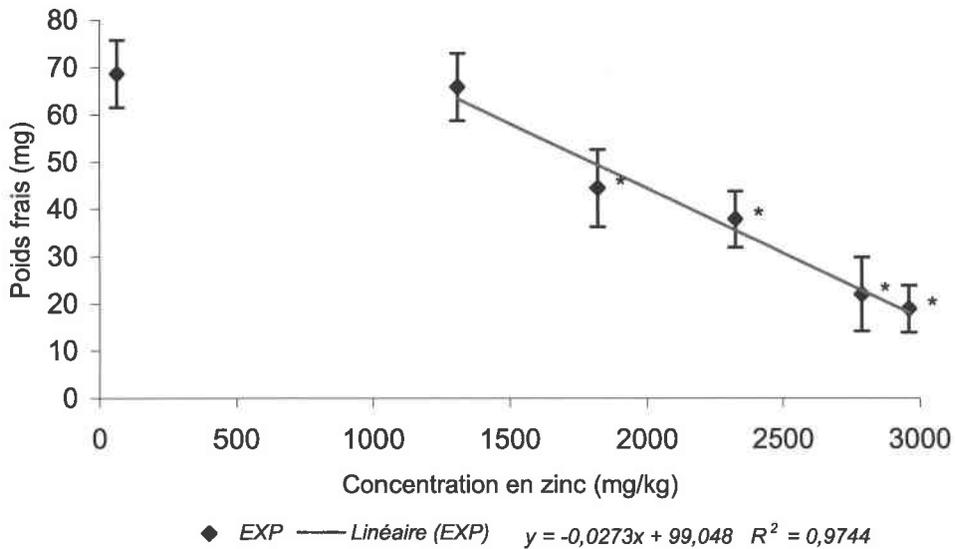


Figure 89. Effets du zinc sur la taille moyenne à 28 jours des juvéniles (et IC_{95%}) chez *Branchiura sowerbyi*. Les différences significatives par rapport aux témoins sont signalées par un astérisque.

L'exposition de juvéniles âgés de plus de 42 jours environ (+/- 10) en début de test, pendant 28, 35 et 42 jours, ne provoque pas d'effet significatif sur la croissance aux concentrations testées (concentration maximale testée : 2315 mg/kg). La présence de zinc aux concentrations testées n'entraîne pas non plus d'effets sur la croissance des adultes. D'après ces résultats, le zinc ne perturbe la croissance des organismes que dans le cas où leur exposition survient pendant leurs deux premiers de mois de vie.

Les données de l'essai de croissance réalisé sur les juvéniles âgés de 14 jours environ ont été utilisées pour paramétrer nos trois modèles d'effet (DA, ACM et ACC). Les paramètres obtenus sont reportés dans le tableau XXXIII.

Afin de comparer la fiabilité de nos trois modèles d'effets sur la croissance, les poids prédits par chacun des modèles ont été comparés aux poids observés dans notre test de croissance réalisé en exposant des juvéniles âgés de 14 jours. Les trois modèles utilisés nous fournissent des estimations fiables des données issues du test de croissance : seules 2 estimations fournies sur 18 sont significativement différentes de la données, quel que soit le modèle utilisé. Ces deux erreurs concernent les mêmes données pour tous les modèles.

Tableau XXXIII. Paramètres des modèles d'effet sur la croissance de *Branchiura sowerbyi* (et IC 95%).

Paramètre d'effet	$l_{\infty,0}$	CSE_c	t_c	% d'estimations erronées ⁴	SCE ⁵
Modèle DA ¹	5,58	807 [558 ; 1140]	4121	2	353,9
Modèle ACM ²	5,59	1000 [740 ; 1560]	1864	2	377,7
Modèle ACC ³	5,53	188 [0 ; 837]	60	2	336,6

1. modèle supposant une diminution de la quantité de nourriture assimilée
2. modèle supposant une augmentation des coûts de maintenance
3. modèle supposant une augmentation des coûts de croissance
4. par rapport au nombre d'estimations réalisées
5. somme des carrés des écarts entre les prévisions du modèle et les données

D'après la valeur de la somme des carrés des écarts entre les données et les prédictions des modèles (SCE), c'est le modèle ACC qui décrit le mieux nos données (une comparaison des poids prédits par ce modèle et des poids observés lors du test de croissance est proposée en figure 90). Cependant, les différences entre les SCE obtenues pour les trois modèles sont faibles. Ainsi, les résultats du test de Fisher ($p = 0,39$ pour le modèle ACC, $p = 0,37$ pour le modèle DA et $p = 0,41$ pour le modèle ACM) ne nous permettent de rejeter aucun des 3 modèles proposés.

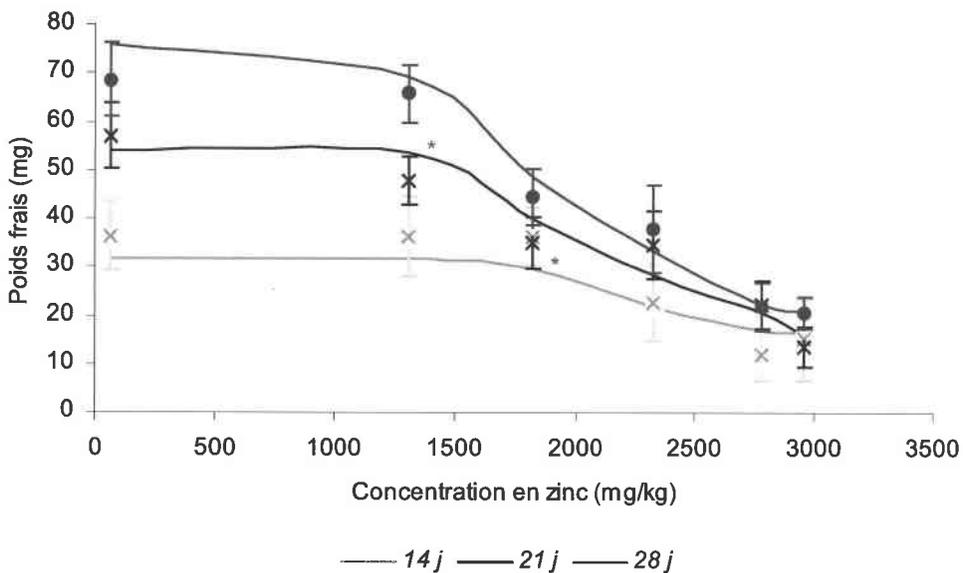


Figure 90. Evolution du poids moyen de juvéniles de *Branchiura sowerbyi* (et IC 95%) exposés aux sédiments contaminés par le zinc durant 28 jours, et comparaison avec les prédictions du modèle d'effets supposant une augmentation des coûts de croissance. Les différences significatives entre les données (points) et les estimations (lignes) sont signalées par un astérisque.

Afin de choisir entre les scénarii d'effets proposés, nous avons comparé les prédictions de nos modèles aux données de poids mesurées sur les organismes du test de reproduction. Au 123^{ième} jour de ce test, les organismes ont commencé à se reproduire, même dans la plus forte concentration testée (1651 mg/kg). Pour se reproduire, les organismes doivent avoir dépassé le poids seuil à la puberté (84,1 mg, voir chapitre III). Cette condition est vérifiée dans notre test de reproduction où le poids moyen pour la concentration 1651 mg/kg (choisie comme exemple) est de 94,3 mg à 123 jours.

Pour une concentration de 1651 mg/kg de zinc, le poids asymptotique prévu par les modèles DA et ACM est inférieur au poids minimal à la puberté. Ceci indique que d'après ces modèles, les organismes exposés à une de telle concentration n'atteindront jamais le poids minimal à la puberté, et ne seront donc jamais capables de se reproduire au cours de leur vie. Ainsi, ces 2 modèles ne permettent pas de prédire l'âge à la puberté en fonction de la concentration en zinc de façon fiable. Ils sont donc inutilisables dans le cadre de l'étude des effets du zinc sur la dynamique de la population, car l'âge à la puberté est un paramètre crucial dans nos modèles biodémographiques (voir chapitre V).

En revanche, le modèle ACC arrive à prédire de façon satisfaisante la croissance des organismes du test de reproduction ainsi que leur âge à la puberté en présence de zinc. Nous utiliserons donc le modèle ACC afin de prédire les effets du zinc sur la croissance de *B. sowerbyi* lors de la modélisation des effets sur la population.

4.3.6. Effets du zinc sur la reproduction

La présence de zinc jusqu'à 2315 mg/kg ne provoque pas d'effet significatif sur la fécondité des adultes. En effet, le nombre de cocons pondus ainsi que le nombre d'œufs par cocons ne diminuent pas significativement chez les organismes exposés au zinc par rapport aux témoins. Cette concentration sans effet observé (NOEC) sur la reproduction est dix fois supérieure aux concentrations en zinc relevées sur le terrain (Garric, 2002). Par ailleurs, le zinc n'introduit pas délai à la première reproduction des organismes pubères, et ne ralentit pas le rythme de la reproduction par rapport aux témoins. Nous considérons donc que le zinc ne provoque pas d'effets délétères sur la reproduction de *B. sowerbyi*.

Pour les concentrations supérieures ou égales à 1500 mg/kg, les taux d'éclosion des cocons exposés au sédiment contaminés diminuent en moyenne de 50% par rapport à la valeur du taux d'éclosion déterminé sur sédiment non contaminé (voir chapitre III). Même si cette diminution est importante, les taux d'éclosion obtenus pour chaque concentration testée appartiennent à l'intervalle de confiance du taux d'éclosion moyen des témoins. Nous ne pouvons donc pas affirmer que le zinc provoque une diminution significative des taux d'éclosion des cocons.

En revanche, lorsque la concentration en zinc dans le sédiment dépasse 551 mg/kg, 67 % (IC_{95%} : 32 ; 100]) des organismes nés dans le sédiment contaminé (toutes concentrations supérieures à 551 mg/kg confondues) présentent des malformations branchiales, telles qu'une absence ou une déformation des filaments branchiaux ou alors une branchie surnuméraire (organismes bifides.) Ces organismes ne sont pas viables (voir chapitre III). Nous pouvons donc les considérer comme morts. Ainsi, la survie des nouveau-nés est affectée par la présence de zinc.

Cependant, le taux d'éclosion des cocons est si faible dans nos conditions expérimentales (31,7 % dans les témoins de l'expérience présentée au chapitre III) que l'incertitude de notre mesure est de l'ordre de la valeur mesurée. Cette incertitude est due au fait que chaque individu possède un très fort poids statistique quand le nombre d'individus mesuré est faible. Nos données ne nous ont donc pas permis de quantifier les effets sur la survie des nouveau-nés de façon fiable.

4.3.7. Effets du zinc sur les paramètres du cycle de vie de *Branchiura sowerbyi* : bilan

Chez *B. sowerbyi*, la survie, la croissance et la reproduction des juvéniles pré-pubères (organismes âgés de plus de 42 jours) et des adultes ne sont pas significativement modifiées par rapport aux témoins. Cette résistance est probablement due à leur capacité de régulation de la concentration interne en zinc : en effet, les adultes exposés à des concentrations inférieures à 1651 mg/kg ne bioaccumulent pas significativement le zinc par rapport aux témoins. Cette capacité de régulation de la concentration interne en zinc est acquise très tôt pendant la vie de l'organisme, puisque les organismes sont insensibles à la présence de zinc dès 42 jours alors que leur durée de vie maximale est estimée à 1155 jours. La période de

sensibilité des organismes au zinc représente donc seulement 3,6 % de leur durée de vie potentielle au laboratoire.

Environ un tiers des organismes nés dans le sédiment contaminé à plus de 551 mg/kg souffrent de malformations importantes au niveau branchial. Ces organismes ne sont pas viables. Par ailleurs, la probabilité de survie des juvéniles dont la morphologie est normale est faible une fois que la concentration sans effet sur la survie est dépassée. De même, la croissance des juvéniles est très significativement ralentie par rapport aux témoins lorsque la concentration dans le milieu dépasse la concentration sans effet sur la croissance.

Les paramètres du cycle de vie peuvent être classés par ordre de sensibilité décroissante en comparant les concentrations à partir desquelles leurs valeurs sont modifiées par la présence de zinc (ces concentrations correspondent aux concentrations sans effet (*CSE*) prédites par notre modèle ACC) :

- croissance ($CSE_c = 288 \text{ mg/kg}$) ;
- survie ($CSE_s = 1929 \text{ mg/kg}$).

D'après ces résultats, la croissance est un paramètre plus sensible au zinc que la survie chez *B. sowerbyi*. Une fois leur *CSE* respective franchie, les effets sur la croissance sont aussi graves que les effets sur la survie : en effet, la survie et la croissance des juvéniles sont réduites respectivement de 62 et 71% par rapport aux témoins pour les plus fortes concentrations testées (2961 mg/kg).

En conclusion, la phase de sensibilité des oligochètes au zinc survient de façon précoce pendant le cycle de vie. Cette phase est très courte par rapport à la durée de vie des individus. Les effets du zinc survenant durant cette période sont relativement graves. La croissance est le paramètre du cycle de vie qui est le plus sensible à la présence de zinc. Les effets sur la survie se déclenchent pour des concentrations en zinc relativement élevées dans le milieu, mais les effets sont graves lorsqu'ils apparaissent.

4.4. Comparaison des effets individuels chez les trois espèces étudiées

Les effets du zinc sur les paramètres du cycle de vie des trois espèces étudiées sont résumés dans le tableau XXXIV.

Tableau XXXIV. Synthèse des effets du zinc observés au niveau individuels chez *C. riparius*, *V. piscinalis* et *B. sowerbyi* (21°C, apport alimentaire ad libitum)

CSE : concentration sans effet, *b* : taux de toxicité du zinc, *tc* : concentration tolérée,
ACC : augmentation des coûts de croissance, ACO augmentation des coûts de reproduction

	<i>C. riparius</i>	<i>V. piscinalis</i>	<i>B. sowerbyi</i>
Gamme de concentrations en zinc testée (mg/kg)	52-2157	60-3764	60-2664
Cinétique du toxique	Rapide	Rapide	Rapide
Facteur de bioconcentration par rapport aux témoins	0,56	2,0	NS
Effets comportementaux	Réaction de fuite	Réaction d'isolement	Aucune réaction
CSE survie juvénile	413 ¹	1407	1929
<i>b</i>	0,0001 ¹	0,0002	0,00003
CSE survie adulte	ND (> 2157)	ND (> 3764)	ND (> 2664)
<i>b</i>	ND	ND	ND
Mode d'action du zinc sur la croissance	ACC	ACC	ACC
CSE croissance	695 ¹	77	188
<i>b</i>	0,0020 ¹	ND	ND
Retard à la première reproduction	oui	oui	non
Diminution de la probabilité d'accouplement	oui	non	non
Mode d'action du zinc sur la reproduction	ACO	ACO	ND
CSE fécondité	0	628	ND (> 2664)
<i>b</i>	0,0005	ND	ND

La gamme de concentration en zinc provoquant des effets toxiques est similaire chez nos trois espèces. Par ailleurs, chez ces trois taxa, la cinétique du toxique est rapide, et les effets sublétaux sont dus à une augmentation des coûts de fabrication de la biomasse (tissus dans la cas de la croissance, œufs dans le cas de la reproduction). Ces résultats confirment que le mode d'action du zinc est similaire chez ces trois espèces.

Les facteurs de bioconcentration (BCF) du zinc varient significativement entre les trois espèces. Les larves de quatrième stade de chironome et le gastéropode accumulent significativement le zinc présent dans le milieu : la concentration en zinc dans les tissus dépend linéairement de la concentration d'exposition. Ceci indique que ces organismes ne régulent ni l'absorption, ni l'élimination du zinc. En revanche, nous avons vu que *B. sowerbyi* est capable de réguler l'élimination du zinc en fonction de la concentration d'exposition, de sorte que la concentration interne des organismes exposés n'est pas significativement plus élevée que celle des témoins.

Il y a un rapport 17 entre la concentration interne en zinc mesurée chez les témoins pour *B. sowerbyi* et le BCF estimé chez *V. piscinalis*. Cependant, cette différence reste relativement faible par rapport à la gamme de variabilité du BCF chez les espèces aquatiques. En effet, Luoma et Rainbow (2005) ont mis en évidence que le BCF du zinc varie d'un facteur 100 entre 14 espèces aquatiques choisies dans des groupes taxonomiques différents.

Les effets du zinc varient selon l'espèce et le critère d'effet biologique considéré. Aux concentrations testées, le zinc ne provoque pas d'effet significatif sur la survie des embryons, des larves de premier stade et des adultes de *C. riparius*. Ceci est dû au fait que ces stades de développement ne se déroulent pas au contact du sédiment, mais dans la colonne d'eau ou dans l'air. De même, la survie des embryons et des nouveau-nés chez *V. piscinalis* n'est pas affectée par le zinc, car ces stades de développement sont aquatiques.

Le taux d'éclosion des cocons n'est pas significativement affecté chez *B. sowerbyi*, bien que les œufs se développent dans le sédiment. Le cocon vitellin protège probablement les œufs du zinc pendant leur développement. De même, la présence de la coquille permet à *V. piscinalis* de s'isoler temporairement du milieu, et augmente ainsi ces capacités de survie à court terme.

Ces résultats montrent qu'il existe des différences entre nos espèces concernant le niveau d'exposition au cours du cycle de vie. Ce niveau d'exposition est principalement déterminé par la relation au substrat, et par la présence de structures de protection ou de mécanismes comportementaux d'évitement du contaminant. L'organisme dont la durée de contact avec le milieu pollué est la plus faible par rapport à la durée de vie est le chironome. A l'opposé, *B. sowerbyi* est exposé au substrat contaminé durant tout son cycle de vie. La durée de contact avec le sédiment pollué est difficile à estimer chez *V. piscinalis*, car nous ne savons pas combien de temps les adultes passent hors du sédiment lors de la période de ponte, ni combien de temps par jour ils se réfugient dans leur coquille.

La survie des juvéniles est affectée par la présence de zinc chez nos trois espèces. Les concentrations sans effet sur la survie sont significativement différentes chez nos trois taxa ($CSE_s C. riparius < CSE_s V. piscinalis < CSE_s B. sowerbyi$). Une fois la concentration seuil dépassée, c'est chez *V. piscinalis* que les effets sur la survie sont les plus graves : une réduction de survie de 50 % par rapport aux témoins et observée dès 1459 mg/kg de zinc. Chez *B. sowerbyi* et chez *C. riparius* (2^{ème} stade), il faut atteindre respectivement 2247 et 5200 mg/kg (valeurs modélisées) pour aboutir à un effet de même intensité.

La croissance des juvéniles est affectée chez nos trois espèces. Les concentrations sans effet sur la croissance ne diffèrent pas significativement pour ces trois taxa. Une fois cette CSE_c dépassée, c'est à nouveau chez *V. piscinalis* que les effets sont les plus graves : une réduction de 50 % de la taille par rapport aux témoins survient dès 1350 mg/kg de zinc ; un effet similaire n'est pas observé avant 2364 mg/kg chez *B. sowerbyi* et 3479 mg/kg chez le chironome (2^{ème} stade) (valeurs modélisées).

La reproduction des organismes n'est pas affectée par la présence de zinc chez *B. sowerbyi*. Chez *C. riparius* et *V. piscinalis*, le zinc entraîne un retard à la puberté ainsi qu'une diminution de la fécondité par rapport aux témoins. La CSE_r est significativement plus faible chez le chironome que chez le gastéropode. Encore une fois, c'est chez *V. piscinalis* que les effets sont les plus graves une fois que la CSE est dépassée. En effet, la fécondité est réduite de 50% par rapport aux témoins lorsque la concentration en zinc atteint 739 mg/kg chez *V. piscinalis*, tandis qu'il faut atteindre une concentration de 2102 mg/kg chez le chironome pour obtenir un effet similaire.

Ces résultats montrent que les paramètres du cycle de vie ne sont pas affectés par le zinc de la même façon chez les trois espèces étudiées. Le paramètre du cycle de vie le plus sensible à la présence de zinc chez le chironome est la reproduction, tandis que c'est la croissance chez le gastéropode et l'oligochète.

Par ailleurs, nos trois espèces présentent des différences au niveau de la concentration pouvant être tolérée sans apparition d'effets toxiques, ainsi que des différences quant à l'intensité des effets une fois que cette concentration seuil est dépassée. La cinétique d'absorption et le mode d'action du zinc étant similaire chez nos trois espèces, ces différences d'intensité des effets toxiques reflètent des différences d'efficacité des mécanismes de défense de l'organisme contre le toxique. *V. piscinalis* est l'organisme qui subit les effets les plus graves sur la survie, la croissance et la fécondité parmi les trois espèces testées. C'est le chironome qui subit le moins les effets du zinc présent dans le sédiment.

5. CONCLUSION DU CHAPITRE IV

- ❖ Nos protocoles de dopage nous permettent d'assurer un enrichissement en zinc homogène du sédiment.
- ❖ Les concentrations d'exposition au zinc sont constantes dans le milieu. Par contre nous ne connaissons pas l'évolution de la biodisponibilité du produit pour les organismes.
- ❖ La contamination des organismes se fait principalement *via* le sédiment. L'importance respective des voies d'exposition (*via* la phase particulaire et la phase dissoute) n'est pas connue.
- ❖ Les effets du zinc sur la survie, la croissance et la reproduction ont été évalués grâce à 13 bioessais : les protocoles de tests, ainsi que les protocoles de dosage de la concentration interne pour *V. piscinalis* et *B. sowerbyi* ont été mis au point pendant cette thèse.
- ❖ La présence de zinc dans le sédiment provoque des effets sur le comportement et sur les paramètres du cycle de vie des individus exposés au sédiment contaminé aussi bien à court terme qu'à long terme.
- ❖ La gamme de concentrations en zinc provoquant des effets sur les individus est relativement similaire chez les trois espèces étudiées.
- ❖ Les données issues de ces essais sont interprétées grâce aux modèles d'effets DEBtox. Ces modèles sont basés sur différents scénarii d'effets qui ont pour hypothèse commune l'idée que la présence de toxique perturbe la gestion de l'énergie chez les organismes exposés. Ces modèles comportent un module toxico-cinétique et un module d'effet.
- ❖ La gestion de l'énergie chez les organismes exposés au toxique est modifiée de la même façon chez ces trois espèces : le zinc provoque une augmentation des coûts de fabrication de la biomasse (tissus et œufs).

- ❖ La réponse toxique varie selon les organismes concernant :
 - les paramètres du cycle de vie affectés par la présence du toxique ;
 - la sensibilité relative des différents stades de développement d'une espèce donnée ;
 - la concentration interne pouvant être tolérée sans apparition d'effets toxiques ;
 - l'intensité des effets (et donc à l'efficacité des mécanismes de défense) une fois que cette concentration seuil est dépassée.

- ❖ Nos trois espèces peuvent être classées en fonction de leur sensibilité à partir des valeurs de concentrations sans effet sur la survie, la croissance et la reproduction (par ordre de sensibilité décroissante) : *C. riparius*, *V. piscinalis*, *B. sowerbyi*.

- ❖ Par ailleurs, nos trois espèces peuvent être classées en fonction de la gravité des effets observés une fois la concentration sans effet franchie (par ordre de gravité décroissant) : *C. riparius*, *B. sowerbyi*, *V. piscinalis*.

Liens avec les articles rédigés au cours de la thèse

Le lecteur trouvera une présentation plus complète et un exemple d'utilisation du modèle de reproduction chez le chironome dans l'article suivant : « Energy-based modeling as a basis for the analysis of reproductive data with the midge *Chironomus riparius*. » (Ducrot *et al.*, 2004).

CHAPITRE V

EVALUATION DE LA TOXICITE AU NIVEAU DE LA POPULATION

Dans ce chapitre, nous allons exposer les concepts et méthodes utilisées afin de prédire les effets du zinc au niveau des populations pour nos trois espèces. Ce travail est réalisé en deux étapes.

Premièrement, nous construisons des modèles de dynamique de population (ou modèles biodémographiques) à partir des stratégies d'histoire de vie des organismes. Ces modèles sont paramétrés grâce aux données individuelles de survie, de croissance et de reproduction recueillies en milieu non contaminé lors de la caractérisation du cycle de vie. Lorsque ces données ne sont pas disponibles, comme dans le cas des taux de survie dans les différentes classes d'âge pour les organismes à cycle de vie long, nous utilisons des prédictions fournies par les modèles mis au point au niveau individuel.

Deuxièmement, les modèles biodémographiques ainsi mis au point sont utilisés pour l'étude des effets toxiques du zinc sur les populations. Il suffit pour cela de les re-paramétrer avec les taux de survie, de croissance et de reproduction obtenus en présence de zinc. Ces taux vitaux sont modélisés grâce à nos modèles d'effets au niveau individuel.

Pour chaque espèce étudiée, nous présentons les résultats des simulations de la diminution du taux de croissance journalier de la population en fonction de la concentration en zinc dans la gamme de concentration [0 ; 3000] mg Zn/kg de sédiment. Ces résultats permettront de répondre aux questions suivantes :

- Sachant que les organismes étudiés présentent des stratégies d'histoire de vie ainsi que des réponses biologiques individuelles au zinc différentes, la réponse des populations est-elle différente chez nos 3 espèces ?

- Quelle est l'importance relative des paramètres du cycle de vie (survie, croissance et reproduction) dans la dynamique de population de nos trois espèces ?

Les différents paramètres et équations utilisés sont recensés dans des tableaux récapitulatifs présentés en annexes 6 et 7.

1. CARACTERISATION DES POPULATIONS DE LABORATOIRE

Une population se définit comme un ensemble d'individus partageant le même pool génétique. Ces individus vivent en commun pendant tout ou partie de leur cycle de développement et sont capables de se reproduire entre eux (Caswell, 2001).

Les populations naturelles constituent des systèmes complexes dont les propriétés dépendent et évoluent en fonction des paramètres biotiques et abiotiques de leur habitat. Les populations de laboratoire sont soumises à des facteurs environnementaux contrôlés : leur étude est donc moins fastidieuse que celle des populations naturelles. En effet, le milieu de vie dans notre population de laboratoire (bécher rempli d'eau et de sédiments) correspond à une représentation très simplifiée de l'habitat naturel des organismes. Dans ce milieu, et dans nos conditions expérimentales :

- l'espace et la nourriture sont des ressources non limitantes. Notre population de laboratoire n'est donc pas soumise aux régulations densité-dépendantes engendrées par la compétition pour ces ressources ;
- les organismes sont soumis à des conditions environnementales constantes : la population ne subit pas la saisonnalité du milieu ;
- il n'y a pas de relations interspécifiques (*e.g.* compétition, prédation) ;
- les organismes vivent en commun pendant toute leur vie : il n'y a ni émigration ni immigration d'individus dans cette population.

Finalement, la dynamique de nos populations de laboratoire exposées aux sédiments contaminés n'est régulée que par les effets du zinc.

2. LA VARIABLE D'EFFET PRIVILEGIEE : LE TAUX DE CROISSANCE DE LA POPULATION

Le passage de l'individu à la population permet l'intégration des effets sur les différents paramètres du cycle de vie des organismes en un seul paramètre d'effet. Le choix de ce paramètre fait débat dans la littérature.

La plupart des études se sont focalisées sur le taux de croissance de la population. En effet, ce paramètre est un élément clé pour l'évaluation et la compréhension de la dynamique de population, puisqu'il reflète l'évolution temporelle de l'effectif de la population (Caswell, 2001). Par ailleurs, l'étude de l'impact des polluants sur ce paramètre ouvre des perspectives à la fois en biologie de la conservation (études de biodiversité) et en biologie de l'évolution (adaptabilité des populations). D'autres auteurs se sont focalisés sur la densité à l'équilibre dans le cadre d'études de gestion de la ressource trophique dans les écosystèmes perturbés (Sibly, 1999 ; Péry, 2003).

L'étude de la densité à l'équilibre nous renseigne sur l'effectif de la population en situation perturbée, tandis que l'étude du taux de croissance de la population nous renseigne sur ses chances de maintien au sein de la communauté. Dans le cadre de la comparaison des différences de sensibilité entre espèces, nous nous intéressons surtout à leur maintien dans la communauté. Nous nous focaliserons donc sur l'étude du taux de croissance intrinsèque de la population (λ).

3. METHODES DE CALCUL DU TAUX DE CROISSANCE DE LA POPULATION

Il existe différentes méthodes pour calculer le taux de croissance de populations (voir Mooij *et al.* (2002) pour une revue) : l'approche de Euler et Lotka (1939), l'approche de Leslie (1945) et l'approche de Nisbet *et al.* (1989). Ces trois approches sont basées sur les mêmes hypothèses biologiques :

- l'environnement de la population est constant ;
- dans cet environnement, la population présente une croissance exponentielle et obéit à la théorie de la structure d'âge stable (Lotka, 1939) : cette théorie définit la structure et la dynamique d'une population divisée en classes d'âge¹⁴ ;
- la dynamique de population peut être décrite à partir de deux variables clés : le taux de mortalité et le taux de fécondité d'un individu d'âge donné ;
- seuls les adultes reproducteurs sont pris en compte dans la dynamique de population.

Leurs différences résident dans leur formalisme mathématique : les modèles de Lotka (1939) et de Nisbet *et al.* (1989) décrivent la dynamique de population en temps continu, tandis que l'approche de Leslie (1945) est adaptée à l'étude de données obtenues en temps discret.

Le modèle de Nisbet *et al.* (1989) est basé sur un système d'équations différentielles partielles. Il est peu utilisé en écotoxicologie, car il est plus complexe du point de vue mathématique que les autres modèles de dynamique de population en temps continu. Le modèle en temps continu le plus utilisé en écotoxicologie correspond à l'équation d'Euler et Lotka (1939) :

$$\int_0^{\infty} S_t \times N_t \times e^{(-\lambda t)} dt = 1 \quad (44)$$

avec :

- λ le taux d'accroissement intrinsèque de la population ;
- S_t la probabilité de survie d'un organisme jusqu'au temps t ;
- N_t la fécondité de femelles au temps t .

¹⁴ regroupement statistique des individus qui présentent des valeurs de leur paramètres démographiques similaires au sein de la population étudiée

Cette équation peut être discrétisée en répartissant les organismes dans des classes d'âge (Forbes et Calow, 1999). Le paramètre λ est alors calculé à partir des probabilités de survie et des taux de fécondité observés (ou modélisés) dans les différentes classes d'âge, à partir de l'équation suivante :

$$1 = s \sum_{t=0}^{\infty} S_t N_t e^{-\lambda t} \quad (45)$$

avec s le sexe-ratio. Cette équation discrète ne constitue cependant qu'une approximation de l'équation 44, ce qui peut entraîner des imprécisions ou des biais lors de l'analyse des données.

L'équation d'Euler et Lotka (1939) peut aussi être exprimée sous forme matricielle (modèle discret). Les premiers modèles matriciels pour la dynamique de population ont été proposés par Leslie, en 1945. Dans ces modèles, la population est aussi divisée en plusieurs classes d'âge, notées i . L'évolution de l'effectif dans chacune des classes d'âge dépend des probabilités de survie des individus, de leur âge et de leur fécondité. L'effectif dans chaque classe d'âge est alors décrit grâce à deux paramètres : la survie âge-spécifique des individus de classe i (S_i) et leur fécondité âge-spécifique (F_i). La fécondité F_i correspond non pas au nombre d'œufs pondus par femelle (N_i , paramètres de nos modèles d'effet), mais au nombre de nouveau-nés femelles issus d'une femelle de classe i en un pas de temps : les F_i tiennent donc compte du taux d'éclosion des œufs et du sexe-ratio de la progéniture.

La dynamique de population est alors conceptualisée grâce au graphe d'histoire de vie. Ce graphe fait apparaître les S_i et F_i des différentes classes d'âge et les probabilités de transitions entre ces classes. Il contient toutes les informations nécessaires pour décrire complètement la dynamique de la population étudiée, et sert de base au paramétrage de la matrice L : les F_i constituent la première ligne de la matrice, tandis que les S_i sont reportés en diagonale.

La structure d'âge de la population au temps t (*i.e.* effectif dans les différentes classes d'âge) est représentée par le vecteur suivant (modèle âge structuré complet – Caswell, 2001) :

$$\boxed{n_{(t+1)} = L \times n_t} \quad \text{avec} \quad L = \begin{pmatrix} 0 & F_1 & F_2 & \dots & F_{i-1} & F_i \\ S_1 & 0 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ 0 & S_2 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \dots & S_{i-1} & 0 \end{pmatrix} \quad (46)$$

La résolution de la matrice implique la recherche de ses valeurs propres. C'est la plus grande valeur propre (λ) qui représente le taux de croissance de la population. L'effectif de la population augmente lorsque $\lambda > 1$ et diminue lorsque $\lambda < 1$. Quand $\lambda = 1$, la population est à l'équilibre : son effectif se maintient d'une génération à l'autre. Le vecteur propre à gauche associé à λ fournit la structure d'âge stable de la population, qui correspond à l'effectif de chaque classe d'âge, en conditions de croissance asymptotique. Le vecteur propre à droite associé à λ fournit les valeurs reproductives, qui correspondent à la contribution de chaque classe d'âge dans la reproduction, en conditions de croissance asymptotique.

D'autres paramètres démographiques intéressants peuvent être calculés à partir de la matrice : par exemple la vitesse de convergence vers le régime asymptotique, le temps de génération, le taux de reproduction net qui correspond au nombre de nouveau-nés femelles par femelle reproductrice.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi d'utiliser les modèles matriciels plutôt que l'équation d'Euler et Lotka. Ce choix est basé sur les raisons suivantes :

- l'apport de nourriture ainsi que les mesures de survie, de croissance (d'émergence dans le cas du chironome) et de reproduction sont réalisés avec une fréquence supérieure ou égale à un jour. L'étude des données de laboratoire nécessite donc l'utilisation d'un modèle en temps discret ;
- pour l'étude de données discrètes, la forme matricielle de l'équation d'Euler est plus fiable que la forme discrétisée par la somme (équation 45) (S. Charles, Comm. Pers.) ;
- l'algèbre matriciel est relativement simple : la résolution des équations est donc aisée, même lorsqu'elles contiennent un grand nombre de paramètres ;
- l'approche matricielle permet d'utiliser d'autres critères que l'âge pour regrouper les organismes en classe : l'effectif de la population peut être réparti dans les

classes en fonction de la taille des organismes ou de leur stade de développement (Caswell, 2001). Dans le cas de l'étude d'espèces présentant un développement indirect, comme le chironome par exemple, chaque stade de développement peut donc être pris en compte de façon indépendante (Charles *et al.*, 2004).

4. MODELES DEMOGRAPHIQUES MATRICIELS : PRINCIPES DE CONSTRUCTION ET D'UTILISATION COMMUNS AUX TROIS ESPECES ETUDIEES

Le modèle de Leslie (1945, 1948) permet de décrire la dynamique de populations structurée en classes d'âge à partir des taux de survie et de reproduction des organismes de chaque classe d'âge. Une matrice de Leslie est spécifique d'une espèce donnée, non seulement pour la valeur de ses paramètres, mais aussi pour des caractéristiques plus globales telles que son pas de temps et sa taille, qui correspond au nombre de classes d'âge prises en compte. Ces caractéristiques influencent directement la valeur du taux de croissance de la population prédite par la matrice. Le but de notre étude étant de pouvoir comparer les effets du zinc sur le taux de croissance des populations de laboratoire pour nos trois espèces, il est souhaitable d'utiliser des matrices dont la dimension et le pas de temps sont similaires, afin d'obtenir des taux de croissance comparables.

Le pas de temps dans la matrice est choisi en fonction de la résolution nécessaire pour l'étude des effets toxiques chez nos trois organismes. Il doit correspondre à la résolution temporelle la plus fine utilisée lors des tests de toxicité. Chez *V. piscinalis* et *B. sowerbyi*, qui ont un cycle de vie long, nous avons utilisé une résolution minimale de 7 jours entre les mesures effectuées lors des tests. Chez le chironome, qui a un rythme de vie circadien (Armitage *et al.*, 1995), les mesures ont été effectuées tous les jours. Le pas de temps des matrices est donc fixé à un jour. Ces matrices permettent donc de calculer le taux de croissance journalier de la population.

La dynamique de la population est décrite à partir de ce pas de temps. Il se pose alors la question du choix du début du pas de temps, par rapport aux deux événements qui rythment l'évolution de l'effectif dans chaque classe d'âge : la survie et la reproduction. Le choix du pas de temps se fait en fonction du rythme de reproduction des organismes (Charles, 2004). En fonction de ce rythme, il faut distinguer 2 types de populations : les populations qui se reproduisent de façon continue au cours du pas de temps, dites de type « birth flow » et les populations qui se reproduisent pendant une période donnée du pas de temps, dites de type « birth pulse ».

Pour chaque espèce que nous étudions, la reproduction se présente sous la forme d'un pic, d'une durée relativement courte par rapport à la durée de vie. Pour *C. riparius*, ce pic de reproduction est unique et il survient à un âge donné. Chez *V. piscinalis*, et *B. sowerbyi*, les pics de reproduction se succèdent régulièrement dans le temps, selon un rythme donné. Les populations de nos trois espèces sont donc de type « birth pulse ». La position des pics de reproductions dans le pas de temps dépend de l'instant auquel on recense la population (Charles, 2004). Les recensements peuvent être effectués soit juste avant la reproduction (« pre-breeding census »), soit juste après la reproduction (« post-breeding census »). Ce choix est purement mathématique : il conduit à des écritures différentes du modèle matriciel. Dans notre cas, nous choisissons le recensement avant la reproduction. Ceci implique que le taux d'éclosion des œufs est compris dans la valeur de fécondité des femelles : cela simplifie le modèle, car il n'y a pas besoin de créer une classe d'âge pour décrire la survie des embryons (alors que c'est le cas si l'on recense les organismes juste après la reproduction).

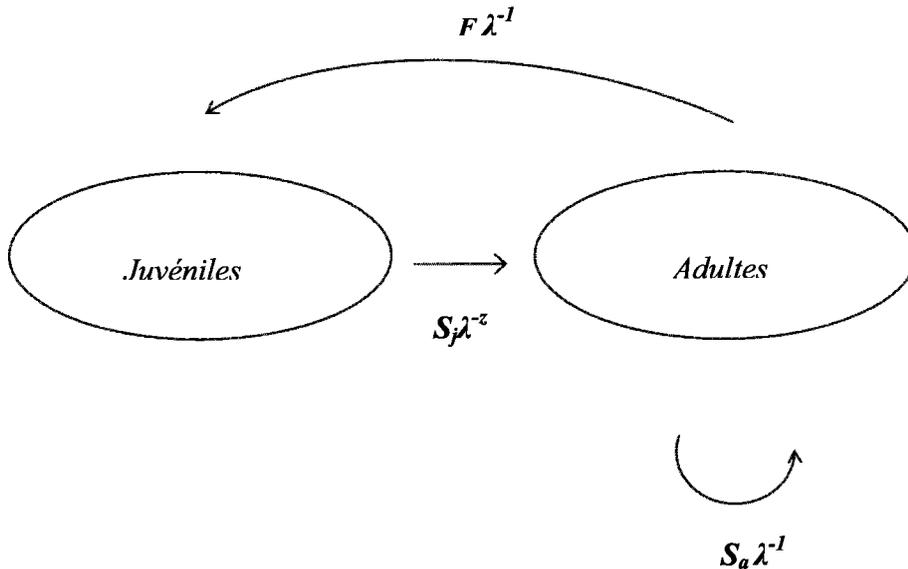
La taille de la matrice dépend du nombre de classes d'âge pris en compte. Ce critère est généralement défini en fonction de l'âge, de la taille de l'organisme ou du nombre de stades de développement. Dans notre cas, les espèces choisies présentent un nombre de stades de développement différents. Le nombre total de stades de développement ne peut donc pas être utilisé comme critère de construction des classes d'âge si nous désirons travailler pour nos trois espèces avec des matrices de même taille.

Afin de résoudre ce problème, nos matrices ne comprennent que deux classes d'âge, qui correspondent aux deux phases du cycle de vie communes à nos trois espèces : les juvéniles et les adultes. Nous ne définissons pas de classe d'âge « embryon », car leur survie est intégrée dans la fonction de maternité des adultes : nos organismes naissent donc en tant que juvéniles. Cette représentation de la population est particulièrement bien adaptée à l'évaluation des effets des polluants sur le taux de croissance des populations car, d'après Levin *et al.* (1996), Caswell (2001) et Oli (2003a) :

- elle est plus simple, donc plus facilement utilisable, que le modèle âge-structuré complet (équation 46) ;
- elle est aussi fiable pour estimer le taux de croissance de la population que le modèle complet ;
- elle permet de prendre en compte de façon explicite l'âge auquel la maturité sexuelle est atteinte (ce qui n'est pas possible avec le modèle complet), paramètre important

dans le cadre de l'étude des effets de polluants qui sont susceptibles de modifier cette variable.

Le graphe d'histoire de vie correspondant à ces hypothèses est présenté en figure 91. Ce graphe décrit de façon simplifiée le cycle de vie d'un individu dans la population de laboratoire au cours du temps.



S_j : probabilité de survivre de la naissance à la puberté ;

S_a : probabilité de survie journalière au stade adulte ;

λ : taux de croissance journalier de la population ;

z : âge à la première reproduction ;

F : taux de reproduction journalier moyen d'un adulte *i.e.* nombre de descendants femelles viables produit quotidiennement par femelle adulte.

Figure 91. Graphe d'histoire de vie du modèle matriciel à deux classes d'âge proposé par Levin et al., (1996).

Suivant ces hypothèses, l'équation caractéristique permettant le calcul du taux d'accroissement de la population λ est (Levin *et al.*, 1996) :

$$\lambda^{z+1} - S_a \lambda^z - S_j F = 0 \quad (47)$$

avec :

- S_j la probabilité pour un juvénile de survivre de la naissance à la puberté ;
- z âge à la première reproduction ;
- F la fécondité journalière des adultes ;
- S_a la probabilité journalière de survie pour un adulte.

Ce modèle biodémographique va nous permettre de calculer des taux de croissance journaliers (λ) dans les populations de nos trois espèces. Seuls les paramètres du modèle varient d'une espèce étudiée à l'autre. Pour une même espèce, ces paramètres varient aussi en fonction de la concentration en zinc dans le milieu.

Les effets des toxiques affectent les taux de survie, de croissance (et donc la durée du stade juvénile) et de fécondité des organismes. Il est nécessaire de résoudre autant d'équations caractéristiques (46) que de concentrations étudiées afin de tracer une courbe concentration-réponse à l'échelle de la population. La gamme de concentration choisie pour l'étude des effets du zinc sur la population est choisie de manière à recouvrir l'ensemble des effets observés sur la survie, la croissance et la reproduction des individus de nos trois espèces. Ainsi, nous choisissons de travailler dans l'intervalle [0 ; 3000] mg Zn/kg de sédiment sec, avec une raison arithmétique de 100 mg/kg. Les équations correspondant à chaque concentration sont générées grâce à un programme informatique, qui fournit aussi la valeur du taux d'accroissement journalier de la population (λ). Ceci nous permet de simuler la diminution du taux de croissance journalier de la population en fonction de la concentration en zinc dans la gamme de concentrations choisie.

Chez les espèces bi-sexuées, comme le chironome, seuls les effets sur les femelles sont pris en compte. Ceci implique de faire l'hypothèse que si la fertilité des mâles est affectée par la présence de toxique, ceci n'engendre pas pour autant d'effets significatifs sur la fécondité du couple. Cette hypothèse a été vérifiée chez *C. tentans* (Benoit *et al.*, 1997 ; Sibley *et al.*, 1997), et nous supposons qu'elle s'applique chez *C. riparius*. Chez les espèces hermaphrodites, comme *V. piscinalis* et *B. sowerbyi*, tous les organismes adultes sont capables de pondre des œufs. Nous considérons donc que les effets potentiels sur la reproduction de tous les individus de la population sont équivalents. Les effets du zinc sur le taux de croissance journalier de la population λ sont quantifiés de manière relative, en comparant les valeurs obtenues dans les populations exposées à la gamme de variation des taux de croissance journaliers des populations de témoins.

En associant aléatoirement les valeurs des paramètres de l'équation caractéristique (47) obtenues grâce à différents tests réalisés en conditions témoins, nous pouvons générer une distribution théorique des taux de croissance journaliers des populations témoins dans nos

conditions expérimentales. Afin de déterminer cette distribution théorique, nous utilisons la même démarche pour nos trois espèces :

- nous recensons tout d'abord l'ensemble des valeurs de paramètres du cycle de vie de nos organismes (survie, croissance et reproduction) en conditions témoins dont nous disposons. Le rythme de croissance est représenté par un événement ponctuel qui rend compte de la vitesse globale du développement *i.e.* le temps moyen d'émergence chez le chironome, et la date de première reproduction chez *V. piscinalis* et *B. sowerbyi* ;
- pour chaque paramètre (survie, croissance et reproduction), nous tirons une valeur au hasard dans l'ensemble des valeurs chez les témoins. Nous répétons cette opération jusqu'à ce que nous ayons obtenu toutes les combinaisons possibles des 3 paramètres chez les témoins ;
- nous calculons le taux de croissance journalier théorique de la population correspondant à chacune de ces combinaisons ;
- en dernier lieu, nous calculons la moyenne et l'écart type des taux de croissance journaliers théoriques obtenus, et vérifions que leur distribution est gaussienne. A partir de ces données, nous pouvons calculer l'intervalle de confiance à 95% autour de la moyenne de ces taux de croissance théoriques.

Ce travail n'a été réalisé que sur les populations témoins (par manque de données pour les populations exposées). Nous ne possédons donc pas d'intervalle de confiance sur les valeurs de λ prédites dans les populations exposées au zinc. Cependant, un simple test d'hypothèse permet de savoir si le taux de croissance de la population observé pour une concentration environnementale donnée (λ_{ce}) appartient ou non à la distribution théorique du taux de croissance des populations témoins ($\lambda_{théo}$). Si λ_{ce} appartient à la distribution de $\lambda_{théo}$, alors nous considérons que λ_{ce} n'est pas significativement différent de $\lambda_{théo}$.

5. PARAMETRAGE DU MODELE BIODEMOGRAPHIQUE

Dans ce paragraphe, nous expliquons comment nous avons calculé la valeur des différents paramètres de l'équation caractéristique (survie globale au stade juvénile, survie journalière adulte, fécondité et âge à la première reproduction) pour une concentration en toxique c_e dans le milieu, pour chacune des espèces étudiées.

5.1. *Chironomus riparius*

5.1.1. Calcul des paramètres de survie

Le chironome étant une espèce semelpare, nous supposons que chaque individu meurt après s'être reproduit. Par ailleurs, nous supposons que les organismes se reproduisent tous durant leur premier jour de vie adulte, ce qui est réaliste dans nos conditions expérimentales pour notre population de laboratoire (voir chapitre III). Ainsi, dans nos modèles, la durée de vie d'un adulte pour le chironome est de 1 jour quelle que soit la concentration en zinc dans le milieu. Ceci se traduit par :

$$\boxed{S_a = 0} \quad (48)$$

avec S_a la survie journalière des adultes.

La survie embryonnaire et la survie des larves de premier stade sont des constantes prises en comptes dans le taux de fécondité des adultes (voir paragraphe 5.1.3.).

D'après les résultats de nos tests de toxicité, le taux de survie moyen journalier des larves de quatrième stade est estimé à 100% dans la gamme de concentration [0 ; 3000] mg zinc/kg sédiment sec.

Les taux de survie moyens journaliers des larves de second et troisième stades et des nymphes varient selon la concentration en zinc dans le sédiment. Par ailleurs, chacun de ces stades de développement présente une sensibilité différente au zinc. Afin de calculer la probabilité de survie de la naissance à la maturité sexuelle, il est donc nécessaire de prendre

en compte le fait que la réponse biologique des larves à une concentration donnée en zinc varie selon leur stade de développement (Munns *et al.*, 1997).

Pour cela, nous calculons indépendamment la survie d'un juvénile au cours de chaque stade de développement (larves et nymphes). Pour ce faire, nous utilisons notre modèle d'effets sur la survie au niveau individuel : nous obtenons ainsi un taux de survie journalier en fonction de la concentration en zinc. Afin de calculer la survie sur l'ensemble du stade de développement, nous devons estimer la durée de ce stade en fonction de la concentration en zinc grâce à nos modèles de croissance (voir paragraphe 5.1.2.). Ensuite, nous utilisons ces taux de survie « stade spécifique » pour calculer la probabilité de survie d'un juvénile depuis le début du second stade larvaire jusqu'à l'émergence.

Les taux de survie journaliers des larves de second et de troisième stade sont calculés grâce au modèle d'effets sur la survie DEBtox:

$$\begin{cases} S(t) = e^{-kt} & \text{si } c_{i(t)} < CSE_s \\ S(t) = e^{-[kt+bt(c_{i(t)}-CSE_s)]} & \text{si } c_{i(t)} > CSE_s \end{cases} \quad (27)$$

avec :

- k le taux de mortalité en absence de toxique ;
- b le taux de toxicité du zinc pour la survie ;
- $c_{i(t)}$ la concentration interne en zinc (approchée par la concentration en zinc dans le milieu (c_e) puisque la cinétique du zinc est rapide chez le chironome, voir chapitre III) ;
- CSE_s la concentration sans effet sur la survie.

Ce modèle est paramétré à partir des données acquises lors des tests toxicité (tableau XXXV).

Tableau XXXV. Valeurs des paramètres du modèle d'effets du zinc sur la survie utilisés pour prédire les taux de survie journaliers du chironome exposé au zinc.

<i>Paramètre du modèle survie</i>	<i>Valeur 2^{ème} stade</i>	<i>Valeur 3^{ème} stade</i>
k	0,070	0,053
b	0,00010	0,00025
CSE_s	413	827

Les taux de survie des nymphes ($S_n(t)$) sont prédits à partir d'une relation concentration-réponse de type logistique, dont l'équation est obtenue à partir des données issues des tests de toxicité :

$$S_n = \frac{1}{1 + (c_e / LC_{50})^h} \quad (49)$$

avec :

- c_e la concentration en zinc dans le sédiment ;
- LC_{50} la concentration en zinc provoquant la mortalité de 50% des nymphes ;
- h le nombre de Hill (estimé à 8,18 d'après nos expériences).

5.1.2. Calcul de l'âge à la première reproduction

L'âge à la première reproduction correspond à la durée du stade juvénile. Ce paramètre varie selon la concentration en toxique dans le milieu. Comme pour la survie, les juvéniles présentent des réponses biologiques au zinc différentes selon leur stade de développement. Le calcul de la durée du stade juvénile nécessite donc d'estimer de façon indépendante les effets du zinc sur la croissance pour chaque stade de développement.

Les œufs et les larves de premier stade ne vivent pas au contact du sédiment, leur durée de développement est constante dans nos conditions expérimentales. Les œufs mettent 2 jours à éclore. Par ailleurs, le taux de croissance journalier des larves de premier stade est fixé à 0,8 mm/jour (valeur mesurée dans l'élevage). A ce rythme, le second stade est atteint au bout de 2 jours. Ces 4 jours sont ajoutés en tant que constante à la durée du second stade larvaire.

La durée des 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} stades larvaires (ou temps de résidence Tr dans un stade larvaire donné) est calculée à partir des taux de croissance journaliers des larves en milieu contaminé (spécifiques du stade de développement et de la concentration c_e testée), et des tailles des organismes en début et fin de stade :

$$T_r = \frac{l_f - l_i}{\gamma_{ce}} \quad (50)$$

- avec :
- l_i la taille en début de stade larvaire ;
 - l_f la taille en fin de stade larvaire ;
 - γ_{ce} le taux de croissance journalier des larves.

Dans nos conditions expérimentales, les tailles en début et fin de stade sont des constantes (tableau XXXVI).

Tableau XXXVI. Tailles des chironomes en début et fin de stade larvaire

Stade larvaire	2	3	4	Taille maximale (fin 4 ^{ème} stade)
Taille initiale (mm)	1,8	2,8	5,4	Femelle : 13,7 Mâle : 11,4

Les taux de croissance journaliers des larves exposées au zinc (γ_{ce}) varient en fonction de la concentration. Ils sont modélisés à partir des mesures de longueur réalisées durant le test de toxicité, grâce au modèle d'effets supposant que les effets du zinc sur le chironome sont la conséquence d'une augmentation des coûts de fabrication de biomasse :

$$\begin{cases} \gamma_{ce} = \gamma_0 & \text{si } c_{i(t)} < CSE_c \\ \gamma_{ce} = \frac{\gamma_0}{1 + b(c_{i(t)} - CSE_c)} & \text{si } c_{i(t)} > CSE_c \end{cases} \quad (51)$$

avec :

- l la longueur des organismes ;
- b le taux de toxicité du zinc pour la croissance ;
- $c_{i(t)}$ la concentration interne en zinc (approchée par la concentration en zinc dans le milieu (c_e) puisque la cinétique du zinc est rapide chez le chironome, voir chapitre III) ;
- CSE_c la concentration sans effet sur la croissance.

Ce modèle est paramétré à partir des données acquises lors des tests toxicité (tableau XXXVII)

Tableau XXXVII. Valeurs des paramètres du modèle d'effets du zinc sur la croissance utilisées pour prédire les taux de croissance journaliers du chironome exposé au zinc.

Paramètre du modèle de croissance	Valeur 2 ^{ème} stade	Valeur 3 ^{ème} stade	Valeur 4 ^{ème} stade
b	0,002	0,0006	0,012
CSE_c	695	900	900

Pour les nymphes, le temps de résidence correspond à la durée moyenne de la nymphose. Dans nos conditions expérimentales, cette durée est une constante estimée à 1 jour (Péry, 2003).

D'après ces résultats, l'âge à la première reproduction (z) chez les chironomes exposés au zinc s'écrit :

$$z = 4 + T_{r2} + T_{r3} + T_{r4} + D + 1 \quad (52)$$

avec T_{rx} le temps de résidence dans le stade larvaire x et D la durée entre la fin de la croissance et la nymphose ($D = 5$ dans nos conditions expérimentales).

5.1.3. Calcul du taux de reproduction moyen d'un adulte

Le taux de reproduction moyen d'un adulte au temps $t+1$ dépend, pour une concentration c_e donnée en zinc :

- de sa probabilité de rencontrer un autre adulte au temps t (PR_{ce}) ;
- de sa fécondité journalière moyenne (m_{ce}) ;
- de la probabilité de survivre depuis la ponte jusqu'au début du 2^{ème} stade larvaire (S_{L1}).

Rappelons que seules les femelles sont prises en compte dans notre population de chironomes. Le taux de reproduction moyen d'un adulte au temps $t+1$ dépend donc aussi du sexe ratio (s) de la population. Finalement, ce taux de reproduction, noté F_{ce} , s'écrit :

$$F_{ce} = PR_{ce} \times m_{ce} \times S_{L1} \times s \quad (53)$$

Les valeurs de PR_{ce} et m_{ce} sont modélisées à partir des données acquises lors des tests toxicité, grâce au modèle de rencontre et au modèle d'effets sur la reproduction supposant une augmentation des coûts de fabrication des œufs :

$$\begin{cases} m_{ce} = m_0 & \text{si } c_{i(t)} < CSE_r \\ m_{ce} = \frac{m_0}{1 + b(c_{i(t)} - CSE_r)} & \text{si } c_{i(t)} > CSE_r \end{cases} \quad (54)$$

avec :

- m_0 la fécondité journalière des témoins ;
- b le taux de toxicité du zinc pour la reproduction ;
- $c_{i(t)}$ la concentration interne en zinc (approchée par la concentration en zinc dans le milieu (c_e) puisque la cinétique du zinc est rapide chez le chironome, voir chapitre III) ;
- CSE_r la concentration sans effet sur la reproduction.

Le modèle est paramétré à partir des données acquises lors des tests de toxicité (tableau XXXVIII)

Tableau XXXVIII. Valeurs des paramètres du modèle d'effets du zinc sur la reproduction utilisées pour prédire la fécondité du chironome exposé au zinc.

<i>Paramètre du modèle survie</i>	<i>Valeur</i>
m_0	495,3
b	0,00053
CSE_r	0

La progéniture des femelles n'ayant pas été sexée à l'issue des tests de reproduction, le sexe ratio est calculé d'après nos données d'émergences (Sibley *et al.*, 1997). La valeur obtenue n'est pas significativement différente de 1 (Test du Chi-deux, $p < 0,05$). Il faut donc diviser le nombre d'œufs produits par 2 pour obtenir le nombre de descendants femelles.

Par ailleurs, les embryons et les larves de premier stade n'étant pas au contact du sédiment pollué durant les tests, leurs taux de survie sont des constantes. La probabilité de survivre depuis la ponte jusqu'au début du stade larvaire (S_{LI}) dans nos conditions expérimentales a été estimée à 0,5 (Péry, 2003). D'après ces informations, le taux de reproduction journalier des adultes s'écrit :

$$F_{ce} = \frac{PR_{ce} \times m_{ce}}{4} \quad (55)$$

- avec : - PR_{ce} la probabilité de rencontre mâle/femelle pour une concentration c_e donnée ;
 - m_{ce} la fécondité journalière.

5.2. *Valvata (Cincinna) piscinalis*

5.2.1. Calcul des paramètres de survie

Le taux de survie des juvéniles (S_j) varie selon la concentration en zinc dans le sédiment. Il peut être prédit grâce à notre modèle d'effets sur la survie individuelle. Ce modèle est le même que celui que nous utilisons pour décrire la survie des chironomes (voir équation 26). Il est paramétré à partir des données de survie acquises lors des tests toxicité avec *V. piscinalis* (tableau XXXIX).

Tableau XXXIX. Valeurs des paramètres du modèle d'effets du zinc sur la survie utilisés pour prédire les taux de survie journaliers des juvéniles de *Valvata (Cincinna) piscinalis* exposés au zinc.

<i>Paramètre du modèle survie</i>	<i>Valeur</i>
<i>k</i>	0,0055
<i>b</i>	0,0002
CSE_s	1407

D'après nos résultats de tests de toxicité, le zinc ne provoque pas d'effets significatifs sur la survie des adultes aux concentrations testées. Le taux de survie journalier des adultes peut donc être prédit par le modèle de Weibull, que nous avons utilisé pour prédire la survie journalière des organismes en conditions témoins (voir chapitre III). Ce modèle prévoit que seuls 1% des adultes de la population témoin survivent plus de 617 jours.

Afin de simplifier nos modèles, nous ne tenons pas compte de l'accélération de la mortalité liée au vieillissement des organismes. Le taux de survie journalier des adultes (S_a) est donc une constante qui s'écrit en fonction de la durée de vie maximale des adultes :

$$S_a = \sqrt[617]{0,01} \quad (56)$$

$$\text{soit } S_a = 0,9926 \quad (57)$$

5.2.2. Calcul de l'âge à la première reproduction

Dans notre modèle, la transition de l'état juvénile à l'état adulte correspond au début de la première reproduction.

Nous avons vu au chapitre III que pour être pubère, il faut que l'organisme mesure au moins 3 mm. Chez les témoins, l'âge de première reproduction correspond à l'âge à la puberté. Nous fixons donc la transition des organismes de la classe juvénile vers la classe adulte au moment où ils atteignent la taille à la puberté. Cette approche est similaire à celle utilisée pour le chironome.

En revanche, nous avons vu au chapitre IV que les individus pubères exposés au zinc retardent leur première reproduction par rapport aux témoins. L'âge de première reproduction chez les individus exposés au zinc est donc plus élevé que leur âge à la puberté.

D'après les résultats de nos tests de toxicité, le retard entre le début de la reproduction chez les témoins et chez les organismes exposés dépend linéairement de la concentration en zinc dans le milieu. Pour une concentration donnée en zinc (ce), ce retard (R_{ce}) s'écrit :

$$\begin{cases} R_{ce} = 0 & \text{si } ce < Cs_{dr} \\ R_{ce} = 0,025 \times (ce - Cs_{dr}) & \text{si } ce > Cs_{dr} \end{cases} \quad (58)$$

avec Cs_{dr} la concentration au-delà de laquelle le zinc provoque un retard du début de la première reproduction des organismes pubères. D'après nos tests, $Cs_{dr} = 846$ mg/kg.

La durée du stade juvénile chez les organismes exposés au zinc se calcule en ajoutant ce retard à la première reproduction à l'âge à la puberté. Ce dernier dépend de la concentration (ce) en zinc dans le milieu, du taux de croissance journalier moyen en présence de toxique, de la taille à la naissance, de la taille à la puberté et de la taille asymptotique des organismes. Ces tailles sont des constantes, estimées respectivement à 0,55 ; 3 et 4,85 mm dans nos conditions expérimentales.

L'âge à la première reproduction (z) est calculé à partir de l'équation qui décrit la croissance des gastéropodes (modèle de Von Bertalanffy), et s'écrit donc:

$$z = -\frac{1}{\gamma_{ce}} \times \ln \left[\frac{4,85 - 3}{4,85 - 0,55} \right] + R_{ce} \quad (59)$$

avec :

- γ_{ce} le taux de croissance de Von Bertalanffy en présence de toxique ;
- R_{ce} le retard entre le début de la reproduction chez les témoins et chez les organismes exposés à une concentration c_e en zinc.

La valeur du paramètre γ_{ce} pour une concentration donnée en zinc est prédite à partir des mesures de longueur réalisées durant les tests de toxicité, grâce au modèle d'effets supposant que les effets du zinc sur le gastéropode sont la conséquence d'une augmentation des coûts de fabrication de biomasse :

$$\begin{cases} \gamma_{ce} = \gamma_0 & \text{si } c_{i(t)} < CSE_c \\ \gamma_{ce} = \gamma_0 \times \frac{1+g}{1+g \times \left[1 + \frac{c_{i(t)} - CSE_c}{tc} \right]} & \text{si } c_{i(t)} > CSE_c \end{cases} \quad (60)$$

avec :

- γ_0 le taux de croissance journalier des témoins ;
- g le ratio d'investissement pour la croissance (fixé à 1 en conditions d'alimentation *ad libitum*) ;
- tc la concentration tolérée ;
- $c_{i(t)}$ la concentration interne en zinc (approchée par la concentration en zinc dans le milieu puisque la cinétique du zinc est rapide chez *V. piscinalis*) ;
- CSE_c la concentration sans effet sur la croissance.

Le modèle est paramétré à partir des données acquises lors des tests de toxicité (tableau XL)

Tableau XL. Valeurs des paramètres du modèle d'effets du zinc sur la croissance utilisés pour prédire les taux de croissance journaliers des juvéniles de *Valvata (Cincinna) piscinalis* exposés au zinc.

<i>Paramètre du modèle de croissance</i>	<i>Valeur</i>
γ_0	0,0208
t_c	387
CSE_c	77

5.2.3. Calcul du taux de reproduction moyen d'un adulte

Nos tests ayant duré au maximum 202 jours, nous ignorons le nombre de reproductions réalisées entre la fin du test et la mort de l'organisme. Nous ne pouvons pas le prédire de façon fiable, car la durée d'une reproduction est très variable dans nos conditions expérimentales témoins (de 22 à 71 jours selon le test) et qu'elle est rallongée en présence de zinc dans le sédiment. Par ailleurs, nous ignorons l'âge de dernière reproduction. Il nous manque donc deux paramètres biodémographiques pour l'étude de la dynamique de la population chez *V. piscinalis*. Ce problème est très fréquent pour les organismes à cycle de vie long (Oli, 2003a).

Afin de calculer le taux de reproduction journalier moyen d'un adulte, nous faisons les hypothèses suivantes :

- puisque nous ne connaissons pas le nombre de reproductions réalisées par l'organisme, nous supposons que *V. piscinalis* se reproduit durant toute sa durée de vie adulte. Une approche similaire a été utilisée par Lande (1988) et Caswell (1989).
- nous supposons que la fécondité journalière moyenne est une valeur constante, caractéristique pour chaque concentration en zinc. Cette valeur est estimée à partir de la durée du test, de l'âge de première reproduction et du nombre total d'œufs pondus durant ce test pour une concentration donnée.

Le taux de reproduction moyen d'un adulte au temps t dépend de sa fécondité journalière (m_{ce}) et du taux de survie des embryons (S_e) :

$$F_{ce} = m_{ce} \times S_e \quad (61)$$

Pour une concentration en zinc donnée, la fécondité journalière (m_{ce}) s'écrit :

$$\begin{cases} m_{ce} = m_0 & \text{si } c_{i(t)} < CSE_r \\ m_{ce} = \frac{m_0}{1 + (c_{i(t)} - CSE_r) / tc} & \text{si } c_{i(t)} > CSE_r \end{cases} \quad (62)$$

avec :

- m_0 la fécondité journalière des témoins au cours du test ;

- $c_{i(t)}$ la concentration interne en zinc (approchée par la concentration en zinc dans le milieu puisque la cinétique du zinc est rapide chez *V. piscinalis*) ;
- t_c la concentration tolérée ;
- CSE_r la concentration sans effet sur la reproduction.

Ce modèle est paramétré à partir des données acquises lors des tests de toxicité (tableau XLI)

Tableau XLI. Valeurs des paramètres du modèle d'effets sur la reproduction utilisées pour prédire la fécondité de *Valvata (Cincinna) piscinalis* en fonction de la concentration en zinc

<i>Paramètre du modèle survie</i>	<i>Valeur</i>
m_0	2,7
t_c	111
CSE_r	628

Le taux de survie des embryons ne dépend pas de la concentration en zinc, puisque les œufs ne sont pas exposés au sédiment pollué. D'après les tests réalisés en milieu non contaminé, il est estimé à 94,3%.

Le taux de reproduction journalier moyen (F_{ce}) s'écrit donc :

$$F_{ce} = 0,94 \times m_{ce} \quad (63)$$

5.3. *Branchiura sowerbyi*

5.3.1. Calcul des paramètres de survie

Le taux de survie moyen journalier des juvéniles varie selon la concentration en zinc dans le sédiment. Il peut être prédit grâce à notre modèle d'effets sur la survie individuelle. Ce modèle est identique à celui que nous avons utilisé pour décrire la survie des larves de chironome et des juvéniles de *C. riparius* et *V. piscinalis* (équation 27). Il est paramétré pour *B. sowerbyi* à partir des données acquises lors des tests de survie des organismes âgés de moins de 42 jours (tableau XLII).

Tableau XLII. Valeurs des paramètres du modèle d'effets du zinc sur la survie utilisés pour prédire les taux de survie journaliers des juvéniles de *Branchiura sowerbyi* exposés au zinc.

Paramètre du modèle survie	Valeur
k	0,0012
b	0,00003
CSE_s	1929

Par ailleurs, nous avons vu au chapitre IV que le zinc ne provoque pas d'effets significatifs sur la survie des adultes de *B. sowerbyi* aux concentrations testées. Le taux de survie journalier des adultes peut donc être estimé de la même façon que celui des adultes de *V. piscinalis* : nous considérons que le taux de survie journalier des adultes ne dépend pas de leur âge et qu'il s'écrit en fonction de la durée de vie maximale des organismes. Cette durée de vie correspond au temps au bout duquel seuls 1% des organismes de notre population sont encore en vie, soit 1097 jours d'après le modèle de Weibull en conditions témoins. Le taux de survie journalier des adultes (S_a) s'écrit donc :

$$S_a = \sqrt[1097]{0,01} \quad (64)$$

$$\text{soit } \boxed{S_a = 0,9958} \quad (65)$$

5.3.2. Calcul de l'âge à la première reproduction

Le zinc n'entraîne pas de retard du début de la première reproduction chez *B. sowerbyi*. La transition de l'état juvénile vers l'état adulte survient donc lorsque les juvéniles atteignent la puberté. Cette situation est identique à celle que nous avons rencontrée pour le chironome.

Chez les juvéniles, la présence de zinc ralentit la vitesse de croissance, ce qui se traduit par un allongement de la durée nécessaire pour atteindre la puberté. La durée du stade juvénile s'écrit donc en fonction du taux de croissance journalier moyen en présence de toxique, de la taille asymptotique, de la taille à la naissance et à la puberté. Ces tailles sont des

constantes, estimées respectivement à 5,61 ; 1,37 et 4,38 g^{1/3} dans nos conditions expérimentales.

Le paramètre $\gamma(t)$ est prédit à partir des mesures de poids réalisées durant les tests de toxicité, grâce au modèle d'effets supposant que les effets du zinc sur le *B. sowerbyi* sont la conséquence d'une augmentation des coûts de fabrication de biomasse. Ce modèle est similaire à celui que nous avons utilisé pour prédire le taux de croissance de Von Bertalanffy chez *V. piscinalis* (voir l'équation 67).

Il est paramétré à partir des données acquises lors des tests toxicité (tableau XLIII). Notons qu'ici il est nécessaire d'utiliser le modèle de cinétique car le taux d'élimination du zinc (k_e) est faible : la concentration interne normalisée ($c_{i(t)}$) ne peut donc pas être approchée par la concentration externe en zinc c_e (Kooijman et Bedaux, 1996).

Tableau XLIII. Valeurs des paramètres du modèle d'effets du zinc sur la croissance utilisés pour prédire les taux de croissance journaliers des juvéniles de *Branchiura sowerbyi* exposés au zinc.

<i>Paramètre du modèle de croissance</i>	<i>Valeur</i>
γ_0	0,0395
t_c	60
CSE_c	188
k_e	0,0098

5.3.3. Calcul du taux de reproduction moyen d'un adulte

Comme pour *V. piscinalis*, nous ignorons le nombre de reproductions réalisées entre la fin du test et la mort de l'organisme et ne pouvons pas le prédire de façon fiable. Par ailleurs, nous ignorons l'âge de dernière reproduction.

Afin de calculer le taux de reproduction journalier moyen d'un adulte, nous supposons donc que *B. sowerbyi* se reproduit durant toute sa durée de vie adulte, et que sa fécondité journalière moyenne est une valeur constante. Comme pour *V. piscinalis*, le taux de reproduction moyen d'un adulte au temps t dépend de sa fécondité journalière (m_{ce}) et du taux de survie des embryons (S_e) (équation 61).

D'après les résultats de nos tests de toxicité, la présence de zinc aux concentrations testées ne provoque pas d'effets significatifs sur la fécondité de *B. sowerbyi*. La fécondité journalière des organismes est donc estimée en conditions témoins à partir des résultats du test de reproduction :

$$m = \frac{m_{0(d)}}{d} \quad (66)$$

avec :

- $m_{0(d)}$ la fécondité cumulée des témoins au bout d'un temps d ;
- d la durée de vie adulte au cours du test de reproduction.

Dans notre cas, $m_{0(d)} = 34,5$ et $d = 128$. D'après ces valeurs :

$$m = 0,27 \text{ œufs/individu/jour} \quad (67).$$

Nous ne pouvons pas utiliser les données de notre test de survie embryonnaire en milieu contaminé pour estimer le paramètre S_e , car ces données sont trop peu fiables (voir chapitre IV). Par défaut, nous utilisons donc la valeur de S_e estimée en conditions témoins. Ceci implique que nous ne tenons pas compte des éventuels effets du zinc sur la survie embryonnaire de *B. sowerbyi* dans notre modèle d'effets sur la population. D'après les tests réalisés en milieu non contaminé, S_e est estimé à 31,7 %. Le taux de reproduction journalier moyen (F_0), s'écrit donc :

$$F_0 = 0,27 \times 0,317 \quad (68)$$

$$\text{soit } \boxed{F_0 = 0,086 \text{ nouveau-nés/adulte/jour}} \quad (69).$$

6. ETUDE DE SENSIBILITE

L'analyse de sensibilité permet de quantifier les effets de la perturbation d'un ou de plusieurs paramètres de la matrice L sur l'estimation du taux d'accroissement de la population (Charles, 2004). Cette analyse permet de mettre en évidence quels sont les paramètres du cycle de vie dont la modification par le toxique engendre le plus d'effets sur le taux de croissance journalier des populations pour nos trois espèces, en lien avec leur stratégie d'histoire de vie.

Notre analyse de sensibilité consiste à simuler successivement la réponse du taux de croissance journalier de la population (λ) à une perturbation de même intensité de chacun des paramètres individuels (*i.e.* survie, croissance et fécondité). Nous avons choisi d'évaluer l'effet d'une modification successive de 10% de chaque paramètre de la matrice sur la valeur de λ . La matrice est initialisée avec des paramètres moyens, calculés en prenant la moyenne de toutes les valeurs obtenues en conditions témoins au cours de ce travail. Nous comparons ensuite les valeurs de λ obtenues en modifiant tour à tour tous les paramètres de la matrice de 10% par rapport à sa valeur témoin. Cette étude comparative nous permet d'identifier le paramètre du cycle de vie qui a la plus d'impact sur la dynamique des populations de nos trois espèces.

7. EVALUATION DE LA TOXICITE AU NIVEAU DE LA POPULATION : APPLICATION EXPERIMENTALE

7.1. Effets du zinc sur les populations de *Chironomus riparius*

7.1.1. Gamme de variabilité du taux de croissance journalier dans les populations témoins

Le taux de croissance journalier théorique moyen a été estimé à 1,24 (IC_{95%} : [1,22 ; 1,27]). Ceci indique que les populations témoins sont dans une phase de croissance exponentielle de leur effectif (car $\lambda > 1$). Cette croissance s'explique par le fait que dans nos conditions expérimentales, les organismes ne sont limités ni en nourriture, ni en espace : les conditions environnementales sont donc très favorables au développement de la population.

D'après la valeur du λ théorique moyen, cette augmentation d'effectif est de 24% par jour. Ce résultat souligne le caractère opportuniste du chironome : cet organisme peut proliférer très rapidement lorsque l'habitat est favorable. Ces résultats sont comparables à ceux de Charles *et al.* (2004) : grâce à un modèle matriciel âge-structuré complet, ces auteurs ont mis en évidence une augmentation quotidienne de 29 % de l'effectif de populations de laboratoire de chironomes nourries *ad libitum* et ne subissant pas d'effet de la densité. Notre modèle à deux classes d'âge fournit donc des estimations de λ du même ordre de grandeur que celles obtenues avec le modèle complet.

De plus, la gamme de variation des taux de croissance journaliers des populations témoins est large, puisque λ varie entre 1,22 et 1,27. Cette variation constitue notre intervalle de confiance autour de la valeur de λ dans les populations témoins.

7.1.2. Effets du zinc sur le taux de croissance journalier des populations exposées au sédiment pollué.

Le résultat de nos simulations de la diminution du taux de croissance journalier de la population (λ) en fonction de la concentration en zinc est présenté en figure 92. Nous distinguons 3 « sections » dans cette courbe concentration-réponse. Ce profil de réponse peut être mis en lien avec les concentrations sans effet calculées pour les différents paramètres du cycle de vie mesurés au niveau individuel (chapitre IV).

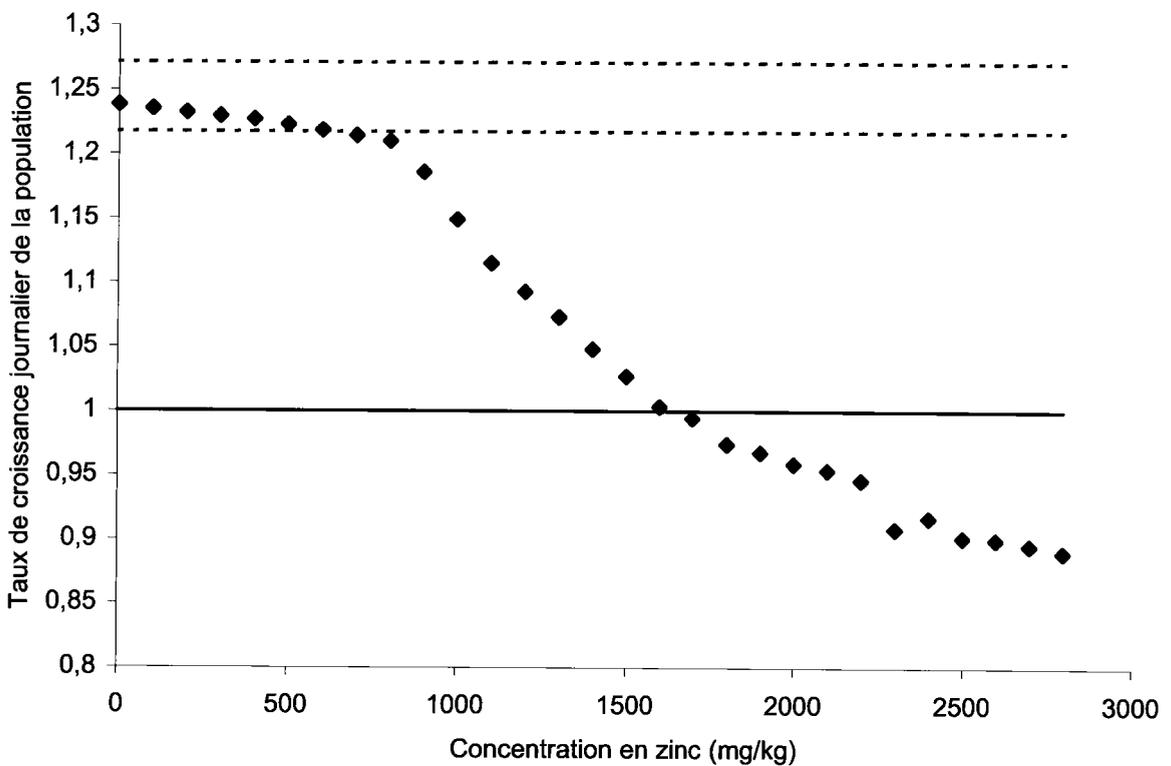


Figure 92. Evolution du taux de croissance journalier de la population de chironomes en fonction de la concentration en zinc dans le sédiment. Les lignes pointillées délimitent l'intervalle de confiance du taux de croissance des populations témoins. La ligne pleine situe le seuil à partir duquel la population est menacée d'extinction ($\lambda < 1$).

De 0 à 800 mg/kg, λ décroît linéairement lorsque la concentration en zinc augmente. La valeur de λ ne sort de la gamme de variabilité des témoins que pour des concentrations en zinc supérieures à 630 mg/kg, qui constitue donc notre concentration sans effet significatifs sur la population (CSESP). Cette réduction de λ est d'abord due à la diminution de la fécondité des organismes, car c'est le seul effet qui s'exerce sur les individus entre 0 et 413

mg/kg. La diminution de la survie au second stade larvaire, qui se manifeste pour des concentrations supérieures à 413 mg/kg provoque une aggravation des effets sur le taux de croissance journalier de la population (*i.e.* la pente de la courbe dose-réponse augmente entre 418 et 800 mg/kg). C'est le déclenchement d'un retard de croissance survenant au second stade pour des concentrations supérieures à 695 mg/kg qui fait sortir λ de la gamme de variation des témoins.

De 800 à 1300 mg/kg, λ décroît de façon plus drastique que dans la première partie de la courbe concentration-réponse. Cette aggravation des effets du zinc sur le taux de croissance journalier des populations est due :

- au déclenchement des effets sur la croissance des larves de 3^{ème} et de 4^{ème} stades, qui survient pour des concentrations supérieures à 900 mg/kg ;
- au déclenchement des effets sur la survie des larves de 3^{ème} stade observé pour des concentrations supérieures à 963 mg/kg ;
- à une diminution du succès à l'émergence des nymphes, qui est significative par rapport aux témoins dès 953 mg/kg.

De 1300 à 3000 mg/kg, ce sont principalement les effets sur la survie des nymphes qui influencent la réponse de la population à l'augmentation de la concentration en zinc dans le milieu. La mortalité des nymphes implique l'absence d'adultes dans notre population et donc l'impossibilité de se reproduire. La population n'est potentiellement menacée d'extinction que lorsque la concentration en zinc dans le sédiment dépasse 1640 mg/kg, concentration à laquelle moins de la moitié des nymphes parviennent à émerger (LC₅₀ émergence = 1588 mg/kg).

7.1.3. Analyse de sensibilité

Les résultats de l'analyse de sensibilité du taux de croissance journalier à la variation des paramètres du cycle de vie sont présentés dans le tableau XLIV.

Tableau XLIV. Résultats de l'analyse de sensibilité du taux de croissance journalier (λ) aux paramètres du cycle de vie pour le chironome. « SD » indique que la modification du paramètre génère une variation significative de λ par rapport au témoin.

<i>Paramètre du cycle de vie</i>	<i>Modification</i>	<i>Variation de λ obtenue¹</i>
Survie 2 ^{ème} stade		- 1,5% (SD)
Survie 3 ^{ème} stade	- 10%	- 1%
Survie 4 ^{ème} stade		- 4% (SD)
Survie des nymphes		-0,5 %
Durée du 2 ^{ème} stade		
Durée du 3 ^{ème} stade	+ 10%	0%
Durée du 4 ^{ème} stade		
Fécondité	- 10%	- 0,5%

^{1.} par rapport à la valeur témoin.

Nous avons vu au chapitre IV que la croissance est le paramètre pour lequel les effets du zinc sont les plus graves au niveau individuel chez le chironome. D'après notre analyse de sensibilité, une modification de 10 % de la durée du développement larvaire (quel que soit le stade touché) n'a pas d'influence sur la valeur de λ par rapport aux témoins.

Une modification de 10% de la fécondité aboutit à une réduction non significative du taux de croissance journalier de la population : les valeurs de λ obtenues restent dans l'intervalle de confiance des taux de croissance journaliers témoins.

C'est la modification de la survie qui génère le plus d'effets sur la valeur de λ . Remarquons ici que cet effet varie selon le stade de développement touché : par exemple, une diminution de 10 % de la survie des larves de 3^{ème} stade et des nymphes n'influence pas significativement la valeur de λ , tandis qu'une telle modification au 2^{ème} et au 4^{ème} stades génère une variation significative de λ .

C'est la survie au 4^{ème} stade dont la modification engendre les effets les plus significatifs sur le taux de croissance journalier de la population par rapport aux témoins. La survie au 4^{ème} stade larvaire est donc une variable cruciale pour la compréhension de la dynamique des populations de chironomes exposées au zinc.

Ce résultat corrobore les observations de Charles *et al.*, (2004) et Péry *et al.* (2004), qui ont étudié la dynamique de populations de *C. riparius* grâce à des modèles (respectivement matriciels et individus centrés) dans le cas d'une diminution de la quantité de

nourriture disponible. Ces auteurs ont montré que la survie au quatrième stade et la durée de ce stade sont les paramètres qui influencent le plus la dynamique de la population perturbée.

7.2. Effets du zinc sur les populations de *Valvata (Cincinna) piscinalis*

7.2.1. Gamme de variabilité du taux de croissance journalier dans les populations témoins

Le taux de croissance journalier théorique moyen a été estimé à 1,064. Comme pour le chironome, les populations témoins sont dans une phase de croissance exponentielle de leur effectif, car elles ne sont limitées ni en nourriture, ni en espace. D'après cette valeur, l'augmentation d'effectif dans la population est de 6,4 % par jour. Cette valeur est relativement élevée : elle peut être mise en relation avec les observations de Van den Berg *et al.* (1997), qui ont remarqué que *V. piscinalis* peut être très abondante localement (jusqu'à 5000 individus par m²) dans les habitats propices à son développement.

Les taux de croissance journaliers théoriques moyens des populations témoins varient de 1,056 à 1,072. Cette variation correspond à l'intervalle de confiance autour de la valeur de λ chez les témoins.

7.2.2. Effets du zinc sur le taux de croissance journalier des populations exposées au sédiment pollué

Le résultat de nos simulations de la diminution du taux de croissance journalier de la population (λ) en fonction de la concentration en zinc est présenté en figure 93. Nous distinguons 4 « sections » dans cette courbe concentration-réponse.

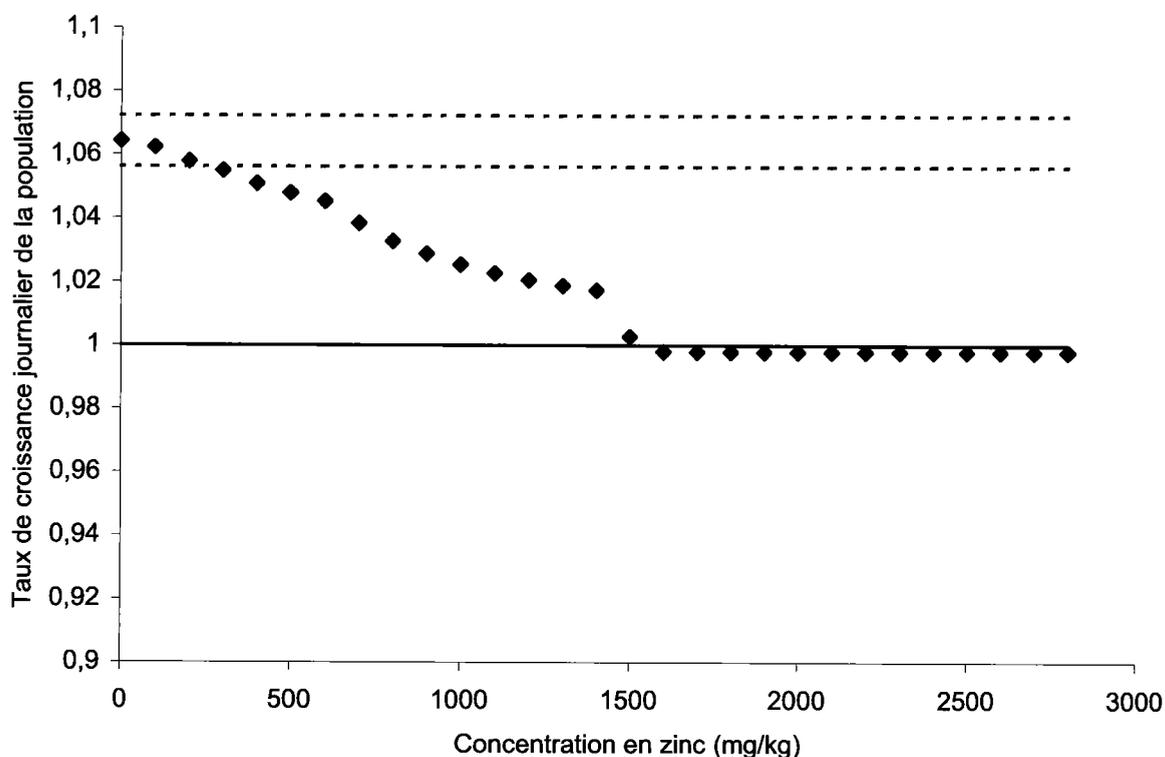


Figure 93. Evolution du taux de croissance journalier de la population de *Valvata (Cincinna) piscinalis* en fonction de la concentration en zinc dans le sédiment. Les lignes pointillées l'intervalle de confiance du taux de croissance des populations témoins. La ligne pleine situe le seuil à partir duquel la population est menacée d'extinction ($\lambda < 1$).

De 0 à 600 mg/kg, la valeur de λ diminue de façon linéaire avec la concentration en zinc. Cette diminution est due au déclenchement des effets sur la croissance des juvéniles, observés pour des concentrations en zinc supérieures ou égales à 77 mg/kg. Toutefois, λ ne sort de l'intervalle de confiance des témoins que lorsque la concentration en zinc dans le milieu dépasse 259 mg/kg. Cette concentration constitue donc notre concentration sans effet significatif sur la population de *V. piscinalis*. De 600 à 1400 mg/kg, λ décroît de façon plus rapide avec la concentration en zinc. Cette intensification des effets sur le taux de croissance journalier de la population est due aux effets sur la reproduction des individus. En effet, nous avons observé que :

- la diminution de la fécondité des adultes est observée dès 628 mg/kg ;
- le retard à la première reproduction chez les individus pubères survient pour des concentrations supérieures ou égales à 846 mg/kg.

Le taux de croissance journalier de la population diminue de façon drastique lorsque la concentration en zinc atteint 1400 mg/kg, concentration à laquelle se déclenchent les effets

sur la survie des juvéniles. La population est potentiellement menacée d'extinction lorsque la concentration en zinc dans le milieu atteint 1600 mg/kg. Dans ce cas, λ tend vers la valeur la plus faible possible pour nos conditions expérimentales, soit 0,993 (valeur qui correspond au taux de survie des adultes, constante indépendante des effets toxiques dans notre modèle pour *V. piscinalis*).

7.2.3. Analyse de sensibilité

Les résultats de l'analyse de sensibilité du taux de croissance journalier à la variation des paramètres du cycle de vie sont présentés dans le tableau XLV.

Tableau XLV. Résultats de l'analyse de sensibilité du taux de croissance journalier (λ) aux paramètres du cycle de vie pour *Valvata (Cincinna) piscinalis*. « SD » indique que la modification du paramètre génère une variation significative de λ par rapport au témoin.

Paramètre du cycle de vie	Modification	Variation de λ obtenue ¹
Survie des juvéniles	- 10%	- 7% (SD)
Survie des adultes		- 1,5% (SD)
Durée du stade juvénile	+ 10%	- 0,4%
Fécondité	- 10%	- 0,1%

¹ par rapport à la valeur témoin.

Comme dans le cas du chironome, une variation de 10 % du rythme de croissance ou de la fécondité journalière des individus ne génère pas d'effet significatif sur le taux de croissance journalier de la population par rapport aux témoins. De même, c'est la modification de la survie des juvéniles qui a le plus d'influence sur la valeur de λ . Ce paramètre est donc particulièrement important pour la compréhension de la dynamique de la population de laboratoire chez *V. piscinalis*.

7.3. Effets du zinc sur les populations de *Branchiura sowerbyi*

7.3.1. Gamme de variabilité du taux de croissance journalier dans les populations témoins

Le taux de croissance journalier théorique moyen a été estimé à 1,021. Ceci indique que les populations témoins sont dans une phase de croissance exponentielle ($\lambda > 1$) dans nos conditions expérimentales.

La gamme de variation des taux de croissance journaliers des populations témoins est comprise entre 1,020 et 1,023. Cette variabilité constitue une estimation de l'intervalle de confiance autour de la valeur de λ chez les témoins.

7.3.2. Effets du zinc sur le taux de croissance journalier des populations exposées au sédiment pollué

Le résultat de nos simulations de la diminution du taux de croissance journalier de la population (λ) en fonction de la concentration en zinc est présenté en figure 94. La courbe concentration-réponse de la population comporte 3 parties.

De 0 à 800 mg/kg, la présence de zinc ne provoque pas d'effets sur le taux de croissance journalier des populations exposées par rapport aux populations témoins.

De 800 à 1900 mg/kg, ce taux de croissance journalier diminue de façon linéaire avec la concentration en zinc. Cette diminution est due au déclenchement d'effet sur la croissance des organismes. La valeur de λ sort de la gamme de variation des témoins pour des concentrations supérieures à 1186 mg/kg, qui constitue donc notre concentration sans effet significatif sur la population.

La réponse de la population à la présence de zinc est de nouveau modifiée à partir de 1900 mg/kg de zinc dans le sédiment, concentration à laquelle se déclenchent les effets sur la survie des juvéniles.

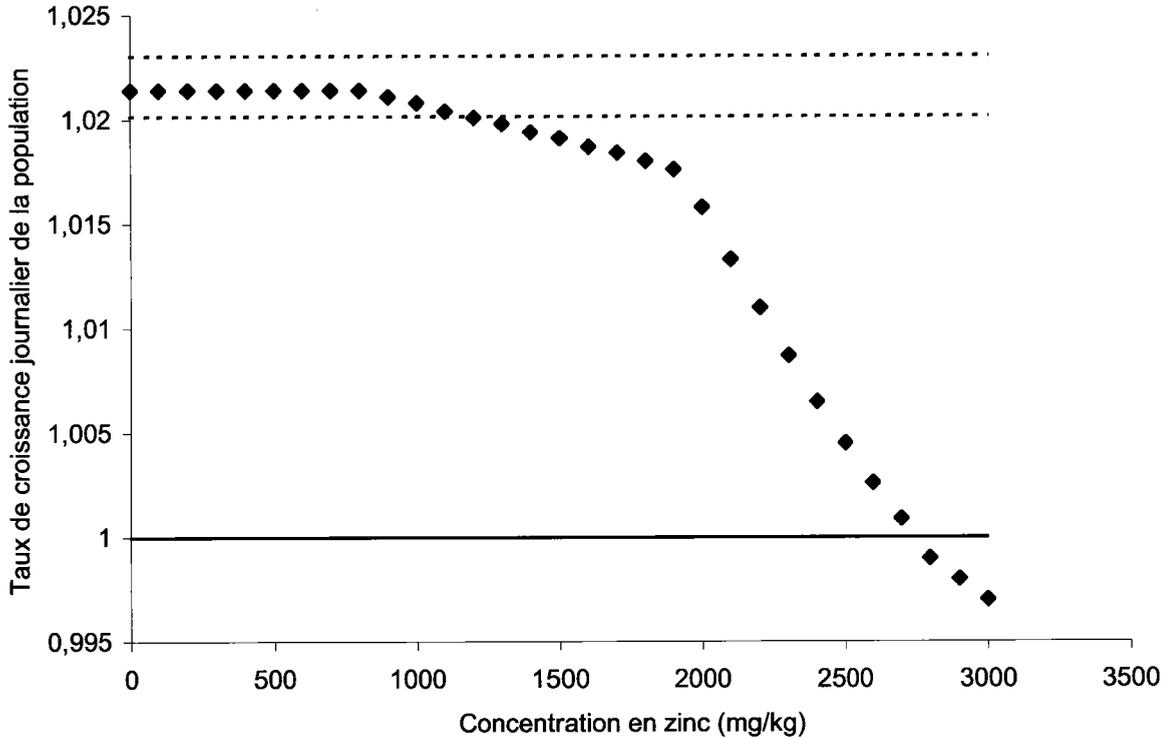


Figure 94. Evolution du taux de croissance journalier de la population de *Branchiura sowerbyi* en fonction de la concentration en zinc dans le sédiment. Les lignes pointillées délimitent l'intervalle de confiance du taux de croissance des populations témoins. La ligne pleine situe le seuil à partir duquel la population est menacée d'extinction ($\lambda < 1$)

Notons que les populations de laboratoire de *B. sowerbyi* sont très résistantes par rapport aux populations de chironomes et de *V. piscinalis* dans nos conditions expérimentales. En effet, la population reste dans une dynamique de croissance exponentielle ($\lambda > 1$) pour la plupart des concentrations testées, bien que la croissance et la survie des organismes soient modifiées par la présence de toxique. La population de *B. sowerbyi* n'est potentiellement menacée d'extinction ($\lambda < 1$) que lorsque la concentration en zinc dans le milieu dépasse 2750 mg/kg. Le taux de croissance de la population tend alors vers la plus faible valeur qu'il peut prendre dans nos conditions expérimentales, soit 0,996 (valeur de la survie journalière des adultes, qui est une constante indépendante de la concentration en zinc dans notre modèle).

7.3.3. Analyse de sensibilité

Les résultats de l'analyse de sensibilité du taux de croissance journalier à la variation des paramètres du cycle de vie sont présentés dans le tableau XLVI.

Tableau XLVI. Résultats de l'analyse de sensibilité du taux de croissance journalier (λ) aux paramètres du cycle de vie pour *Branchiura sowerbyi*. « SD » indique que la modification du paramètre génère une variation significative de λ par rapport au témoin.

Paramètre du cycle de vie	Modification	Variation de λ obtenue ¹
Survie des juvéniles	- 10%	- 2,5% (SD)
Survie des adultes	- 10%	- 2,5% (SD)
Durée du stade juvénile	+ 10%	- 0,1%
Fécondité	- 10%	- 0,1%

¹: par rapport à la valeur témoin

Comme pour le chironome et *V. piscinalis*, une variation de 10 % de la durée du stade juvénile ou de la fécondité ne modifie pas significativement la dynamique de population par rapport aux témoins. Seule la variation de la survie influence significativement la valeur du taux de croissance journalier de la population par rapport aux témoins.

Les survies des juvéniles et des adultes sont aussi sensibles l'un que l'autre. C'est donc la survie en général qui représente le paramètre le plus important pour la compréhension de la dynamique de population en laboratoire chez *B. sowerbyi*.

8. RELATION ENTRE LA REPONSE BIOLOGIQUE MESUREE AU NIVEAU INDIVIDUEL ET AU NIVEAU POPULATIONNEL CHEZ NOS TROIS ESPECES

L'analyse de sensibilité a montré que le paramètre le plus sensible de la dynamique de la population correspond à la survie chez nos trois espèces. Dans le tableau XLVII, ce résultat a été mis en relation avec :

- la sensibilité relative des paramètres du cycle de vie observés au niveau individuel (survie, croissance et reproduction). Cette sensibilité relative est évaluée en comparant les concentrations sans effet modélisées pour les différents paramètres du cycle de vie chez nos trois espèces ;
- le paramètre du cycle de vie qui déclenche les effets observés sur les populations de nos trois espèces.

Tableau XLVII. Comparaison de la sensibilité des paramètres du cycle de vie dans la réponse biologique au zinc au niveau de l'individu et au niveau de la population pour nos trois espèces

	<i>C. riparius</i>	<i>V. piscinalis</i>	<i>B. sowerbyi</i>
Paramètre le plus sensible au niveau individuel	Fécondité	Croissance	Croissance
CSE ¹ correspondante (mg/kg)	0	77	188
Paramètre le moins sensible au niveau individuel	Survie (4 ^{ème} stade)	Survie (adultes)	Survie (adultes)
NOEC ² correspondante (mg/kg)	>1382	>1468	>1819
CSESP ³ (mg/kg)	630	259	1186
Paramètre le plus sensible au niveau de la population	Survie (4 ^{ème} stade)	Survie (juvéniles)	Survie (juvéniles et adultes)
Paramètre qui déclenche les effets sur la population	Fécondité	Croissance	Croissance

¹. concentration sans effet modélisée au niveau individuel

². concentration sans effet observé au niveau individuel

³. concentration sans effet modélisée au niveau de la population

D'après ces résultats, dans nos conditions expérimentales, les concentrations sans effet obtenues au niveau individuel pour le paramètre du cycle de vie le plus sensible au zinc sont plus faibles que les concentrations sans effet sur les populations de nos trois espèces. Ainsi, les concentrations sans effet mesurées sur le trait d'histoire de vie le plus sensible ne reflètent pas directement la vulnérabilité de l'espèce au toxique. Ces résultats confirment les travaux de

Kammenga *et al.* (1996) et Jager *et al.* (2004), qui ont montré que la réduction du taux de croissance d'une population de nématodes exposée à un milieu contaminé n'est pas directement liée à la perturbation du trait d'histoire de vie le plus sensible au niveau individuel. En outre, ceci explique pourquoi le classement de nos trois espèces suivant leur « sensibilité » au niveau individuel (*i.e.* par ordre de sensibilité décroissante : *C. riparius*, *V. piscinalis* et *B. sowerbyi*) est différent de celui obtenu au niveau de la population (*i.e.* par ordre de « sensibilité » décroissante : *V. piscinalis*, *C. riparius* et *B. sowerbyi*).

Par ailleurs, le paramètre du cycle de vie qui influence le plus la dynamique de la population est similaire chez nos trois espèces et correspond à la survie. Or ce paramètre est aussi le moins sensible lorsque nous évaluons les effets du zinc au niveau individuel. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, c'est le paramètre du cycle de vie le moins sensible à la présence de zinc au niveau individuel qui induit le plus d'effets toxiques sur le taux de croissance journalier de la population. Ces résultats corroborent ceux de Kammenga *et al.* (1996) qui ont mis en évidence dans leurs populations de nématodes, que ce sont les traits qui répondent peu à la présence de toxique au niveau individuel dont la modification engendre les conséquences les plus importantes sur la population.

9. COMPARAISON DES EFFETS AU NIVEAU DE LA POPULATION CHEZ LES TROIS ESPECES ETUDIEES

Une synthèse comparative des paramètres d'effets du zinc sur les populations de nos trois espèces est présentée dans le tableau XLVIII.

Tableau XLVIII. Paramètres d'effets du zinc sur le taux de croissance journalier des populations de laboratoire de *Chironomus riparius*, *Valvata (Cincinna) piscinalis* et *Branchiura sowerbyi*

	<i>C. riparius</i>	<i>V. piscinalis</i>	<i>B. sowerbyi</i>
CSESP ¹ (mg/kg)	630	259	1186
SEP ² (mg/kg)	1640	1557	2750

¹ concentration sans effets significatifs sur le taux de croissance journalier de la population

² concentration seuil au-delà de laquelle la population est potentiellement menacée d'extinction

Les concentrations sans effet significatif sur le taux de croissance journalier de la population (CSESP) varient au minimum d'un facteur 2,4 (entre *V. piscinalis* et *C. riparius*) et au maximum d'un facteur 4,5 (entre *V. piscinalis* et *B. sowerbyi*). Une fois que la CSESP est franchie, le taux de croissance journalier de la population diminue significativement par rapport aux témoins chez nos 3 espèces. Les effets toxiques ne menacent la population en termes de persistance dans le milieu que dans le cas où $\lambda < 1$ (Caswell, 2001). La concentration seuil pour l'extinction de la population (SEP) correspond donc à la plus faible concentration pour laquelle $\lambda < 1$ (Lin, 2005). Ces SEPs sont très proches chez *V. piscinalis* et *C. riparius*, et varient au maximum d'un facteur 1,8 (entre *V. piscinalis* et *B. sowerbyi*).

Comme nous ne pouvons pas calculer d'intervalle de confiance autour des CSESPs et des SEPs, il est impossible de savoir si les différences entre les valeurs obtenues pour nos 3 espèces sont significatives. Nous pouvons toutefois discuter de ces valeurs.

Le facteur de variabilité entre les CSESPs de nos trois espèces est compris entre 2,4 et 4,5. Il est donc supérieur ou égal à la variabilité de réponse biologique inter-expériences dans nos conditions expérimentales laboratoire (qui est de l'ordre de 3 d'après Péry, résultats non publiés).

Cependant, ces facteurs de variabilité sont inférieurs :

- à la variabilité de sensibilité interspécifiques présumée aux composés métalliques (estimée à un facteur 10 par Verhaar *et al.*, 1992).
- au facteur de sécurité utilisé pour représenter la différence de sensibilité interspécifique dans le cadre de l'évaluation des effets des substances chimiques (facteur fixé à 10 d'après la législation (ECB, 2003)).

Par ailleurs, le facteur de variabilité entre les SEPs de nos trois espèces est au maximum de 1,8. Ceci indique que les concentrations en zinc qui menacent la persistance de nos trois espèces dans le milieu sont relativement proches.

Nous pouvons donc admettre que la variabilité de réponses biologiques des populations de laboratoire pour nos trois espèces est relativement faible, mais probablement pas négligeable.

10. CALCUL DE LA CONCENTRATION SANS EFFET AU NIVEAU DE LA COMMUNAUTE D'INVERTEBRES BENTHIQUES

Nous avons vu au chapitre I que l'évaluation des effets du zinc sur la communauté benthique peut être basée sur l'étude de la réponse biologique de l'espèce la plus sensible au contaminant testé parmi les espèces étudiées (ECB, 2003). D'après les concentrations sans effet du zinc sur la population (CSESP), l'espèce la plus sensible au zinc parmi les trois espèces que nous avons étudié est *V. piscinalis*. C'est donc la CSESP de *V. piscinalis* qui peut servir de base à l'évaluation des effets du zinc sur notre communauté d'invertébrés benthiques.

D'après notre étude, les populations de laboratoire de *V. piscinalis* sont significativement perturbées par la présence de zinc lorsque sa concentration dans le sédiment dépasse 259 mg/kg. Cette valeur constitue donc notre concentration sans effets du zinc sur la communauté théorique d'invertébrés benthiques dans nos conditions expérimentales.

11. CONCLUSIONS DU CHAPITRE V

- ❖ Nous avons choisi de caractériser les effets du zinc sur nos populations de laboratoire *via* l'étude de leur taux de croissance journalier. Ce taux de croissance journalier est calculé grâce à des modèles matriciels de type Leslie. Ce calcul nécessite l'utilisation des modèles d'effets au niveau de l'individu présentés aux chapitre IV.
- ❖ Pour les organismes à cycle de vie long (*B. sowerbyi* et *V. piscinalis*), nous avons supposé que les taux de survie et de fécondité journaliers des adultes sont des constantes et que les adultes se reproduisent jusqu'à leur mort. Ceci implique que nous ne tenons pas compte des effets du vieillissement sur la survie et la fécondité des organismes. Dans le cas de *B. sowerbyi*, nos modèles ne permettent pas de tenir compte du fait que l'âge des juvéniles au moment de leur exposition au toxique conditionne leur réponse biologique.
- ❖ Le paramètre du cycle de vie dont la modification au niveau des individus génère le plus d'effet sur la dynamique de population correspond à la survie des juvéniles chez nos trois espèces. Ce paramètre est celui qui est le moins sensible à la présence de zinc au niveau individuel.
- ❖ Les concentrations sans effet du zinc sur les populations de nos trois espèces ont été estimées respectivement à 259, 630 et 1640 mg/kg pour *V. piscinalis*, *C. riparius*, et *B. sowerbyi*. Il existe donc une variabilité de la réponse biologique au niveau de la population chez nos trois espèces. Cette variabilité n'est pas négligeable, mais elle est relativement faible par rapport à la variabilité de sensibilité interspécifiques aux différents produits toxiques.
- ❖ En termes d'évaluation des effets toxiques, nos trois espèces peuvent être classées en fonction de leur sensibilité au zinc au niveau des populations (par ordre décroissant : *V. piscinalis*, *C. riparius* et *B. sowerbyi*). Ce classement est différent de celui que nous avons obtenu sur la base de la mesure de la réponse biologique au niveau individuel.

- ❖ L'évaluation des effets du zinc peut être basée sur l'étude de la réponse biologique de l'espèce la plus sensible au contaminant testé parmi les espèces étudiées (ECB, 2003). Ainsi, c'est la concentration sans effet significatif du zinc sur la population de *V. piscinalis* (259 mg/kg) qui peut servir au calcul d'une PNEC pour notre communauté d'invertébrés benthiques.

CHAPITRE VI

DISCUSSION

Ce chapitre a pour objectif de replacer les méthodes utilisées ainsi que les résultats obtenus dans le contexte de l'évaluation des effets des substances chimiques, ainsi que de discuter les quelques points clés suivants :

- Quels sont les avantages, les limites et les améliorations possibles des outils que nous avons mis au point et / ou utilisés pour réaliser les différents changements d'échelle ?
- Notre méthode de sélection des organismes composant la batterie de tests nous permet-elle de représenter la typologie de traits biologiques et écologiques rencontrée dans la communauté étudiée ?
- Notre approche d'évaluation des effets toxiques (batterie + modèles) nous permet-elle de calculer des concentrations sans effet sur la communauté benthique fiable par rapport aux méthodes actuelles et pas rapport au terrain ?
- Comment les traits biologiques et écologiques nous permettent-ils de mieux comprendre les différences de sensibilité entre les espèces étudiées ?
- Quelle est la faisabilité de notre approche dans le cadre de l'évaluation des effets des toxiques en routine ?

1. INTERET, CHAMP D'APPLICATION, VALIDATION ET LIMITES DE LA METHODE DE REPRESENTATION DE LA COMMUNAUTE NATURELLE PAR UNE BATTERIE D'ESPECES

1.1. Intérêts et champ d'application de la méthode

1.1.1. Validité des fondements théoriques

La méthode que nous avons mise au point afin de construire des batteries de tests permet d'utiliser de façon synergique les connaissances actuelles dont nous disposons dans les domaines de l'écologie et de l'écotoxicologie. Cette méthode est basée sur des fondements théoriques largement acceptés en écologie, tels que l'existence d'une relation entre les traits biologiques et écologiques des espèces et la structure et le fonctionnement de la communauté dans un habitat donné (Richoux (1994), Marmonier *et al.* (1994), Tachet *et al.* (1994), Usseglio-Polatera et Tachet (1994), Usseglio-Polatera (1994), Juget et Lafont (1994), Resh *et al.* (1994) Townsend *et al.* (1997)). Ainsi, les hypothèses de base de notre méthode de sélection des espèces tests peuvent être considérées comme fondées.

1.1.2. Plus value par rapport aux méthodes actuelles de sélection des espèces tests

Actuellement, la sélection des organismes composant une batterie de tests réalisée hors du contexte réglementaire de l'évaluation des effets toxiques repose généralement sur l'étude d'un seul trait biologique. Ce trait correspond le plus souvent à la relation au substrat ou à la place dans la chaîne alimentaire. Notre méthode permet de considérer onze traits biologiques et neuf écologiques pour sélectionner les membres de la batterie de tests. Notre choix d'espèces tests est donc basé sur une représentation beaucoup plus complète des caractéristiques biologiques et écologiques des organismes aquatiques que dans les méthodes actuelles.

Par ailleurs, notre méthode permet de tenir compte du fait que les traits biologiques et écologiques des organismes ne sont pas indépendants les uns des autres, mais « co-adaptés » dans le cadre de la stratégie d'histoire de vie des espèces. Par exemple, le nombre de

générations par an « dépend » en général de la durée du cycle de vie de l'organisme. En outre, ces traits sont « co-adaptés » dans le cadre de l'utilisation de la ressource (espace et nourriture) : par exemple, les organismes détritivores vivent en général dans le sédiment fin. Comme l'analyse de co-inertie est basée sur l'étude de la co-structure qui existe entre la matrice traits biologiques \times taxa et la matrice traits écologiques \times taxa, les relations entre les traits sont prises en compte lors de la répartition des taxa dans les groupes fonctionnels. Dans notre cas, les taxa sont répartis dans les groupes en fonction de leur répartition dans les micro-habitats sédimentaires, de leurs habitudes alimentaires et de leur stratégie d'histoire de vie (voir chapitre II, résultats). Ainsi, les batteries obtenues grâce à cette méthode sont représentatives des stratégies d'utilisation de l'habitat et des stratégies d'histoire de vie des invertébrés inféodés à un type d'habitat donné.

1.1.3. Champ d'application de la méthode

Le champ d'application de cette méthode en écotoxicologie est large, car les concepts théoriques sur lesquels elle repose s'appliquent dans le cadre de l'étude des communautés inféodées à la colonne d'eau ou au sédiment, dans n'importe quel type d'écosystème aquatique.

Par ailleurs, cet outil est facilement adaptable à l'étude des diverses problématiques écotoxicologiques touchant un écosystème particulier. Les adaptations méthodologiques correspondant à chaque type de problématique sont synthétisées dans le tableau II.

La caractérisation de la communauté cible est basée sur la définition d'une combinaison théorique de traits biologiques et écologiques correspondant aux contraintes propres au type d'habitat étudié. En modifiant cette combinaison théorique de traits, l'expérimentateur peut choisir le compartiment aquatique étudié (colonne d'eau ou sédiment) et pour chaque compartiment, la zone typologique étudiée (par exemple, la zone aval de cours d'eau dans notre cas).

Tableau II. Adaptions possibles de la méthode de sélection des taxa selon la problématique étudiée. Dans le cadre de la thèse, la méthode est utilisée en vue de l'évaluation de la toxicité sédiments naturels

<i>Problématique</i>	<i>Toxicité des eaux ou sédiments naturels</i>	<i>Danger de substances chimiques</i>	<i>Bioindication in situ</i>
<i>Adaptation</i>			
Action sur le module « communauté théorique »	Pondération des traits en fonction de l'habitat étudié	Pondération des traits en fonction du milieu d'exposition (eau /sédiment)	Pondération des traits en fonction de l'habitat étudié
Action sur le module « groupes fonctionnels »	Traits non pondérés	Traits pondérés selon le mode d'action du toxique	Traits non pondérés
Limites qualitatives au choix du représentant	Contraintes faunistiques ¹ Contraintes de laboratoire ²	Contraintes faunistiques Contraintes de laboratoire	Contraintes faunistiques

¹ présence, abondance, ubiquité, identification

² élevage et essais

La fabrication des groupes fonctionnels est basée sur un classement des taxa qui composent la communauté théorique selon la similarité de leurs combinaisons de traits biologiques et écologiques. Dans notre étude, tous les traits étudiés ont le même poids statistique dans la définition des groupes fonctionnels. En donnant plus de poids à certains de ces traits, il est possible d'orienter les caractéristiques des groupes fonctionnels recherchés. Ainsi, une pondération des traits en fonction du mode d'action du toxique étudié permet de répartir les taxa dans des groupes d'organismes qui présentent des traits liés au mode d'action du toxique similaires. En choisissant un représentant dans chaque groupe, nous maximisons alors la différence entre les représentants de la batterie pour ces traits (C. Schaëfers, Comm. Pers.). Cette démarche permet de fabriquer une batterie de tests adaptée à l'étude de la toxicité d'une famille de toxiques en particulier : par exemple, pour l'étude d'une substance œstrogène mimétique, l'expérimentateur donnera plus de poids aux traits liés à la reproduction des taxa.

La fabrication de la batterie de tests est basée sur l'étude de la position relative des taxons sur le premier plan factoriel issu de l'analyse de co-inertie. Le fait de maximiser la similarité entre le représentant de chaque groupe et les caractéristiques bio/écologiques moyennes du groupe permet d'obtenir une batterie de tests représentative de la typologie de traits biologiques et écologiques rencontrée dans la communauté étudiée.

Or c'est cette représentativité qui fait défaut dans les méthodes actuelles d'évaluation des effets des contaminants : en effet, nous avons vu au chapitre I que l'évaluation des effets est basée sur l'idée que la protection des espèces les plus sensibles (dans le cas de l'approche par les NOECs) ou des espèces appartenant à 8 groupes taxonomiques différents (dans le cas de l'approche par les SSD) devrait permettre de préserver la structure de la communauté et donc sa fonction. Le fonctionnement de la communauté est donc abordé indirectement, par l'intermédiaire de la sensibilité des taxa et de la taxonomie.

Notre méthode permet de sélectionner les taxa qui correspondent statistiquement aux meilleurs représentants possibles des différentes stratégies d'adaptation à la vie dans le sédiment. La notion de fonctionnement de la communauté est donc prise en compte directement dans notre approche. Ainsi, nous supposons que notre méthode permet de sélectionner les taxa de manière plus rationnelle dans le cadre de l'évaluation des effets des substances chimiques sur les communautés benthiques.

Par ailleurs, les espèces sélectionnées sont effectivement présentes et relativement abondantes sur le terrain à nos latitudes. Ceci facilite la validation et le transfert des résultats obtenus en laboratoire vers le terrain (problématique non abordée dans la thèse). En effet, ces étapes sont difficilement réalisables à l'aide d'une batterie composée des espèces recommandées par les directives européennes et américaines, car certaines de ces espèces (par exemple, le poisson *Danio rerio* et le crustacé *Hyalella azteca*) ne sont pas naturellement présentes *in situ* sous nos latitudes.

1.2. Validation de la méthode

1.2.1. De la communauté naturelle à la communauté théorique

La première étape de notre méthode consiste à définir une communauté benthique théorique à partir de listes faunistiques. Nous nous sommes interrogés quant à la représentativité de cette communauté théorique par rapport à une communauté benthique naturelle.

D'après notre étude bibliographique de la composition des communautés benthiques dans les fleuves d'Europe de l'Ouest (voir chapitre II), la communauté théorique que nous avons obtenue est représentative de la composition taxonomique des communautés naturelles inféodées aux sédiments de zones aval de cours d'eau en terme de présence / absence des groupes taxonomiques considérés au niveau de la classe. Cependant, ce niveau taxonomique n'est pas suffisamment précis afin de caractériser la représentativité de notre communauté théorique par rapport à une communauté naturelle. Afin d'améliorer la pertinence de notre analyse, il faut réaliser la comparaison à une échelle taxonomique plus fine, par exemple à la famille.

Pour ce faire, il faudrait :

- faire un travail de recherche bibliographique afin de trouver des listes faunistiques correspondant aux communautés d'organismes prélevés dans les sédiments en zone aval de cours d'eau ou de lacs. Une autre possibilité consisterait à procéder à des échantillonnages dans les communautés benthiques naturelles en prélevant les organismes à la benne ou à la drague, puis à trier et déterminer à la famille les taxa présents dans cette communauté ;
- comparer la similarité des taxa présents dans les deux communautés (théorique vs naturelle), par exemple *via* l'indice de Jaccard. Une attention particulière devrait être portée à l'étude des taxa absents de la communauté théorique : ces taxa sont-ils ont-ils une abondance relative élevée dans la communauté naturelle ? Ont-ils une importance spécifique pour le fonctionnement de la communauté ?

- comparer la diversité fonctionnelle dans les deux communautés (théorique vs naturelle) *via* le calcul d'indices de structure, comme par exemple l'indice de diversité de Shannon-Weaver.

1.2.2. De la communauté aux groupes fonctionnels

La seconde étape de notre méthode consiste à regrouper les taxa appartenant à la communauté théorique sur la base de la similarité de leurs combinaisons de traits biologiques et écologiques. La quantité d'information prise en compte dans les groupes fonctionnels par rapport à la quantité d'information initialement présente dans la communauté est représentée par le pourcentage d'inertie projeté lors de l'analyse de co-inertie. Ce pourcentage dépend de la composition taxonomique de la communauté ainsi que des traits étudiés : il est donc impossible de comparer nos résultats à ceux d'une autre étude similaire basée sur un jeu de donnée différent. Remarquons toutefois que bien que le pourcentage d'information pris en compte dans notre étude soit inférieur à la moitié de la quantité initiale d'information contenue dans les matrices traits \times taxa, ce pourcentage est suffisant pour représenter la diversité bio/écologique présente dans notre communauté théorique (Usseglio-Polatera *et al.*, 2000b).

1.2.3. Des groupes fonctionnels à la batterie de tests

La dernière étape de notre méthode consiste à sélectionner une seule espèce par groupe fonctionnel. Les espèces ainsi choisies constituent notre batterie de tests. Ces espèces ont été choisies sur la base de leur similarité avec le profil moyen du groupe fonctionnel, en tenant compte des possibilités d'élevage et d'acclimatation au laboratoire.

L'étude du profil moyen de nos groupes fonctionnels a montré que toutes les modalités de traits observées dans notre communauté théorique sont effectivement représentées dans nos groupes fonctionnels. Cependant, le choix d'un représentant pour chaque groupe fonctionnel induit une perte d'information bio/écologique potentiellement importante par rapport à l'information résumée dans les groupes fonctionnels.

Ainsi, certaines modalités de traits observées dans la communauté théorique ne sont plus représentées dans la batterie de tests composée de cinq espèces. En effet, notre batterie ne comporte aucun organisme prédateur et aucun filtreur strict. Par ailleurs, comme nous n'avons pas étudié les effets du zinc sur *S. personatum* et *L. variegatus*, notre batterie réduite à trois espèces ne comporte aucun organisme broyeur, ni aucun organisme qui se reproduit de manière asexuée. Ainsi, certains traits qui peuvent s'avérer importants en termes de fonctionnement de la communauté ne sont pas représentés dans notre batterie de tests réduite.

Par ailleurs, nous avons vu au chapitre III que certaines des caractéristiques du cycle de vie de nos organismes de notre batterie sont modifiées au laboratoire par rapport à leur valeur sur le terrain. Ces caractéristiques concernent :

- la capacité de dispersion pour les trois espèces étudiées. En effet, dans nos conditions expérimentales, les individus sont exposés aux toxiques dans un milieu clos : il leur est donc impossible de s'enfuir vers un milieu plus sain ;
- la présence de formes de résistance chez *B. sowerbyi*. En effet, nous n'avons pas observé de forme de résistance (*i.e.* fabrication d'un cocon protecteur autour du corps des juvéniles et des adultes (Tachet *et al.*, 2000)) chez l'oligochète au laboratoire ;
- le nombre de reproductions par an chez *V. piscinalis*. En effet, le gastéropode se reproduit plusieurs fois au cours de son cycle de vie au laboratoire, alors qu'il ne se reproduit généralement qu'une seule fois au cours de sa vie dans la nature.

Pour ces traits, les résultats de l'étude des effets du zinc sur les populations de laboratoire de nos représentants ne sont donc que peu représentatifs des résultats que nous obtiendrions en étudiant une autre espèce du même groupe fonctionnel. Concrètement, quelles sont les conséquences de ce manque de représentativité potentiel ?

La présence de formes de résistance au niveau individuel favorise la résistance des populations en cas de stress environnemental (Sheratt *et al.*, 1999 ; Bongers *et al.*, 2000). Il est donc possible que les effets du zinc prédits sur les populations de *B. sowerbyi* surestiment les effets que nous aurions observés chez une autre espèce membre du groupe II.

Par ailleurs, la présence de stades colonisateurs qui permettent aux organismes de se disperser dans le milieu favorise la résilience des populations en cas de stress environnemental (Sheratt *et al.*, 1999 ; Bongers *et al.*, 2000). Les capacités de dispersion de nos représentants ne sont

pas prises en compte dans notre étude car nous n'incluons pas les processus d'émigration et d'immigration dans nos modèles de dynamique de nos populations de laboratoire. Ceci pose potentiellement un problème de surestimation des effets sur la population. Ce biais est indépendant du choix du représentant du groupe fonctionnel.

En dernier lieu, la stratégie de reproduction adoptée par *V. piscinalis* dans nos conditions expérimentales représente mal la stratégie de reproduction des autres espèces qui composent le groupe V : ce groupe, majoritairement constitué d'espèce semelpares, est représenté par une espèce itéropare au laboratoire. Ce biais pose un problème lors de l'évaluation des effets du toxique au niveau des populations. En effet, les caractéristiques de la reproduction déterminent de façon importante la dynamique de population des espèces (Caswell, 2001). Ces caractéristiques confèrent plus ou moins de résistance à la population lorsqu'une pollution vient se rajouter au régime normal de perturbations du milieu (Sprong et Birge, 2005). Par exemple, une contamination passagère du milieu survenant au moment de la reproduction aura un fort impact dans une population semelpare, alors qu'elle aura un impact plus faible sur une population itéropare (Forbes et Calow, 1999). Ainsi, les effets du zinc que nous avons prédits sur les populations de *V. piscinalis* sont peut être moins graves que ceux que nous aurions prédits en étudiant une autre espèce appartenant au même groupe fonctionnel.

En conclusion, nous perdons en représentativité de la typologie des combinaisons de traits biologiques et écologiques rencontrées dans la communauté lorsque les traits d'histoire de vie des espèces qui composent notre batterie sont modifiés en conditions de laboratoire par rapport à leur valeur sur le terrain. Cependant, il est difficile de savoir à l'avance comment le cycle de vie est modifié en laboratoire pour les espèces nouvelles en écotoxicologie. Nous ne pouvons donc ni prévoir, ni quantifier le biais lié au changement d'échelle terrain vers laboratoire.

1.3. Limites de la méthode et améliorations possibles

Cette méthode de sélection des taxa est innovante mais présente certaines limites. Elles correspondent principalement à des manques ou à des imperfections des données.

L'utilisation de la base de donnée choisie limite le champ d'application de la méthode à l'Europe de l'Ouest. Cependant, de nouvelles bases de données similaires à celles que nous utilisons se développent actuellement dans d'autres zones du globe (e.g. travaux de M. Scarsbrook et S. Dolédec sur les espèces présentes en Nouvelle Zélande, M. Scarsbrook, Comm. Pers.). La méthode mise au point pendant la thèse pourra être utilisée sur ces nouvelles bases de données : ceci permettra d'étendre son champ d'application à d'autres régions du globe que l'Europe de l'Ouest.

Notons en outre que la structure des données est faible et que la diversité de traits dans chaque groupe fonctionnel est grande (voir chapitre II). La prise en compte d'un plus grand nombre de groupes fonctionnels aurait permis de maximiser la variance entre les groupes, et donc de représenter de façon optimale la typologie de traits rencontrée dans la communauté. Par exemple, une représentation fine de la structure et du fonctionnement de la communauté benthique a été obtenue par Usseglio-Polatera (2000a) en répartissant (grâce à une analyse factorielle des correspondances, dans laquelle les variables les plus discriminantes sont similaires aux nôtres), les organismes dans 8 groupes selon leurs traits biologiques et dans 7 groupes selon leurs traits écologiques. Le nécessaire compromis entre la finesse de notre représentation de la typologie de traits rencontrée dans la communauté benthique et la taille de notre batterie de tests constitue donc probablement l'une des principales faiblesses de notre approche du point de vue écologique.

Par ailleurs, notre base de données ne contient pas d'informations toxicologiques concernant les sensibilités relatives des taxa aux contaminants. Cependant, de telles données existent dans la littérature. Par exemple, à partir des résultats de test de laboratoire publiés dans la littérature, Wogram et Liess (2001) ont proposé une classification relative des invertébrés (étudiés au niveau de l'ordre) en fonction de leur sensibilité aux métaux et aux substances organiques. Pouvons-nous et avons-nous intérêt à prendre en compte ces informations ?

Afin de prendre en compte ces informations, il faudrait ajouter un trait « sensibilité » dans notre base de donnée. L'étude de ce trait permettrait de choisir le représentant de chaque groupe fonctionnel en fonction de la gamme de sensibilité des organismes du groupe. Ceci permettrait potentiellement d'améliorer notre représentativité de la sensibilité de la communauté théorique aux grande familles de toxiques (métaux ou organiques).

Cependant, ces données manquent de précision taxonomique. En effet, Wogram et Liess (2001) ont travaillé au niveau de l'ordre tandis que nos données sont principalement définies au genre et à l'espèce. La variabilité de sensibilité entre les genres et les espèces d'organismes qui appartiennent au même ordre est trop importante pour utiliser les données existantes afin de renseigner le trait « sensibilité » de façon fiable aux niveaux taxonomiques qui nous intéressent (Clark *et al.*, 2004).

Par ailleurs, ces données sont de qualité très hétérogène. Ceci est dû au fait que les protocoles de tests utilisés pour caractériser la sensibilité des différents taxa varient d'une étude à l'autre. En effet, ces choix méthodologiques conditionnent la biodisponibilité et la cinétique d'absorption du produit par les organismes, et influencent donc la réponse biologique au toxique. La variabilité de sensibilité liée au choix du protocole de test et à la nature du toxique dans la famille de produit chimique testée est bien supérieure à la variabilité de sensibilité liée aux différences de traits biologiques et écologiques des espèces (Vaal *et al.*, 1997a). L'utilisation des données existantes introduirait donc probablement un biais dans notre méthode de sélection des espèces pour les batteries de tests. Une amélioration éventuelle de la base de données ne peut donc pas se faire de façon rigoureuse à partir des données existantes.

D'autre part, l'information biologique et écologique contenue dans notre base de données concerne des niveaux taxonomiques différents, de la famille à l'espèce. L'image fonctionnelle de la communauté obtenue à partir des traits biologiques et écologiques des taxa identifiés au niveau de la famille n'est pas significativement différente de l'image fonctionnelle obtenue à partir des traits des taxa identifiés à l'espèce lorsque l'on travaille à l'échelle d'une zone typologique (Dolédec *et al.*, 2000). Ainsi, l'hétérogénéité taxonomique de nos données n'influence pas le réalisme de notre étude de la typologie de traits observée dans les communautés benthiques de zone aval de cours d'eau et de lacs.

Cependant, l'hétérogénéité du niveau taxonomique de nos données peut introduire une incertitude lors du choix du représentant du groupe fonctionnel. Par exemple, le meilleur représentant possible pour le groupe IV correspond à une famille (réduite à quelques genres), dans laquelle nous devons choisir une espèce. Si la variabilité de sensibilité entre les espèces

est supérieure à la variabilité de sensibilité entre les familles, il peut alors exister un biais lors du choix du représentant de la famille.

Des études menées sur les invertébrés (Sloof *et al.*, 1983a), sur les plantes (Clark *et al.*, 2004) et sur les bactéries (Kipranova et Boiko, 1992) montrent que les variations de sensibilité sont d'autant plus faibles que les taxa appartiennent à des groupes taxonomiques proches. Ainsi, Clark *et al.* (2004) ont montré que la sensibilité est relativement bien corrélée à la taxonomie au niveau de l'espèce et du genre, mais que ces corrélations ne sont pas fiables au niveau des familles, des ordres et des classes. Ces auteurs conseillent donc de ne pas extrapoler la sensibilité d'une famille à l'autre. D'après ces résultats, nous supposons que la variabilité de sensibilité intra-famille est plus faible que la variabilité de sensibilité entre les familles ou les ordres d'organismes. Ainsi, le biais (en terme de sensibilité relative) introduit lors du choix d'une espèce parmi les membres d'une famille de représentants du groupe fonctionnel est généralement acceptable. Toutefois, la prudence est de rigueur car certaines études ont montré que de grandes disparités de sensibilité peuvent être observées à l'intérieur des familles ou des genres (voir chapitre I). Il est donc difficile de savoir comment la variabilité de sensibilité intra-famille influence la représentativité des batteries de tests obtenues en termes de gamme de sensibilité par rapport à la sensibilité des espèces qui composent la communauté théorique.

En dernier lieu, notons que les caractéristiques physiologiques des organismes ainsi que la taxonomie n'ont pas été prises en compte pour le choix des membres de notre batterie de tests. Nous avons vu au chapitre I que ces critères déterminent la sensibilité des organismes à l'échelle cellulaire, en liens avec le mode d'action du toxique. Ainsi, notre batterie de tests n'est probablement pas représentative de la variabilité de sensibilité des invertébrés benthiques à un contaminant qui possède un mode d'action spécifique. Pour ces composés, les traits biologiques et écologiques des taxa doivent être pondérés en fonction du mode d'action du toxique lors de la construction des groupes fonctionnels (voir tableau II) afin d'obtenir des batteries de tests potentiellement représentatives de la gamme de sensibilité de l'ensemble de la communauté étudiée. Ce résultat confirme les études de Thurston *et al.* (1985), qui ont montré que l'utilisation d'une batterie de tests prédéfinie quel que soit le toxique étudié est à remettre en cause : les batteries de tests doivent être adaptée en fonction des modes d'action des substances testées.

2. INTERETS, VALIDATION ET LIMITES DE NOS MODELES D'EVALUATION DES EFFETS AU NIVEAU DES INDIVIDUS

2.1. De la concentration externe en zinc aux effets toxiques : intérêts de nos modèles d'effets au niveau individuel

Nous avons choisi d'analyser les données issues des bioessais grâce à des modèles d'effets mécanistiques de type DEBtox. Ces modèles comportent un module toxico-cinétique et un module d'effets, qui permettent de prédire la concentration sans effet (CSE) sur la survie, la croissance et la reproduction des individus à partir des concentrations en zinc mesurées dans le sédiment. L'utilisation de ces modèles est avantageuse du point de vue de la compréhension des effets toxiques pour trois raisons majeures.

Tout d'abord, les paramètres de ces modèles ont un sens biologique, ce qui nous aide à interpréter les effets toxiques. Par exemple, dans les modèles d'effets sur la survie, la CSE nous indique le seuil au-delà duquel se déclenchent des effets toxiques significatifs par rapport aux témoins, et le paramètre b représente la gravité des effets une fois que cette concentration seuil est dépassée.

Par ailleurs, l'utilisation ces modèles pour interpréter les données de toxicité permet de tester différentes hypothèses biologiques relatives aux mécanismes d'effet du zinc sur les paramètres du cycle de vie des trois espèces étudiées. Ces hypothèses permettent de s'interroger sur les types de perturbations physiologiques, morphologiques ou comportementales qui permettent d'expliquer la réponse biologique des organismes au toxique. Par exemple, si l'étude de données de croissance avec les différents modèles met en évidence que les effets du produit sont dus à une diminution de l'énergie assimilée, nous pouvons nous interroger sur les mécanismes biologiques qui expliquent ce résultat : l'organisme se nourrit-il moins du fait de déformations morphologiques (*e.g.* déformation des pièces buccales), du fait de difficultés à se déplacer dans le substrat à la recherche de nourriture ou encore est-ce une réaction comportementale (évitement du substrat contaminé) ?

En dernier lieu, ces modèles permettent de calculer des concentrations sans effet qui ne dépendent pas de la gamme de concentration testée ni de la durée des tests. Ces CSEs sont

plus fiables et plus facilement comparables entre elles d'une expérience à l'autre (pour une même espèce) ainsi que d'une espèce à l'autre, que les NOECs et les $CE_{x\%}$. En conséquences, les CSEs sont plus pertinentes que les NOECs et $CE_{x\%}$ dans le cadre de l'évaluation des effets des substances chimiques. Par ailleurs, ces CSE constituent une base plus fiable que les NOECs et les NECs pour estimer les effets attendus au niveau de la population à partir des effets observés sur les individus.

2.2. Validation de nos modèles d'effets au niveau individuel

2.2.1. Validation du modèle toxico-cinétique

Nous avons vu au chapitre IV que notre protocole d'enrichissement du sédiment en zinc permet d'obtenir de bons rendements de façon répétable. Par ailleurs, nous avons vu que le zinc introduit dans le sédiment de cette manière ne se désorbe pas au cours de l'essai, ce qui permet de maintenir une concentration d'exposition dans le milieu (c_e) stable au cours du bioessai. Ces résultats montrent que notre protocole d'enrichissement permet d'obtenir des résultats fiables et que l'hypothèse de nos modèles « $c_e = \text{constante au cours de l'essai}$ » est bien vérifiée.

La cinétique du toxique a été décrite grâce au modèle linéaire à un compartiment (Chew et Hamilton, 1985). Ce modèle a été retenu pour sa simplicité : la concentration interne dépend de la différence au cours du temps entre la quantité de zinc qui est absorbée par l'organisme et la quantité qui est éliminée. Il permet de décrire la cinétique du zinc de façon fiable chez nos trois espèces : en effet, la cinétique prévue par le modèle a été confirmée expérimentalement par nos mesures de concentration interne en zinc au cours du temps. Ce résultat supporte les conclusions d'autres auteurs, qui ont montré que le modèle linéaire à un compartiment est bien adapté à la description de la cinétique des métaux chez les invertébrés (voir par exemple Timmermans *et al.*, (1992) pour le zinc et le cadmium, Péry (2003) pour le cuivre).

2.2.2. Choix et validation des modèles d'effets

Le choix du modèle d'effets à utiliser pour prédire au mieux les données issues de nos bioessais, ainsi que la validation du modèle sélectionné, demandent de s'interroger à la fois sur la pertinence de la structure du modèle (*i.e.* validité des hypothèses biologiques qui définissent les règles de la répartition de l'énergie chez l'organisme étudié), ainsi que sur la pertinence de son fonctionnement (*i.e.* étude de la valeur des paramètres et de leur sensibilité aux variables biologiques que nous mesurons lors des essais) (Nisbet *et al.*, 1996). Dans les paragraphes suivants, nous traiterons premièrement de l'étude de la structure des modèles proposés, puis de leur fonctionnement.

Les modèles DEBtox reposent sur l'hypothèse que les mécanismes d'effets du toxique sur les organismes (diminution de la quantité d'énergie assimilée, augmentation du coût de la maintenance, de la croissance ou de la reproduction) sont indépendants et exclusifs (Kooijman et Bedaux, 1996). Ceci implique qu'il est nécessaire de tester la validité des modèles basés sur ces différents scénarii d'effets et d'en choisir un seul pour interpréter les données issues des tests de toxicité.

Nous avons vu au chapitre IV que les modèles correspondants aux différents scénarii d'effets fournissent des prédictions de qualité relativement similaire en termes de nombre d'estimations erronées (*i.e.* l'estimation est significativement différente de la donnée) et d'erreur (*i.e.* mesurée par la somme des carrés des écarts entre les prédictions et les données). Le choix du modèle d'effet à utiliser pour interpréter les données d'un test réalisé en conditions *ad libitum* est donc relativement difficile à réaliser si ce test n'est pas mis en relation avec les hypothèses biologiques des modèles ou avec d'autres données. Ce problème du choix du modèle d'effet s'est posé en termes similaires lors de l'étude des effets du cuivre sur les paramètres du cycle de vie du chironome (Ducrot, 2002 ; Péry, 2003). D'après ces travaux et les présents résultats, nous pouvons proposer une démarche qui permet de choisir quel modèle d'effet est le plus approprié pour interpréter les données des tests de toxicité.

Il est tout d'abord nécessaire de vérifier si les hypothèses biologiques du modèle sont bien respectées. Par exemple, nous avons vu que l'hypothèse « l'énergie investie dans la fabrication de biomasse n'est pas re-mobilisable » (chapitre III) n'est pas respectée dans le cas du mode de reproduction de *B. sowerbyi* : les modèles proposés ne permettent donc pas de prédire la fécondité de cet organisme.

En second lieu, il est nécessaire de caractériser la fiabilité des modèles en terme de nombre d'estimations significativement différentes de la donnée, et de somme des carrés des écarts entre les prédictions et les données. Ceci permet d'identifier le modèle qui fournit les estimations les plus crédibles. Dans le cadre de l'utilisation de ces modèles pour la prédiction des effets attendus au niveau de la population, il convient par ailleurs de vérifier si chaque modèle décrit les paramètres clés du cycle de vie (e.g. l'âge et la taille à la puberté) de façon fiable.

Pour choisir entre deux modèles de fiabilité équivalente, il faut faire le lien entre les résultats des différents tests sublétaux. En effet, les mécanismes d'effets sur lesquels sont basés nos modèles sont supposés indépendant et exclusifs. Cette hypothèse implique l'existence d'une cohérence entre les mécanismes d'effets du toxique sur les différents paramètres sublétaux. Par exemple, si pour une concentration donnée, les effets sur la croissance s'expliquent par une diminution de l'assimilation, alors les effets observés sur la reproduction pour cette même concentration s'expliquent théoriquement eux aussi par une diminution de l'assimilation. Ainsi, nous avons vu au chapitre IV que le choix de modèle à retenir pour décrire la croissance des larves de chironomes a été effectué grâce à l'étude parallèle des données des tests de croissance et d'émergence. De même, le choix du modèle de croissance chez *V. piscinalis* a été réalisé en faisant le lien entre la croissance prédite par les différents modèles possibles (en particulier le fait d'atteindre ou non la taille minimale à la puberté à un âge donné et pour une concentration donnée) et les résultats du test de reproduction (possibilité de se reproduire à un âge donné et pour une concentration donnée).

Dans le cadre de cette thèse, nous possédons des données de tests de toxicité pour tous les paramètres sublétaux du cycle de vie de nos trois organismes. Dans le cas où l'expérimentateur ne possède que des données de croissance ou des données de reproduction, il n'est pas possible de faire le lien entre les effets toxiques prédits sur les paramètres sublétaux. En cas d'ambiguïté quant au choix du modèle à utiliser pour étudier les données disponibles, il est recommandé de recommencer le test de toxicité en se plaçant cette fois dans des conditions d'alimentation limitantes (Péry, 2003), et d'adapter les modèles en conséquence. Cette modification des modèles est relativement simple : il suffit de modifier les valeurs des paramètres liés à la quantification de l'entrée de nourriture dans l'organisme (soit la quantité de nourriture disponible pour l'organisme dans le milieu et la vitesse d'assimilation). Concrètement, cette approche permet de « creuser les écarts » entre les

données et les prédictions des modèles, et ainsi de mieux différencier les qualités prédictives des différents modèles.

Une fois le modèle d'effets choisi, la validation des paramètres des modèles nécessite de comparer les prédictions avec des données différentes de celles qui ont servi à calibrer le modèle sélectionné. Ces données doivent être acquises dans des conditions expérimentales similaires à celles qui ont été utilisées pour le paramétrage. Cette validation implique donc de réaliser plusieurs tests de toxicité similaires pour chacun des paramètres du cycle de vie de nos trois espèces.

Par ailleurs, une meilleure connaissance des propriétés du modèle nécessiterait l'étude de la sensibilité des paramètres aux variables biologiques mesurées pendant les essais, et utilisées pour le paramétrage du modèle. Par exemple, il serait intéressant de voir comment la valeur des constantes des modèles (*e.g.* taux de croissance et de fécondité des témoins) influence la valeur des prédictions obtenues.

En dernier lieu, dans le cas de *B. sowerbyi*, la croissance a été étudiée en mesurant le poids des organismes. Or les modèles utilisent des données de taille pour prédire les effets sur la croissance. Les organismes étant isomorphes, nous avons obtenu ces données de taille en prenant la racine cubique du poids mesuré. Il serait intéressant de vérifier si les paramètres d'effets sur la croissance obtenus sont similaires lorsque la croissance est décrite à partir de longueurs mesurées expérimentalement et lorsque qu'elle est décrite à partir de longueurs issues d'une transformation des données de poids.

Ces aspects de la validation des modèles sont lourds en termes de temps de travail (Ren et Ross, 2005), et n'ont pas pu être réalisés durant la thèse. En conséquence, nous ne pouvons pas évaluer la robustesse des modèles que nous proposons.

2.3. Limites et améliorations possibles de nos modèles d'effet au niveau individuel

2.3.1. Limites du modèle toxico-cinétique

Nous avons vu que la concentration interne en toxique au cours du temps a été calculée en utilisant le modèle linéaire à un compartiment (Chew et Hamilton, 1985). Les principales limites de ce modèle sont les suivantes.

Tout d'abord, il ne permet pas de prédire la concentration interne de façon fiable dans le cas où la métabolisation du produit chimique conduit à la formation d'un sous-produit toxique (ce qui est le cas pour de nombreuses substances chimiques organiques, *e.g.* pesticides organophosphorés), car la cinétique du sous-produit n'est pas prise en compte. Ceci ne nous a pas posé de problème durant la thèse, car le zinc n'est pas métabolisable (Luoma et Rainbow, 2005).

Par ailleurs, ce modèle ne différencie pas la fraction de zinc absorbée par voie respiratoire de la fraction absorbée par voie alimentaire : tout se passe comme si l'organisme ne possédait qu'une seule voie d'absorption du toxique. Ainsi, ce modèle ne prend pas en compte le fait que les deux voies d'entrée du contaminant sont caractérisées par des cinétiques d'absorption différentes.

Nous pouvons supposer que, si l'une de ces voies de contamination est largement majoritaire par rapport à l'autre, ce manque de représentativité affecte peu la pertinence du modèle. En revanche, si les deux voies de contamination sont importantes pour l'organisme, ceci peut entraîner un biais dans l'estimation de la cinétique d'absorption du toxique. Ce résultat a été clairement mis en évidence pour les bivalves filtreurs (*e.g.* chez la moule *Mytilus edulis*, (Luoma et Rainbow, 2005) ou chez l'ormeau *Haliotis diversicolor supertexta* (Chen et Liao, 2004)).

Afin d'estimer l'erreur commise en ne différenciant pas la cinétique propre aux deux voies d'absorption chez nos trois espèces, il faudrait :

- quantifier expérimentalement la quantité de zinc absorbée par la voie alimentaire en utilisant de la nourriture et du sédiment contaminés avec du zinc marqué ;

- modifier le modèle pour tenir compte de la cinétique des deux voies d'absorption. Ce travail peut être réalisé à partir du modèle à deux compartiments proposé par Luoma et Rainbow (2005).

2.3.2. Limites des modèles d'effets

Tout d'abord, les modèles que nous avons utilisés supposent que la fonction prioritaire de l'organisme est la survie (maintenance). Cette hypothèse n'est pas remise en cause dans la littérature. Cependant, il y a un débat entre deux écoles à propos de la façon de représenter cette relation de priorité de la maintenance sur la croissance et la reproduction lors de la répartition de l'énergie aux différentes fonctions vitales.

Dans les modèles DEB et DEBtox, l'énergie nécessaire à assurer la maintenance fait partie du même budget énergétique que l'énergie consacrée à la croissance et à la reproduction (voir chapitre III). L'énergie assimilée se partage entre le pool « croissance + maintenance des tissus somatiques » et le pool « reproduction + maintenance des tissus reproducteurs ». Certains auteurs adoptent une autre hypothèse de travail. Par exemple, Lika et Nisbet (2000) supposent que l'énergie nécessaire pour la maintenance est directement soustraite à l'énergie assimilée : l'énergie restante est alors partagée entre la croissance et la reproduction.

Noonburg *et al.* (1998) ont montré que chez la daphnie, les modèles issus de ces deux approches fournissent des résultats différents. Cependant, aucune de ces approches ne peut être définitivement rejetée sur la base des connaissances actuelles. Il serait intéressant de tester l'applicabilité et la pertinence de la seconde approche dans le cadre de l'étude de nos données de toxicité.

En outre, nous avons vu au chapitre III que les modèles DEBtox sont basés sur l'hypothèse que l'énergie investie dans la fabrication de biomasse n'est pas re-mobilisable et que seule l'énergie stockée dans le compartiment de réserves est disponible (Kooijman, 2000). Or, cette hypothèse n'est pas vraie chez tous les invertébrés. La perte de poids au cours du cycle de vie de l'organisme est un phénomène relativement fréquent.

En effet, la perte de poids est une réponse courante chez les invertébrés soumis aux stress environnementaux. Par exemple, Honkoop et Beukema (1997) ont mis en évidence que certaines espèces de bivalves intertidaux maigrissent en hiver : l'amaigrissement observé a pu être corrélé à la rudesse des conditions environnementales (en termes de température et de

nourriture disponible). Les stress toxiques provoquent eux aussi l'amaigrissement de certains invertébrés. Par exemple, l'escargot terrestre *Helix aspersa* subit une perte du poids de sa coquille en cas d'exposition à un sol contaminé en cadmium (Gimbert *et al.*, 2005). Dans ces deux cas, nous pouvons supposer que l'énergie obtenue par la digestion des tissus peut être réutilisée afin d'assurer la survie de l'organisme.

Par ailleurs, ce phénomène de perte de poids survient même en absence de stress chez certains organismes. Par exemple, nous avons vu au chapitre III que *B. sowerbyi* perd du poids après la reproduction. Cet amaigrissement est la conséquence de la destruction de l'appareil génital par voie enzymatique (Casellato, 1984). Cette digestion libère de l'énergie qui peut être ajoutée aux réserves de l'organisme, et donc utilisée à nouveau pour la croissance et la reconstruction des organes génitaux. Ce type de « recyclage » de l'énergie est commun chez les oligochètes (Lafont, 1989).

Afin de prendre en compte ces réponses de « recyclage » de l'énergie *via* l'amaigrissement des organismes, il est nécessaire de modifier les modèles DEBtox. Ces adaptations ont déjà été réalisées pour le modèle DEB (en absence de toxique) lors d'une étude des effets de la température et de la quantité de nourriture disponible sur les paramètres du cycle de vie et la dynamique de populations de daphnies (Rinke et Vijverberg, 2005). Ces auteurs proposent d'introduire une nouvelle variable dans le modèle : le « poids critique ». Tant que le poids de l'organisme est supérieur au poids critique, l'énergie gagnée lors d'un amaigrissement est disponible pour assurer la maintenance : ceci permet à l'organisme de survivre lorsque les conditions de température et/ou de nourriture sont défavorables. Si le poids devient inférieur au poids critique, alors l'organisme meurt. Une approche similaire pourrait servir de base à la modification des modèles DEBtox.

Par ailleurs, les modèles DEBtox supposent que les différents mécanismes d'effets du toxique sur l'individu sont indépendants et exclusifs.

Ceci suppose par exemple que chez un organisme dont les coûts de maintenance augmentent en présence de toxique, la quantité d'énergie assimilée par l'organisme stressée est similaire à celle des témoins. Or, certains tests de toxicité ont montré que les organismes exposés aux toxiques se nourrissent plus que les témoins, afin de « compenser » la perte d'énergie investie pour la défense de l'organisme. Par exemple, le poisson zèbre exposé au parathion se nourrit davantage afin de compenser les effets néfastes du toxique (Roex *et al.*, 2003). Ainsi, les hypothèses du modèle DEBtox ne permettent pas de prendre en compte les éventuels mécanismes de compensation des effets toxiques par la nourriture.

Ceci suppose par ailleurs que chez un organisme qui se nourrit moins en présence de toxique, les coûts relatifs de maintenance, de croissance et de reproduction ne sont pas modifiés par rapport aux témoins. Comme la fraction κ de l'énergie investie en croissance par rapport à l'énergie investie en reproduction est fixe, l'organisme ne peut pas modifier sa gestion de l'énergie en présence de toxique afin de favoriser la croissance ou la reproduction. Or l'augmentation du nombre de pontes ou de la taille des pontes est un phénomène relativement fréquent chez les organismes soumis à un stress environnemental (Southwood, 1988 ; Townsend *et al.*, 1997). Ainsi, les modèles DEBtox ne permettent pas de prendre en compte le fait que l'organisme puisse réagir à la perturbation de son milieu en modifiant à court terme la valeur des traits d'histoire de vie les plus plastiques.

En dernier lieu, les modèles DEBtox supposent que lorsque la concentration sans effet est franchie, chacune des molécules de toxique absorbé par l'organisme provoque un effet de même intensité. Concrètement, ceci signifie que la relation entre les effets observés et la concentration en toxique dans le milieu est linéaire : il n'y a pas d'action « synergique » entre les molécules du toxique. Cette approche a l'avantage d'être simple car les modèles linéaires nécessitent peu de paramètres.

Cette hypothèse de linéarité est valable chez nos trois organismes pour le zinc : en effet, d'après les courbes concentration-réponse obtenues pour nos trois espèces, une fois que la concentration sans effet observé (NOEC) est franchie, la relation entre la concentration en zinc dans le sédiment et la valeur du critère d'effet mesuré (survie, croissance et reproduction) est de type log-linéaire.

Pour la plupart des composés chimiques, des espèces et des critères d'effet observés, la courbe concentration-réponse est de type log-linéaire. Cependant, cette hypothèse n'est pas toujours valable. Par exemple, certains métaux (tels que le cuivre (De Schamphelaere et Janssen, 2004) ou certains pesticides (Calabrese, 1999) provoquent une amélioration de la survie, de la croissance et / ou de la reproduction lorsqu'ils sont présents à faible dose dans le milieu. Les effets délétères sur ces mêmes paramètres n'apparaissent que lorsque le produit est présent à des concentrations élevées dans le milieu. La courbe concentration-réponse obtenue n'est donc pas de type log-linéaire. Ce phénomène (appelé hormèse) étant relativement fréquent en écotoxicologie, des méthodes statistiques ont été mises au point afin de pouvoir en tenir compte lors du calcul des $CE_{x\%}$ (Van Ewijk *et al.*, 1993). Cependant, il n'est pas possible de tenir compte de ce phénomène en utilisant le modèle DEBtox.

3. INTERET ET LIMITES DE NOS MODELES D'EVALUATION DES EFFETS AU NIVEAU DES POPULATIONS

3.1. Intérêt du changement d'échelle : de l'individu à la population dans le cadre de l'évaluation du risque

Les effets attendus au niveau de la population ont été étudiés à partir des effets observés sur les différents paramètres du cycle de vie individuel. Ce changement d'échelle a été réalisé en couplant des modèles d'effets toxiques individuels (qui prédisent la valeur des paramètres du cycle de vie en fonction de la concentration en zinc dans le milieu) à des modèles biodémographiques (qui prédisent le taux de croissance de la population en fonction des paramètres du cycle de vie des organismes). Ainsi, nos modèles d'effets sur les populations permettent d'évaluer les effets du zinc sur le taux de croissance journalier de la population (effets à très court terme dans les populations) et de calculer un temps moyen d'extinction en fonction de la concentration en toxique (effets à long terme).

L'étude des effets au niveau de la population apporte une plus value aux études de toxicité réalisée dans le cadre de l'évaluation de risque. En effet, la population est le niveau d'organisation biologique le plus pertinent pour appréhender la complexité des effets sur les différentes espèces composant la communauté (Forbes et Calow, 1999 ; Flammarion et Péry, 2004). Ceci est dû au fait que la valeur du taux de croissance de population estimée en situation perturbée intègre de façon réaliste tous les effets observés sur tous les paramètres du cycle de vie de l'individu (Forbes et Calow, 1999). Ainsi, l'utilisation d'une concentration sans effet significatif établie au niveau de la population (CSESP) règle le problème du choix de critère d'effet biologique à retenir dans le cadre de l'évaluation de risque.

Pour prendre un exemple concret, analysons les résultats obtenus au niveau individuel lors des tests chroniques (émergence et reproduction) réalisés pour l'espèce la plus sensible de nos trois taxa (*C. riparius*). Pour cet organisme :

- la plus forte NOEC individuelle obtenue atteint 953 mg/kg ;
- la plus faible NOEC individuelle obtenue est de 60 mg/kg.

Il y a donc un rapport de 16 entre la plus forte et la plus faible NOECs. Dans le cadre de l'évaluation de risque, l'expérimentateur retient comme seuil la plus faible des NOECs proposées, soit 60 mg/kg. Cette valeur est de l'ordre du niveau de contamination de base dans

nos sédiments de référence. Ainsi, son utilisation dans le cadre de l'évaluation du risque du zinc n'est probablement pas pertinente.

D'après ces résultats, l'estimation de concentration sans effet à partir des données individuelles peut conduire à une surestimation des effets de la substance testée. Ce problème a déjà été mis en évidence par de nombreux auteurs (Calow *et al.*, 1997 ; Forbes, 1997 ; Forbes *et al.*, 2001). Ces auteurs ont en outre souligné que les concentrations sans effet obtenues au niveau de la population sont moins conservatrices que celles obtenues au niveau individuel. Elles sont donc à priori plus pertinentes pour l'évaluation des effets des substances chimiques (*loc.cit.*). Cette hypothèse se vérifie dans notre étude. En effet, par rapport à la concentration sans effet sur les individus qui serait retenue pour l'évaluation des effets du zinc sur le chironome (0 mg/kg pour le critère reproduction), la valeur de concentration sans effet significatif estimée au niveau de la population (630 mg/kg) est :

- plus réaliste par rapport au niveau de contamination moyen des sédiments sur le terrain¹⁵ ;
- plus réaliste par rapport à la gamme d'effet du zinc attendue chez les organismes aquatiques d'après les valeurs de TELs et de PELs proposées dans les guides d'évaluation de la qualité des sédiments¹⁶ (voir paragraphe 5.2.).

Par ailleurs, lorsque l'expérimentateur dispose de concentrations sans effet pour plusieurs espèces, le changement d'échelle de l'individu à la population permet de comparer la sensibilité relative des espèces de façon plus fiable.

En effet, d'après les résultats des tests de toxicité au niveau individuel, nos trois espèces ont été classées par ordre de sensibilité décroissante au zinc : *C. riparius*, *V. piscinalis* et *B. sowerbyi*. Le classement obtenu sur la base des effets mesurés au niveau des populations est différent : nous obtenons, par ordre de sensibilité décroissante *C. riparius*, *V. piscinalis* et *B. sowerbyi*. Ceci indique que bien que le chironome soit l'espèce la plus sensible au niveau individuel, ce n'est pas l'espèce la plus sensible au niveau populationnel.

Ainsi, la sensibilité relative des espèces mesurée au niveau individuelle ne reflète toujours pas la sensibilité des populations. Ceci est dû au fait que les effets mesurés sur les taux de survie, de croissance et de fécondité au niveau individuel ne se répercutent pas de façon additive sur le taux de croissance de la population. Concrètement, les effets observés au niveau de la

¹⁵ la concentration moyenne en zinc relevée dans le bassin Rhône-Méditerranée-Corse atteint environ 130 mg/kg. Cette contamination moyenne est deux fois plus élevée dans le bassin Artois-Picardie (294 mg/kg) (Garric, 2002).

¹⁶ TEL zinc = 410 mg/kg et PEL zinc 960 mg/kg (Washington State department of Ecology, 2002).

population ne sont donc pas proportionnels aux effets mesurés sur les différents paramètres du cycle de vie des individus. La façon dont les effets observés au niveau individuel se répercutent au niveau de la population dépend de la stratégie d'histoire de vie des organismes (Kammenga et Riksen, 1996 ; Hellpell *et al.*, 2000).

D'après ces résultats, il apparaît clairement que les comparaisons de sensibilité des différentes espèces aquatiques dans le cadre de l'évaluation des effets du zinc devraient être réalisées à l'échelle de la population, et non plus à l'échelle de l'individu.

Afin d'estimer la concentration seuil pour la population, nous avons étudié la variabilité du taux de croissance journalier dans les populations témoins. En associant deux à deux les valeurs des paramètres de la matrice (*i.e.* taux de survie journaliers juvénile et adulte, âge à la première reproduction et fécondité journalière) obtenues grâce à différents tests réalisés en conditions témoins nous avons généré une distribution théorique des taux de croissance journaliers des populations témoins dans nos conditions expérimentales (voir chapitre V). Nous vérifions tout d'abord que le témoin de notre expérience appartient à la distribution théorique des populations témoins. Ensuite, un simple test d'hypothèse permet de savoir si le taux de croissance de la population observé pour une concentration environnementale donnée (λ_{ce}) « appartient » ou non à cette distribution théorique. Si λ_{ce} appartient à la distribution de $\lambda_{théo}$, alors nous considérons que λ_{ce} n'est pas significativement différent de $\lambda_{théo}$.

Grâce à cette approche, nous pouvons donc estimer si les effets observés sur les populations exposées à de faibles concentrations en zinc sont significatifs par rapport aux données obtenues dans les populations témoins (Péry *et al.*, sous presse). Ceci nous permet d'introduire la notion de concentration sans effet significatif sur la population, ce qui améliore la pertinence de notre évaluation du risque sur la population par rapport aux études actuelles.

D'autres auteurs ont proposé une approche plus classique : la détermination des concentrations sans effet significatifs sur la population est réalisée en comparant les intervalles de confiance des valeurs de λ dans les populations exposées aux toxiques et dans les populations témoins de la même expérience. Il existe deux façons de calculer les intervalles de confiance autour de λ . Sibly *et al.* (2000) ont proposé une méthode basée sur le calcul de la variance de λ à partir de la variance de chacun des paramètres du cycle de vie, de leur covariance et de la sensibilité de λ à chacun de ces paramètres. Concrètement, la variance de λ est égale à la somme pondérée des variances et des covariances des paramètres de la matrice, les poids étant proportionnels à la sensibilité de chacun des paramètres. La sensibilité des paramètres de la matrice est calculée à partir de l'équation d'Euler-Lotka (voir chapitre

V). Kammenga et Riksen (1996) et Dekker *et al.* (2002) proposent de calculer les intervalles de confiance par la méthode de « jack-knife » : cette méthode consiste à calculer λ de façon itérative à partir de l'équation d'Euler-Lotka en enlevant un individu de la population de taille n à chaque itération : nous obtenons ainsi n valeurs de λ qui permettent de calculer un intervalle de confiance à 95% de λ .

Ces deux méthodes nécessitent de calculer λ grâce à l'équation d'Euler-Lotka : elles ne sont pas directement applicables dans notre cas, puisque nous avons calculé λ à partir de la forme matricielle de cette équation. Dans ces deux cas, la concentration sans effet sur la population correspond à la première concentration testée pour laquelle l'intervalle de confiance de λ ne recouvre pas celui de la population témoin.

3.2. Limites et améliorations possibles de notre méthode de changement d'échelle

3.2.1. Limites liées aux hypothèses biologiques

Les principales limites de notre approche de changement d'échelle proviennent des hypothèses biologiques que nous avons posé pour étudier la dynamique de la population.

B. sowerbyi et *V. piscinalis* ayant un cycle de vie d'une durée supérieure à un an, nous ne disposons pas de données expérimentales sur les taux de survie des adultes en fin de vie. Nous avons montré au chapitre III que ces taux de survie peuvent être prédits chez les témoins grâce au modèle de Weibull, qui prend en compte l'accélération de mortalité liée au vieillissement des organismes. Or, afin de faciliter l'étude des effets au niveau de la population, nous avons supposé que les taux de survie journaliers des adultes sont des constantes (voir chapitre V). Ceci indique que nous ne tenons pas compte des effets du vieillissement sur la survie des organismes dans notre population. En conséquence, nous surestimons probablement la durée de vie de nos organismes en laboratoire.

Gurney et Middleton (1996) ont montré que bien que cette simplification soit réalisée dans la plupart des études de dynamiques de population, l'utilisation d'un taux de survie journalier

constant au sein de chaque classe d'âge peut générer des prédictions peu réalistes du taux de croissance de la population. Ainsi, nous avons cherché à estimer l'erreur commise sur la valeur du taux de croissance journalier de la population (λ) en surestimant la durée de vie des adultes.

L'erreur commise en estimant le taux de survie journalier grâce au modèle linéaire par rapport au modèle de Weibull est de l'ordre de 1 % de survie par jour chez nos deux espèces. Nous avons donc étudié la sensibilité de λ dans les populations témoin à une variation de 1% du taux de survie adulte par jour. Nos simulations ont montré que la valeur de λ chez *B. sowerbyi* et *V. piscinalis* n'est pas significativement modifiée par cette variation du taux de survie journalier des adultes. Nous pouvons donc considérer que notre simplification n'affecte pas la pertinence de nos estimations du taux de croissance journalier de la population.

Par ailleurs, nos tests ne nous ont pas permis de connaître le nombre total de reproductions réalisées au cours d'un cycle de vie chez *B. sowerbyi* et *V. piscinalis*, ni de quantifier l'évolution de la fécondité de façon précise au cours du cycle de vie. Ces paramètres démographiques sont très importants dans le cadre de l'étude de la dynamique de population (Caswell, 2001). Cependant, ils sont rarement connus chez les espèces qui présentent un cycle de vie long (Oli, 2003b).

Nous avons fait l'hypothèse que ces organismes se reproduisent jusqu'à leur mort (hypothèse 1), et que leur fécondité journalière est une valeur constante (hypothèse 2). La littérature ne nous permet pas de confirmer ces hypothèses pour les espèces que nous étudions. Nous les avons quand même retenues car elles correspondent aux simplifications adoptées par la plupart des auteurs dans un cas similaire (voir Lande (1988) et Caswell (1989) pour l'hypothèse 1 et Oli (2003b) pour l'hypothèse 2). Suivant nos hypothèses, nous ne tenons pas compte de l'effet éventuel du vieillissement sur les capacités de reproduction des organismes en terme d'âge à la dernière reproduction et de fécondité. Il est donc possible que nous surestimions le taux de croissance journalier des populations témoins.

Oli (2003a) a montré que le taux de croissance des populations chez les organismes à cycle de vie long est relativement peu sensible au paramètre « âge de dernière reproduction ». Ainsi le fait de supposer que l'organisme se reproduit durant toute sa vie a peu d'influence sur l'estimation du taux de croissance de la population (*loc.cit.*).

Par ailleurs, cet auteur a montré que les estimations de taux de croissance obtenues grâce à une matrice simplifiée (matrice qui ne comprend que deux classes d'âge : les juvéniles et les adultes) paramétrée avec une valeur de fécondité constante quel que soit l'âge des adultes sont

proches de celles obtenues avec le modèle de Leslie complet (*i.e.* matrice âge-structurée qui permet de découper la classe d'âge adulte en sous-classes de fécondités journalières différentes).

D'après ces résultats, nous supposons que les hypothèses que nous avons choisies pour décrire la reproduction chez *B. sowerbyi* et *V. piscinalis* ne génèrent pas une erreur importante sur le taux de croissance de la population.

En dernier lieu, nos données ne nous ont pas permis de quantifier de façon fiable les effets du zinc sur les nouveau-nés de *B. sowerbyi* (organismes de poids inférieur à 5 mg ; voir chapitre IV). Ainsi, nous n'avons pas utilisé ces données pour l'étude des effets au niveau de la population. Les effets du zinc sur les nouveau-nés (*i.e.* stade potentiellement le plus sensible) n'ont donc pas été pris en compte dans notre modèle biodémographique.

Afin de quantifier l'importance de cette erreur, nous avons réalisé une étude un peu plus poussée de la sensibilité du taux de croissance journalier de la population (λ) à la proportion de déformations chez les nouveau-nés dans le sédiment. Nous avons vu au chapitre III que les organismes déformés ne sont pas viables. Ainsi, nous avons assimilé chaque nouveau-né déformé à un œuf non viable. Nous avons donc imputé le taux de déformation des nouveau-nés à la variable « taux de reproduction » de notre modèle biodémographique.

Nous avons montré au chapitre VIII que lorsque la concentration en zinc dans le sédiment est supérieure à 551 mg/kg, 67 % en moyenne (IC_{95%} : [32 ; 100]) des nouveau-nés sont déformés. Dans le scénario le plus optimiste d'après cet intervalle de confiance, nous devons réduire le taux de reproduction des organismes exposés de 32% par rapport à celui des témoins lorsque la concentration en zinc dépasse 551 mg/kg afin de tenir compte des effets du zinc sur les nouveau-nés sur le taux de croissance de la population. D'après nos simulations, cette « mortalité embryonnaire » influence significativement la valeur de λ . Nous avons calculé que si la proportion moyenne de nouveau-nés déformés dépasse 11% dans la gamme de concentration testées, alors la valeur de λ obtenue est significativement différente par rapport à celle des populations témoins.

D'après ces résultats, le fait de ne pas prendre en compte la mortalité des nouveau-nés dans notre modèle biodémographique implique que nous sous-estimons probablement largement les effets du zinc sur les populations de *B. sowerbyi*. En effet, la concentration sans effet sur la population de *B. sowerbyi* serait ramenée à 551 mg/kg, soit deux fois moins que la valeur

estimée en tenant pas compte de la déformation des juvéniles en présence de zinc (1186 mg/kg). Ainsi, la réponse biologique au zinc des populations de *B. sowerbyi* serait plus importante que celle de *C. riparius*. En revanche, les populations de *B. sowerbyi* seraient toujours moins affectées par le zinc que les populations de *V. piscinalis*.

Pour conclure, dans le cas où la proportion de nouveau-nés déformés est supérieure à 11% dans la gamme de concentration étudiée [0 ; 3000 mg/kg], le fait de ne pas prendre en compte la proportion de nouveau-nés déformés implique que nous sous-estimons d'un facteur environ égal à 2 les effets du zinc sur la population de *B. sowerbyi*. Ainsi, il est nécessaire de réaliser de nouveaux tests de toxicité du zinc sur les nouveau-nés afin de valider l'estimation de la concentration sans effet sur la population de *B. sowerbyi* que nous proposons. Notons toutefois que cette erreur potentielle ne modifie pas la concentration sans effet sur la communauté estimée à partir de la comparaison de la sensibilité des populations de nos trois espèces.

3.2.2. Limites liées à la construction des modèles biodémographiques

Notre approche souffre de certaines limites « techniques », dues à la structure des modèles biodémographiques.

Nous avons vu au chapitre V que notre modèle ne permet pas de prendre en compte le fait que l'âge des juvéniles au moment de leur exposition au zinc conditionne leur réponse biologique. Ces résultats soulignent un inconvénient du modèle biodémographique à deux classes d'âge: en effet, ce modèle ne permet pas de prendre en compte le caractère temporel de l'exposition des populations. Ceci est problématique dans le cadre de la prédictions des effets d'une pollution passagère et de courte durée sur une population dont le cycle de vie présente des « phases de vulnérabilité ». Par exemple, une pollution courte et occasionnelle n'aura pas le même effet sur notre population de *B. sowerbyi* si elle survient au début du printemps (phase d'éclosion œufs et de sensibilité des juvéniles) que si elle survient à la fin du printemps (moment où la population est principalement composée de juvéniles pré-pubères, peu affectés par la présence de zinc dans le sédiment). Finalement, notre modèle se place implicitement dans le cas de l'étude des effets d'une pollution chronique : il ne permet pas de prévoir de façon fiable les effets d'une perturbation de courte durée sur le taux de

croissance de la population. Ceci n'est pas problématique dans le cadre de l'évaluation du risque du zinc, puisque la pollution au zinc est généralement un évènement chronique. Cependant, cette limite peut poser problème pour l'évaluation du risque de composés dont le rejet constitue une pollution accidentelle.

D'autre part, nous avons vu au chapitre V que les paramètres qui déterminent principalement la dynamique de la population sont la fécondité (chez le chironome) et la survie (chez le gastéropode et l'oligochète). Ces paramètres peuvent être modifiés en réponse à un changement de l'effectif de la population (Moe, 2003) : ceci correspond au phénomène de densité-dépendance.

Ces phénomènes de densité-dépendance permettent de compenser partiellement les impacts du contaminant sur les paramètres clés de la dynamique de population (Landahl *et al.*, 1997). Par exemple, une diminution de la survie liée à la présence du toxique peut induire une diminution de l'effectif de la population. En conditions d'espace et / ou d'alimentation limitantes, cette diminution de survie a pour conséquence directe une augmentation de la quantité de ressource disponible pour les survivants : ceci a pour effet d'améliorer leur croissance et leur fécondité. Cette amélioration des performances individuelles peut permettre de compenser partiellement l'effet négatif provoqué par la diminution de survie sur le taux de croissance de la population (Forbes et Calow, 1999).

Dans nos conditions de tests, l'espace et la nourriture ne sont pas des facteurs limitants pour la croissance et la reproduction des espèces que nous avons étudiées. Cependant, la prise en compte de ces phénomènes de densité-dépendance dans nos modèles biodémographiques permettrait d'améliorer le réalisme de notre étude des effets du zinc sur le taux de croissance de nos populations par rapport aux populations naturelles. Par ailleurs, la prise en compte de la densité-dépendance est une étape nécessaire pour répondre aux questions suivantes :

- si la population perturbée ne disparaît pas du milieu, converge-t-elle vers une situation d'équilibre (et au bout de combien de temps) ?
- si le déséquilibre se maintient au cours du temps, la densité de population subit-elle des oscillations périodiques ou une fluctuation chaotique ?

Connaissant les réponses à ces questions, nous pourrions alors déterminer l'avenir de la population perturbée de façon plus précise.

En dernier lieu, soulignons que nos bioessais n'ont été réalisés que sur une génération de chacune des espèces étudiées. Ainsi, nos données ne nous permettent pas de prendre en compte l'acquisition éventuelle d'une tolérance à la présence de zinc dans nos populations. Ce phénomène de tolérance chez les populations exposées de façon chronique à de fortes concentrations en métaux à été largement mis en évidence chez les invertébrés aquatiques, notamment chez *C. riparius* (Krantzberg et Stokes, 1988) et chez les oligochètes en général (Lafont, 1989). Nous ne disposons d'aucune information quant à l'acquisition d'une tolérance dans les populations de *V. piscinalis*.

L'acquisition de cette tolérance peut survenir dès la deuxième génération chez le chironome exposé au zinc (Miller et Hendricks, 1996). Cette adaptation rapide à la vie en milieu pollué permet probablement aux populations de chironomes de maximiser leur probabilité de persistance dans le milieu. L'étude de ces phénomènes de tolérance en laboratoire, couplée à une étude précise de la dynamique de la population sur plusieurs générations permettrait probablement de prédire l'avenir d'une population exposée à un milieu pollué de façon plus fiable.

4. RELATIONS ENTRE LES TRAITS BIO/ÉCOLOGIQUES DE NOS TROIS ESPÈCES ET LEUR SENSIBILITÉ AU ZINC

Le mode d'action du zinc et les conditions expérimentales utilisées lors des bioessais étant similaires pour nos trois organismes, nous pouvons donc supposer que la plus grande partie de variabilité de réponse biologique observée entre nos espèces est due à leurs différences de traits biologiques et écologiques (Vaal *et al.*, 1997b).

Dans les paragraphes suivants, nous avons mis en relation les capacités de bioaccumulation ainsi que les concentrations sans effet obtenues au niveau de l'individu et de la population avec le profil biologique et écologique de chacune de nos espèces. Ceci nous a permis de voir s'il existe des relations entre les traits d'histoire de vie que nous avons utilisés pour construire notre batterie de tests et la réponse biologique au zinc des organismes qui composent cette batterie. Le plan d'expérience de la thèse n'ayant pas été mis au point afin de démontrer des relations entre les traits et la sensibilité, nous ne pouvons que dégager de grandes tendances à partir des résultats obtenus. Nous interprétons ces tendances à l'aide de la littérature.

4.1. Relations entre les capacités de bioaccumulation individuelles et les traits biologiques et écologiques chez nos trois espèces

Nous avons vu au chapitre IV que *C. riparius* et *V. piscinalis* bioaccumulent le zinc présent dans le sédiment. Les structures de protection de ces organismes jouent un rôle variable dans la bioaccumulation du zinc.

En effet, les métaux s'accumulent à de fortes concentrations dans la cuticule du chironome, la quantité de métal accumulée étant éliminée lors des mues successives de la larve (Groenendijk *et al.*, 1999).

La coquille n'est un pas site de stockage important chez les gastéropodes (Lam *et al.*, 1997), pour qui les métaux s'accumulent préférentiellement dans les glandes digestives (Dallinger et Wieser, 1984) et le mucus (Menta et Parasi, 2001). L'accumulation du zinc dans le mucus est un mécanisme d'élimination important chez les gastéropodes (Menta et Parasi, 2001).

Ainsi, la morphologie des organismes, en liens avec les mécanismes d'élimination des métaux, constitue probablement un facteur explicatif des différences entre les mesures de bioaccumulation obtenues chez le chironome et le mollusque.

Chez *B. sowerbyi*, aucune adaptation morphologique ne permet de neutraliser le zinc. En revanche, la concentration interne en zinc est probablement régulée en augmentant le taux d'élimination *via* les fèces proportionnellement à sa concentration dans le milieu (Luoma et Rainbow, 2005). Cette adaptation physiologique peut être mise en relation avec l'utilisation des ressources (habitat et nourriture) chez cette espèce. En effet, parmi les trois espèces étudiées, *B. sowerbyi* est l'espèce la plus exposée au sédiment contaminé :

- tout le cycle de vie se déroule au contact du sédiment (alors que les œufs, les nouveau-nés et les adultes ne vivent pas dans le substrat chez *C. riparius* et *V. piscinalis*) ;
- le sédiment constitue environ un tiers de l'alimentation de l'organisme (contre un huitième pour *V. piscinalis* et une fraction négligeable pour le chironome, qui se nourrit presque exclusivement de Tétramin®, voir chapitre III).

Ainsi, dans notre expérience, les variables relation au substrat et mode d'alimentation constituent probablement des facteurs explicatifs de la bioaccumulation du zinc par nos organismes. Ces résultats rejoignent les hypothèses de Vaal *et al.* (1997), qui supposent que ces traits liés au niveau d'exposition expliquent partiellement les différences de sensibilité interspécifiques.

4.2. Relations entre la réponse des populations au zinc et les traits biologiques et écologiques de nos trois espèces.

Au chapitre V, nous avons montré que la réponse biologique au zinc varie selon l'espèce étudiée. En effet, la différence entre la concentration sans effet sur la population obtenue pour l'espèce la plus sensible et l'espèce la moins sensible est de l'ordre d'un facteur 4,5 (259 mg/kg chez le mollusque, 630 mg/kg chez le chironome et 1640 chez l'oligochète). Par ailleurs, la réponse biologique des populations de *B. sowerbyi* se distingue de celle des populations de *V. piscinalis* et *C. riparius*. En effet, les concentrations seuils pour le risque d'extinction des populations sont relativement similaires chez *V. piscinalis* et *C. riparius*. Cette concentration seuil est deux fois plus élevée chez *B. sowerbyi* que chez les deux autres espèces étudiées (1640 mg/kg chez le chironome, 1557mg/kg chez le mollusque et 2750 chez l'oligochète).

Ces résultats peuvent être reliés au profil biologique et écologique de chacune de nos espèces. Pour ce faire, nous avons calculé un indice multimétrique qui témoigne de façon quantitative des caractéristiques bio/écologiques de chacune de nos espèces. Cet indice a été calculé comme suit :

- parmi les traits utilisés pour fabriquer nos groupes fonctionnels, nous avons éliminé ceux dont la valeur en laboratoire n'est représentative de la valeur moyenne du terrain. Les traits éliminés sont les suivants : nourriture, dispersion, formes de résistance et nombre de reproduction par an (voir paragraphe 1.4) ;
- parmi les traits restants, nous avons éliminé ceux pour lesquels nos trois taxa n'ont aucune modalité en commun (car ces traits ne permettent pas de comparer le profil de nos trois espèces pour une modalité donnée). A l'issue de ce tri, les traits pris en compte dans notre indice sont les suivants : mode de reproduction, mode d'alimentation, taille maximale, locomotion, stades aquatiques, durée cycle de vie et respiration ;
- pour chaque trait, nous avons choisi parmi les modalités présentes chez nos trois espèces la modalité qui maximise l'exposition des taxa au sédiment. Les modalités retenues sont les suivantes : ponte fixée, mangeur de sédiments fins, taille maximale comprise entre 5 et 10 mm, organisme fouisseur épibenthique (tous les stades du cycle de vie étant aquatiques), durée de vie > 1 an et respiration tégumentaire ;
- nous calculons la valeur de notre indice multimétrique (I) en faisant la somme de la fréquence des notes d'affinité¹⁷ pour chacune de ces modalités chez nos trois espèces ;
- nous vérifions que les valeurs de I obtenues pour nos trois espèces sont significativement différentes grâce à un test du Chi-deux. En effet, nos trois espèces appartenant à des groupes fonctionnels différents, leurs caractéristiques biologiques sont statistiquement différentes : ainsi, les valeurs de I obtenues doivent théoriquement être significativement différentes. Ce test permet de vérifier que la valeur de I rend bien compte de la diversité des caractéristiques biologiques chez les trois espèces étudiées.

Notre indice correspond donc à une note d'affinité globale aux modalités qui maximisent la spécialisation à la vie dans le sédiment chez les espèces aquatiques.

¹⁷ Les notes d'affinité pour *C. riparius* correspondent à des données obtenues en étudiant les traits au niveau de la tribu (*chironomini*), celles de *V. piscinalis* sont obtenues en étudiant les traits au niveau du genre (*Valvata*) et celles de *B. sowerbyi* sont obtenues en étudiant les traits à l'espèce.

Concrètement, plus la valeur de I est élevée, plus la stratégie d'histoire de vie de l'espèce étudiée est favorable à la vie dans le sédiment de référence, mais plus elle est exposée à ce sédiment, et donc à une contamination potentielle. Les valeurs de I pour nos trois espèces sont respectivement 2,1 ; 4,0 et 6,0 pour *C. riparius*, *V. piscinalis* et *B. sowerbyi*. Ceci indique que *B. sowerbyi* et *V. piscinalis* sont potentiellement plus exposées au sédiment contaminé que le chironome, et que ces deux espèces possèdent des stratégies d'histoire de vie plus proches entre elles qu'avec le chironome. Ce résultat confirme les observations réalisées au chapitre III.

Ce classement par ordre de I croissant correspond au classement par ordre de sensibilité décroissante au niveau individuel. D'après ce résultat, il existe potentiellement une relation entre la réponse biologique au zinc des individus pour les trois espèces étudiées et leur spécialisation à la vie dans le sédiment : plus l'espèce est exposée au sédiment, moins elle est sensible à la présence de zinc.

Nous avons vu au chapitre II que ce sont les propriétés abiotiques de l'habitat qui déterminent la valeur des traits biologiques et écologiques des organismes inféodés à cet habitat et guident l'évolution de la valeur de ces traits (Southwood, 1988). Or le zinc est un contaminant ubiquiste, et présent en quantité significative dans les sédiments depuis de nombreuses années. Notre résultat suggère que les espèces les plus inféodées aux sédiments ont acquis une certaine tolérance au zinc au fil de leur évolution, mécanisme connu chez les invertébrés (Barata *et al.*, 1998).

Cependant, cette relation n'est pas vérifiée lorsque nous comparons la réponse biologique des organismes au niveau de la population. En effet, bien que d'après la valeur de notre indice, le gastéropode soit plus exposé au sédiment que le chironome, la sensibilité des populations de chironomes au zinc est moins élevée que la sensibilité des populations de *V. piscinalis*. Ceci indique que dans nos conditions expérimentales, les différences entre les niveaux d'exposition relatifs des espèces ne permettent pas d'expliquer à elles seules les différences de réponse biologiques au zinc des trois espèces que nous avons étudiées.

Par ailleurs, nos résultats ne nous ont pas permis de mettre en évidence une relation entre la stratégie d'histoire de vie des espèces et leur sensibilité au zinc. En effet, nous avons vu au chapitre III que *V. piscinalis* et *B. sowerbyi* présentent une stratégie d'histoire de vie plutôt de type K tandis que le chironome présente plutôt une stratégie de type r, caractéristique des

espèces opportunistes. Cependant, les différences de réponses biologiques au niveau de la population sont maximales entre *V. piscinalis* et *B. sowerbyi*, bien que ces deux espèces présentent des stratégies d'histoire de vie plus similaires entre elles qu'avec le chironome. Ceci indique que dans nos conditions expérimentales, les différences de stratégie d'histoire de vie des organismes ne permettent pas à elles seules d'expliquer leurs différences de réponse biologique au zinc.

Ainsi, les différences de réponses biologiques au zinc entre nos trois espèces ne peuvent être comprises sans considérer à la fois la physiologie et la morphologie des organismes (qui conditionnent la bioaccumulation du zinc dans les tissus), le niveau d'exposition au sédiment (qui conditionne la réponse au niveau individuel) et la stratégie d'histoire de vie (qui conditionne la réponse au niveau des populations).

5. VALIDITE ET FAISABILITE DE NOTRE APPROCHE DANS LE CADRE DE L'EVALUATION DES EFFETS TOXIQUES

Au cours de ce travail, nous avons choisi de construire une batterie de tests pour l'évaluation des effets du zinc sur les communautés benthiques sur la base de l'étude des combinaisons de traits biologiques et écologiques des organismes. Nous avons souhaité maximiser la pertinence écologique de notre batterie. Ainsi, notre batterie réduite est partiellement représentative des stratégies d'utilisation de l'habitat et des stratégies d'histoire de vie des invertébrés benthiques inféodés aux zones aval de cours d'eau.

Par ailleurs, nous avons vu au chapitre I que les traits biologiques et écologiques des espèces déterminent non seulement la structure et le fonctionnement de la communauté, mais aussi leurs réponses aux toxiques. En outre, nous avons vu au chapitre II que les traits qui ont le plus participé à la répartition des taxa dans nos différents groupes fonctionnels correspondent partiellement à ceux qui sont modifiés sur le terrain dans les communautés perturbées par la présence de toxiques (par rapport aux communautés de référence). Ainsi, nous supposons que notre méthode de sélection des espèces pour les tests de toxicité nous permet d'obtenir une batterie de tests au moins partiellement représentative de la gamme de sensibilité des espèces qui composent les communautés naturelles.

Nous avons aussi proposé d'évaluer les effets du zinc sur les communautés à partir des concentrations sans effet sur les populations pour les espèces qui composent notre batterie. Ces concentrations sans effet ont été calculées à partir de résultats de tests de toxicité en couplant :

- le modèle toxico-cinétique linéaire à un compartiment, qui permet de prédire la concentration interne en zinc à partir de la concentration mesurée dans le sédiment ;
- le modèle DEBtox, qui permet de prédire les effets du zinc sur les différents paramètres du cycle de vie des organismes au niveau des individus ;
- un modèle biodémographique matriciel à deux classes d'âge, qui permet de prédire les effets du zinc sur le taux de croissance de la population.

La concentration sans effet sur la communauté correspond à la plus faible concentration sans effet obtenue au niveau de la population pour les différentes espèces qui composent notre batterie de tests.

Dans les paragraphes suivants, nous cherchons à apprécier la pertinence de l'évaluation des effets du zinc que nous avons réalisée grâce à cette approche. Nous avons donc comparé nos concentrations seuils pour l'effet du zinc :

- à la gamme de réponses biologiques mesurées au laboratoire au niveau individuel pour les espèces utilisées en routine en écotoxicologie ;
- aux concentrations sans effet du zinc sur les communautés benthiques issues de tests de laboratoire et d'études sur le terrain.

5.1. Pertinence de l'évaluation de la toxicité du zinc réalisée au niveau individuel par rapport aux résultats de laboratoire existants

Dans ce paragraphe, nous cherchons à voir si notre batterie de tests réduite à trois espèces est suffisamment sensible pour l'évaluation des effets du zinc sur les invertébrés. Pour ce faire, nous avons comparé les valeurs de concentrations sans effet observé (NOECs) obtenues au niveau individuel pour nos trois espèces tests avec celles obtenues pour les espèces utilisées en routine en écotoxicologie (tableau L).

D'après les résultats de ces études, les NOECs obtenues pour les différentes espèces d'invertébrés benthiques utilisées en routine pour l'évaluation des effets du zinc appartiennent à la gamme de NOECs que nous avons obtenues au niveau individuel avec les trois organismes composant notre batterie de tests, soit entre 60 et 3317 mg/kg. La batterie de tests réduite est donc au moins aussi sensible que les batteries déjà existantes.

Tableau L. Effets du zinc mesuré en laboratoire pour les espèces utilisées en routine en écotoxicologie et exposés à différents sédiments naturels.

<i>Auteurs</i>	<i>Organisme étudié</i>	<i>Durée du test (j)</i>	<i>Effet observé</i>	<i>NOEC (mg/kg)</i>
Wentsel <i>et al.</i> (1978)	<i>Chironomus tentans</i>	17	Survie	77
Sibley <i>et al.</i> (1996)		20	Survie	65
Krantzberg et Sherman (1995)		10	Croissance	180
Kemble <i>et al.</i> (1994)	<i>Chironomus riparius</i>	28	Survie	De 408 à 1064 selon COT ¹
Hansen <i>et al.</i> (1996)	<i>Hyaella azteca</i>	10	Survie	3250
Borgmann et Norwood (1997)		21	Survie	2705
Kemble <i>et al.</i> (1994)		28	Survie	1064
Kemble <i>et al.</i> (1994)		28	Croissance	De 294 à 700 selon COT ¹
Krantzberg et Sherman (1995)	<i>Hexagenia limbata</i>	21	Croissance	180

¹ carbone organique total dans le sédiment (g/kg)

5.2. Pertinence de l'évaluation de la toxicité du zinc réalisée au niveau de la communauté par rapport aux résultats de laboratoire existants

Nous avons testé la pertinence de notre évaluation des effets du zinc sur la communauté benthique par rapport aux critères de qualité des sédiments naturels pour le zinc. Ces critères de qualité sont basés sur deux types de concentrations seuil pour les effets du zinc sur la communauté benthique :

- la concentration en zinc ne provoquant pas d'effet sur les organismes aquatiques (TEL) ;
- et la concentration « à risque » pour la faune aquatique (PEL).

Les TELs et les PELs sont estimées grâce à des bioessais en laboratoire pour les espèces tests standard. Leur estimation pour le zinc varie selon les auteurs. Par exemple, les plus faible et plus forte valeurs estimées pour la TEL sont respectivement de 98 mg/kg (US EPA,

1996) et 150 mg/kg (EC MENVIQ, 1992). De même, la plus faible valeur estimée pour la PEL est de 270 mg/kg (Long et Morgan, 1991), tandis que la plus forte valeur estimée est de 820 mg/kg (Persaud *et al.*, 1992).

Afin de tenir compte de la variabilité des TELs et des PELs, MacDonald *et al.* (2000) ont calculé une CB-TEC et une CB-PEC qui correspondent respectivement à la moyenne géométrique des valeurs de TELs et de PELs disponibles dans la littérature pour le zinc. Les CB-TEC et CB-PEC ont été estimées respectivement à 121 et 459 mg/kg. Ces valeurs sont basées sur l'étude d'un grand nombre de données de laboratoire et servent de référence dans les guides réglementant la qualité des sédiments aux Etats-Unis. La concentration sans effet du zinc sur la communauté benthique calculée suivant notre approche (259 mg/kg) se situe entre ces deux valeurs réglementaires. Ainsi, les résultats de notre étude au niveau de la communauté sont réalistes par rapport aux valeurs proposées dans le cadre de l'évaluation de la qualité des sédiments en laboratoire.

5.3. Pertinence de l'évaluation de la toxicité du zinc réalisée au niveau de la communauté benthique théorique par rapport à la sensibilité des communautés naturelles

Dans ce paragraphe, nous avons comparé notre concentration sans effet sur la communauté benthique avec les résultats d'une étude *in situ* réalisée par Burton *et al.* (2005). Cette étude était destinée à valider sur le terrain les valeurs de concentrations sans effet du zinc sur les communautés benthiques prédites par le modèle AVS-SEM (modèle qui permet de prendre en compte la biodisponibilité du zinc dans les sédiments lors de la prédiction de ses effets toxiques). Dans cette étude, des sédiments naturels provenant de quatre stations différentes ont été enrichis en zinc au laboratoire (concentrations nominales testées : 0, 400 et 1200 mg/kg) puis re-transférés sur le terrain. Les auteurs ont ensuite suivi la colonisation des sédiments par les invertébrés benthiques, puis l'évolution de la structure taxonomique de la communauté en 9 mois (3 dates d'échantillonnage), en fonction de la concentration en zinc.

Cette étude a montré que dans un sédiment dont les caractéristiques physico-chimiques (en particulier le taux de carbone organique et la granulométrie) sont proches de celles du

sédiment que nous avons utilisé pour réaliser nos tests de toxicité (sédiment de Port Galland), la présence de zinc à hauteur de 358 mg/kg n'affecte pas significativement la structure de la communauté benthique. Ainsi, la concentration sans effet sur la communauté benthique prédite grâce à notre approche (259 mg/kg) est cohérente avec ces résultats obtenus *in situ*.

Ceci montre que notre approche nous permet d'estimer en laboratoire une concentration sans effet du zinc sur les communautés benthiques relativement fiable, et pour une charge de travail moindre que dans l'expérience entreprise par Burton *et al.* (2005) sur le terrain.

5.4. Faisabilité de notre approche dans le cadre de l'évaluation des effets des substances chimiques

Au terme de notre travail, il faut se poser la question de l'applicabilité de l'approche que nous avons utilisée pour l'évaluation du risque. Nous avons vu que notre approche nous a permis de proposer une évaluation des effets du zinc sur les communautés benthiques relativement fiable. Cependant, ceci n'est pas généralisable aux contaminants qui présentent un mode d'action différent de celui du zinc. En effet, les caractéristiques physiologiques des organismes n'ont pas été prises en compte pour le choix des membres de notre batterie de tests. Nous avons montré au chapitre I que ces critères déterminent la sensibilité des organismes à l'échelle cellulaire, en liens avec le mode d'action du toxique. Ainsi, notre batterie de tests ne permet probablement pas de représenter la gamme de variabilité de la sensibilité des invertébrés benthiques à un contaminant qui possède un mode d'action différent de celui du zinc. Cette hypothèse est supportée par les études de Thurston *et al.* (1985), qui ont montré que l'utilisation d'une batterie de tests prédéfinie quel que soit le toxique étudié est à remettre en cause. Afin d'utiliser notre approche dans le cadre de l'évaluation du danger des substances chimiques, il faudrait donc mettre au point les batteries spécifiquement adaptées à l'étude des différents modes d'action des contaminants. Par ailleurs, il faudrait développer les modèles d'effets au niveau individu et population pour chacune des espèces composant la batterie.

Une fois que ces outils seraient disponibles, le travail de routine pour l'évaluation des effets d'un produit donné consisterait à réaliser les tests de toxicité, ainsi que la modélisation des effets au niveau des individus et des populations pour chacune des espèces de la batterie.

Dans ce contexte, l'utilisation des modèles DEBtox nécessite de réaliser des tests de toxicité au moins deux fois plus lourds (en termes de nombre de réplicats) que les tests standardisés actuellement utilisés. En effet, la prise en compte de la cinétique du toxique nécessite de disposer de plusieurs mesures de la réponse biologique de l'organisme au produit, réalisées pour des durées d'exposition croissantes.

Par ailleurs, l'étude des effets toxiques au niveau des populations rajoute une charge de travail supplémentaire par rapport aux méthodes actuelles d'évaluation des effets toxiques, pour lesquels l'analyse des résultats de test de toxicité est réalisée au niveau de l'individu seulement. Ainsi, la charge de travail à fournir pour réaliser une évaluation des effets toxiques grâce à nos modèles est relativement lourde.

Cette charge de travail peut être amoindrie en rationalisant le plan expérimental des tests de toxicité (en termes de durée, de nombre de tests, de nombre de réplicats et de nombre de concentration testées). En effet, nous avons du réaliser des tests relativement lourds pour paramétrer nos modèles. Cependant, l'utilisation de ces modèles en routine nécessite un travail expérimental moindre que celui que nous avons réalisé.

Finalement, nous supposons que l'utilisation de notre approche en routine serait relativement plus lourde que l'utilisation des méthodes existantes, mais qu'elle permettrait sans doute d'améliorer la pertinence écologique de l'évaluation des effets toxiques au niveau de la communauté par rapports aux méthodes actuelles.

6. SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES

L'évaluation de la réponse biologique des organismes aux toxiques vise *in fine* à protéger le fonctionnement des communautés naturelles potentiellement exposées aux produits étudiés. Dans le cadre de la thèse, nous nous sommes interrogés sur les méthodes actuellement utilisées pour l'évaluation des effets des substances chimiques. Nous sommes partis du constat qu'il existe de nombreuses incertitudes lors de l'extrapolation de la réponse biologique de quelques espèces étudiées au laboratoire à la réponse attendue au niveau de la communauté naturelle. Nous nous sommes focalisés sur deux sources d'incertitudes : tout d'abord, la notion de fonctionnement de la communauté est seulement abordée *via* la notion de chaîne trophique ou de taxonomie ; par ailleurs, l'évaluation de la réponse biologique au seul niveau individuel ne rend pas bien compte de l'ensemble des effets provoqués à long terme par le contaminant sur les communautés étudiées.

Face à ce constat, nous avons proposé des méthodes alternatives afin de mieux choisir les espèces à inclure dans les batteries de tests et de mieux évaluer leur réponse biologique au contaminant étudié.

Ainsi, nous avons abordé la notion de fonctionnement de la communauté plus directement lors du choix des espèces test, en basant notre choix sur des variables explicatives de ce fonctionnement : les traits biologiques et écologiques. Dans cette approche, la notion d'espèce est donc abandonnée au profit de la notion de traits, sous l'hypothèse que ces traits peuvent expliquer partiellement le fonctionnement de la communauté et la gamme de sensibilité des organismes composant cette communauté.

Par ailleurs, nous avons évalué la réponse biologique des espèces choisies en tenant compte de l'ensemble des effets du contaminant sur le cycle de vie des organismes à un niveau d'organisation biologique pertinent par rapport à la communauté : la population.

Cette approche a été utilisée afin d'évaluer une concentration sans effet sur une communauté de macroinvertébrés benthiques de zone aval de cours d'eau ou de lac pour une substance de référence, le zinc.

Pour ce faire, nous avons tout d'abord mis au point une méthode qui permet de construire des batteries de tests en nous basant sur l'étude des traits biologiques et écologiques des invertébrés benthiques. La batterie que nous avons obtenue est la suivante : *Chironomus riparius*, *Valvata (Cincinna) piscinalis*, *Branchiura sowerbyi*, *Lumbriculus variegatus* et *Sericostoma personatum*. Cette batterie représente relativement bien les combinaisons de traits biologiques et écologiques rencontrées dans les communautés d'invertébrés benthiques.

Cependant, pour une question de faisabilité des expériences, seuls trois des cinq taxa de cette batterie ont été étudiés dans le cadre de la thèse : *C. riparius*, *V. piscinalis*, *B. sowerbyi*. Dans cette batterie réduite, les organismes filtreurs stricts, les broyeurs, les prédateurs et les organismes qui se reproduisent de façon asexuée ne sont pas représentés. Cette batterie réduite n'est donc que partiellement représentative de la typologie de traits biologiques et écologiques rencontrée dans la communauté benthique.

B. sowerbyi, *V. piscinalis* n'étant pas communément utilisées en écotoxicologie, les méthodes de prélèvement, d'acclimatation, d'élevage et de tests de toxicité pour ces organismes ont été mises au point durant la thèse.

Pour les trois espèces de la batterie réduite, nous avons ensuite évalué la réponse biologique des populations à la présence de zinc dans le sédiment. Cette évaluation a nécessité la réalisation de différents changements d'échelle. Connaissant la concentration en zinc dans le sédiment, les modèles DEBtox nous ont permis de prédire les effets attendus sur les paramètres du cycle de vie des organismes (survie, croissance et reproduction). Les effets attendus sur la population ont alors été évalués en couplant les modèles d'effets au niveau individuel avec des modèles biodémographiques simples, basés sur l'étude du cycle de vie des organismes.

L'utilisation des modèles DEBtox nous a permis de tester différents scénarii d'effets concernant la perturbation de la gestion de l'énergie par le toxique. Par ailleurs, ces modèles nous ont permis de calculer des concentrations sans effet (CSE) sur les différents paramètres du cycle de vie de l'individu. Ces CSEs sont indépendantes de la gamme de concentration testée et de la durée des tests de toxicité. L'utilisation des modèles matriciels à deux classes d'âge nous a permis d'intégrer de façon simple les effets observés sur tous les paramètres du

cycle de vie de l'individu en un seul paramètre : le taux de croissance journalier de la population.

Les concentrations sans effets sur ce paramètre obtenues pour les trois espèces testées nous ont enfin permis d'estimer une concentration sans effet du zinc sur la communauté benthique, soit 259 mg/kg dans nos conditions expérimentales. Cette concentration en zinc sans effet sur la communauté est réaliste par rapport aux résultats obtenus sur le terrain.

Grâce à notre démarche, nous avons donc été capables de construire une batterie de tests qui est représentative de la typologie de traits rencontrée dans la communauté et au moins partiellement représentative de la gamme de réponse biologique au zinc des organismes qui composent cette communauté. Nous avons montré que notre batterie de test est au moins aussi sensible que les batteries existantes pour l'étude du zinc. Cependant, nous ignorons quelle est l'étendue de la gamme de sensibilité représentée avec notre batterie par rapport à la gamme de sensibilité de l'ensemble des espèces composant la communauté benthique.

Au terme de ce travail, certaines questions restent à aborder dans le cadre de la validation de ces outils au laboratoire. En effet, deux espèces sur les cinq qui composent notre batterie de tests n'ont pas été étudiées. Il serait intéressant de voir comment l'étude de la sensibilité des populations de *L. variegatus* de et *S. personatum* modifie notre évaluation des effets du zinc sur les communautés d'invertébrés benthiques. Par ailleurs, il serait souhaitable d'estimer l'étendue de la gamme de sensibilité au zinc que nous parvenons à représenter avec nos 5 espèces, par rapport à la gamme de sensibilité de l'ensemble des espèces benthiques.

En outre, les modèles d'effets au niveau individuel n'ont pas été validés expérimentalement pour *B. sowerbyi* et *V. piscinalis*. Cette validation, ainsi qu'une évaluation de leur robustesse, sont nécessaires afin de pouvoir les utiliser correctement dans de prochaines études au laboratoire.

Dans la perspective d'une amélioration de la pertinence toxicologique de notre approche, l'utilisation de modèles toxico-cinétiques à plusieurs compartiments serait souhaitable afin de pouvoir prendre en compte les différentes voies d'absorption du contaminant.

Par ailleurs, dans un souci de réalisme par rapport au terrain, nous souhaiterions pouvoir prendre en compte :

- les fluctuations de la température, de la qualité physico-chimique du milieu et de la quantité de nourriture disponible dans les modèles d'effets au niveau individuel ;
- la notion de densité-dépendance dans les modèles d'effets sur les populations.

En dernier lieu, notre démarche d'évaluation des effets nécessite encore des développements afin d'être éventuellement applicable en routine pour l'évaluation du danger des substances chimiques. En effet, il faudrait mettre au point les batteries spécifiquement adaptées à l'étude des différents modes d'action des contaminants, ainsi que les modèles d'effets individuels et populationnels pour chacune des espèces composant la batterie. Par ailleurs, il faudrait mettre au point des protocoles de test standardisés et développer des logiciels qui permettent de prédire les effets attendus sur les populations de façon simple et accessible aux utilisateurs potentiels de cette méthode.

REFERENCES

- Ali A., 1995, Nuisance, economic impact and possibilities for control, in *The Chironomidae: Biology and ecology of non-biting midges*, Armitage P. D., Cranston P. S. & Pinder L. C. V. (Eds), Chapman & Hall, London, 339-364.
- Al-Mohanna S.Y. & Subrahmanyam M.N.V., 2001, Flux of heavy metal accumulation in various organs of the intertidal marine blue crab *Portunus pelagicus* from the Kuwait coast after the Gulf War, *Environment International*, **27**, 321-326.
- 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.
- Admiraal W., Van der Velde G., Smit H. & Cazemier W.G., 1993, The rivers Rhine and Meuse in the Netherland : present state and signs of ecological recovery., *Hydrobiologia*, **265**, 97-128.
- Agence française de normalisation, 2004, *Détermination de la toxicité des sédiments d'eau douce vis-à-vis de Chironomus riparius*, AFNOR (Ed.), Paris, 20 p.
- Aldenberg T. & Jaworska J.S., 2000, Uncertainty of the hazardous concentration and fraction affected for normal species sensitivity distributions, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **46**, 1-18.
- Aldenberg T. & Slob W., 1993, Confidence limits for hazardous concentrations based on logistically distributed NOEC toxicity data, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **25**, 48-63.
- American Society for Testing and Materials, 2000, Test method for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates, in *ASTM Standards on Biological Effects and Environmental Fate, 2nd Edition*, ASTM (Ed.), Philadelphia, 18-23.
- Archambault V., 2003, Réponses bio-écologiques des macronvertébrés benthiques aux perturbations: la base d'un outil diagnostic fonctionnel des écosystèmes d'eaux courantes, Thèse de doctorat en sciences, université de Metz, 218-226.
- Armitage P.D., Cranston P.S. & Pinder L.C.V., 1995, *The Chironomidae: biology and ecology of non-biting midges.*, Chapman and Hall (Eds.), London, 1572 p.
- Aston R.J., 1968, The effect of temperature on the life cycle, growth and fecundity of *Branchiura sowerbyi* (*Oligochaeta, Tubificidae*), *Journal of Zoology, London*, **154**, 29-40.
- Aston R.J., 1973, Tubificids and water quality: a review, *Environmental Pollution*, **5**, 1-10
- Aston R.J., 1984, The culture of *Branchiura sowerbyi* (*Oligochaeta, Tubificidae*) using cellulose substrate, *Aquaculture*, **40**, 89-94.
- Aston R.J. & Milner A.G.P., 1982, Conditions required for the culture of *Branchiura sowerbyi* (*Oligochaeta: Tubificidae*) in activated sludge, *Aquaculture*, **26**, 155-160.

- Atrill 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.
- Baker J.H. & Bradnam L.A., 1976, The role of bacteria in the Nutrition of Aquatic Detritivores, *Oecologia*, **24**, 95-104.
- Barata C., Markich S. J. & Baird D. J., 1998, Influence of genetic and environmental factors on the tolerance of *Daphnia magna* Straus to essential–non essential metals. *Aquatic Toxicology*, **42**, 115–137.
- Barata C., Baird D. J. , Soares A. M. V. M. & Guilhermino L. , 2001, Biochemical factors contributing to response variation among resistant and sensitive clones of *Daphnia magna* Straus exposed to ethyl parathion, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **49**, 155-163.
- Bat L., Raffaelli D. & Marr I.L., 1998, The accumulation of copper, zinc and cadmium by the amphipod *Corophium volutator* (Pallas), *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **223**, 167-184.
- Bayne B.L., 1998, The physiology of suspension feeding by bivalve molluscs: an introduction to the Plymouth "TROPHEE" workshop, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **219**, 1-19.
- Bazzanti M., Chiavarini S., Cremisini C. & Soldati P., 1997, Distribution of PCB congeners in aquatic ecosystems : a case study, *Environment International*, **23**, 799-813.
- Bebianno M.J. & Langston W.J., 1998, Cadmium and metallothionein turnover in different tissues of the gastropod *Littorina littorea*, *Talanta*, **46**, 301-313.
- Beddard F.E., 1892, A new branchiate Oligochaete : *Branchiura sowerbyi*, *Quarterly Journal of Microscopical Science*, **33**, 325-341.
- Bennett J. & Cabbage J., 1992, *Evaluation of bioassay organisms for freshwater sediment toxicity testing*, Washington state department of ecology (Ed.), Washington D.C., 29 p
- Benoit D.A., Sibley P.K., Juenemann J.L. & Ankley G.T., 1997, *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **16**, 1165-1176.
- Berg M.B. & Hellenthal R.A., 1992, The role of chironomidae in energy flow of a lotic ecosystem, *Netherlands Journal of Aquatic Ecology*, **26**, 471-476.
- Bernard F., 1890, Recherches sur *Valvata (Cincinna) piscinalis*, *Bulletin scientifique de la France et de la Belgique*, **22**, 253-371.
- Berrahou A., 1993, Répartition longitudinale des macroinvertébrés benthiques du Rhone français et sa relation avec les principaux affluents. Thèse de doctorat en sciences, Université Lyon 1, 208 p
- Binder E., 1967, La coquille embryonnaire des Valvatidae (Moll. Gastropoda), *Archiv für Molluskenkunde*, **96**, 21-24.
- Blust R. & Vercauten K.B., 1999, Uptake of cadmium and zinc by the mussel *Mytilus edulis* and inhibition by calcium channel and metabolic blockers, *Marine Biology*, **135**, 615-626.
- Bodon M., Manganelli G. & Giusti F., 2001, A survey of the European Valvatiform Hydrobiid genera, with special reference to *Hauffenia pollonera*, 1898 (*Gastropoda: Hydrobiidae*), *Malacologia*, **43**, 103-215.

- Bonacina C., Pasteris A., Bonomi G. & Marzuoli D., 1994, Quantitative Observations on the Population Ecology of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Tubificidae), *Hydrobiologia*, **278**, 267-274.
- Bongers T., Ilieva-Makulec K. & Ekschmidt K., 2001, Acute sensitivity of nematode taxa to CuSO₄ and relationship with feeding-type and life history classification, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **20**, 1511-1516.
- Bonnomet V. 2002, Modélisation mathématique des effets toxiques chez les espèces vivantes, Thèse de doctorat en sciences, Université Lyon 1, 1-34.
- Bornette G., Henry C., Barrat M.H. & Amoros C., 1994, Theoretical Habitat Templates, Species Traits, and Species Richness - Aquatic Macrophytes in the Upper Rhone River and Its Floodplain, *Freshwater Biology*, **31**, 487-505.
- Borgmann U. & Norwood W.P., 1997, Toxicity and accumulation of zinc and copper in *Hyalella azteca* exposed to metal-spiked sediments, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **54**, 1046-1054.
- Bournaud M., 1994, Theoretical Habitat Templates, Species Traits, and Species Richness - Birds in the Upper Rhone River and Its Floodplain, *Freshwater Biology*, **31**, 469-485.
- Bournaud M., Cellot B., Richoux P. & Berrahou A., 1996, Macroinvertebrate community structure and environmental characteristics along a large river: congruity of patterns for identification to species or family, *Journal of the North American Benthological Society*, **15**, 232-253.
- Brinkhurst R.O. & Chua K.E., 1969, Preliminary investigation of the exploitation of some potential nutritional resources by three sympatric Tubificid Oligochaetes, *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, **26**, 2659-2668.
- Brown J.H., Gillooly J.F., Allen A.P., Savage V.M. & West G.B., 2004, Towards a metabolic theory of ecology, *Ecology*, **85**, 1771-1789.
- Burton G.A. & Scott K.J., 1992, Sediment Toxicity Evaluations, *Environmental Science & Technology*, **26**, 2068-2075.
- Burton G.A., Nguyen L.T.H., Janssen C., Baudo R., Mc William R., Bossuyt B., Beltrami M. & Green A., 2005, Field validation of sediment zinc toxicity, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **24**, 541-553.
- Byrne P.A. & O'Halloran J., 2001, The role of bivalve molluscs as tools in estuarine sediment toxicity testing: a review, *Hydrobiologia*, **465**, 209-217.
- Cairns J. Jr., 1986, The myth of the most sensitive species, *BioScience*, **36**, 670-672.
- Calabrese E.J., 1983, *Principles of animal extrapolation*, J. Wiley & sons (Eds.), New York, 252 p.
- Calow P., 1991, Physiological costs of combating chemical toxicants: ecological implications, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **100C**, 3-6.
- Calow P., Sibly R.M. & Forbes V., 1997, Risk assessment on the basis of simplified life-history scenarios, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **16**, 1983-1989.
- Canivet V. & Gibert J., 2002, Sensitivity of epigeal and hypogean freshwater macroinvertebrates to complex mixtures. Part I: Laboratory experiments, *Chemosphere*, **46**, 999-1009.

Cardoso J.F.M.F., Van der Meer J. & Van der Weer H.W., 2001, *Interspecies comparison of energy flow in some North Atlantic bivalve species by means of dynamic energy budgets*, International Council for the Exploitation of the Sea (Ed.), CM 2001/J:43, 22 p.

Carroll J.H. & Dorris T.C., 1972, The life history of *Branchiura sowerbyi*, *The American Midland Naturalist*, **87**, 413-422.

Casado M.A., Ramirez-Sanz L., Castro I., De Miguel J.M. & De Pablo C.L., 1997, An objective method for partitioning dendrograms based on entropy parameters, *Plant Ecology*, **131**, 193-197.

Casellato S., 1984, Life-cycle and karyology of *Branchiura sowerbyi* Beddard (*Oligochaeta, Tubificidae*), *Hydrobiologia*, **115**, 65-69.

Casellato S., Martnucci G. & Zoja E., 1987, Ultrastructural features of gametogenesis during the life-cycle in *Branchiura sowerbyi* Beddard (*Oligochaeta, Tubificidae*), *Hydrobiologia*, **155**, 145-154.

Casellato S., Aiello R., Negrisola P.A. & Seno M., 1992, Long-term experiment on *Branchiura sowerbyi* Beddard (*Oligochaeta, Tubificidae*) using sediment treated with LAS (Linear Alkylbenzene Sulfonate), *Hydrobiologia*, **232**, 169-173.

Castella E. & Speight M.C.D., 1996, Knowledge representation using fuzzy coded variables: an example based on the use of *Syrphidae* (Insecta, Diptera) in the assessment of riverine wetlands, *Ecological Modelling*, **85**, 13-25.

Caswell H., 1989, *Matrix population models: construction, analysis and interpretation*, Sinauer Associates (Eds.), Sunderland, Massachusetts, USA, 648 p.

Caswell H., 2001, *Matrix Population Models: construction, analysis, and interpretation, second edition*, Sinauer Associates (Eds.), Sunderland, Massachusetts, USA, 722 p.

Chapman P.M., 2001, Utility and relevance of aquatic oligochaetes in ecological risk assessment, *Hydrobiologia*, **463**, 149-169.

Chapman P.M., Caldwell R.S. & Chapman P.F., 1996, A warning: NOECs are inappropriate for regulatory use, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **15**, 77-79.

Charles S., 2004, Les modèles matriciels de type Leslie: une approche couplée mathématiques et statistiques, Mémoire d'habilitation à diriger les recherches, Université Lyon 1, 169 p.

Charles S., Ferreol M., Chaumot & A., Pery A.R.R., 2004, Food availability effect on population dynamics of the midge *Chironomus riparius*: a Leslie modeling approach, *Ecological Modelling*, **175**, 217-229.

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., Faessel B., Dolédec S. & Statzner B., 2001, *Nouvelles approches de la bioévaluation à partir des invertébrés benthiques : bases théoriques, outils biométriques et validation à l'échelle de grands bassins*, Cemagref (Ed.), Lyon, 37-56.

Charvet S., Roger M.C., Faessel B. & Lafont M., 1998, Evaluation de l'état de santé écologique des hydrosystèmes par l'utilisation des traits biologiques, *Annales de Limnologie*, **34**, 455-464.

- Chatarpaul L., Robinson J.B. & Kaushi N., 1980, Effects of tubificid worms on denitrification and nitrification in stream sediment, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, **37**, 656-663.
- Chen B.C. & Liao C.M., 2004, population models of farmed abalone *Haliotis diversicolor supertexta* exposed to waterborne zinc, *Aquaculture*, **242**, 251-269.
- Chessel D., Dufour A.B. & Thioulouse J., 2003, Analyse des Correspondances Multiples, <http://pbil.univ-lyon1.fr/R/fichestd/tdr54.pdf>.
- Chevenet F., Doledec S. & Chessel D., 1994, A fuzzy coding approach for the analysis of long-term ecological data, *Freshwater Biology*, **31**, 295-309.
- Chew R.D. & Hamilton M.A., 1985, Toxicity curve estimation: fitting a compartment model to median survival times, *Transactions of the American Fisheries Society*, **114**, 403-412.
- Clark J., Ortego L.S. & Fairbrother A., 2004, Sources of variability in plant toxicity testing, *Chemosphere*, **57**, 1599-1612.
- Crane M. & Newman M.C., 2000, What level of effect is a no observed effect ?, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **19**, 516-519.
- Cleland D., 1954, A study of the habits of *Valvata (Cincinna) piscinalis* (Müller) and the structure and function of the alimentary canal and reproductive system, *Proceedings of the malacological society of London*, **30**, 167-203.
- Cranston P.S., 1995, Introduction to the Chironomidae, in *The Chironomidae: biology and ecology of non-biting midges*, Armitage P. D., Cranston P. S. & Pinder L. C. V. (Eds.), Chapman and Hall, London, 1-2.
- Dallinger R. & Wieser W., 1984, Patterns of accumulation, distribution and liberation of zn, cu, cd and pb in different organs of the land snail *Helix pomatia* L, *Comparative Pharmacology and Toxicology*, **79**, 117-124.
- Dangles O. & Guerold F., 2001, Influence of shredders in mediating breakdown rates of beech leaves in circumneutral and acidic forest streams, *Archiv Fur Hydrobiologie*, **151**, 649-666.
- Davoren M. & Fogarty A.M., 2004, A test battery for the ecotoxicological of the agrochemical Environment, *Ecotoxicology and Environment Safety*, **59**, 116-112.
- Day K.E., Kirby R.S. & Reynoldson T.B., 1994, Sexual dimorphism in *Chironomus riparius* (Meigen): impact on interpretation of growth in whole-sediment toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **13**, 35-39.
- De Bruijn J.M.H. & Van Leeuwen C.J., 1996, No-effect concentrations in environmental policies, in *The analysis of aquatic toxicity data*, VU University Press (Ed.), Amsterdam.
- De Haas E.M., Reuvers B., Moermond C.T.A., Koelmans A.A. & Kraak M.H.S., 2002, Responses of benthic invertebrates to combined toxicant and food input in floodplain lake sediments, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **21**, 2165-2171.
- Dekker T., Krips O.E. & Admiraal W., 2002, Life history changes in the benthic cladoceran *Chydorus piger* induced by low concentrations of sediment-bound cadmium, *Aquatic Toxicology*, **56**, 93-101.

- Ditsworth G.R., Schults D.W. & Jones J.K.P., 1990, Preparation of benthic substrates for sediment toxicity testing, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **9**, 1523-1529.
- Dolédec S. & Chessel D., 1994, Co-inertia analysis - an alternative method for studying species environment relationships, *Freshwater Biology*, **31**, 277-294.
- Dolédec S., Olivier J.M. & Statzner B., 2000, Accurate description of the abundance of taxa and their biological traits in stream invertebrate communities: effects of taxonomic and spatial resolution, *Archiv für Hydrobiologie*, **148**, 25-43.
- Dolédec S., Statzner B. & Bournard M., 1999, Species traits for future biomonitoring across ecoregions: patterns along a human-impacted river, *Freshwater biology*, **42**, 739-758.
- Doull J., Klaassen C.D. & Amdur M.D., 1980, *Casarett and Doull's toxicology, second edition*, Doull, Klaassen & Amdur (Eds), Macmillan Publishing Co, New York, 429 p.
- Downe A.E.R., 1973, Some factors influencing insemination in laboratory swarms of *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae), *The Canadian Entomologist*, **105**, 291-298.
- De Pirro M., & Marshall D.J., 2005, Phylogenetic differences in cardiac activity, metal accumulation and mortality of limpets exposed to copper: a Prosobranch-Pulmonate comparison, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **322**, 29-37.
- De Schampelaere K.A.C. & Janssen C.R., 2004, Effects of chronic dietary copper exposure on growth and reproduction of *Daphnia magna*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23**, 2038-2047.
- Drewes C.D. & Zoran M.J., 1989, Neurobehavioral specializations for respiratory movements and rapid escape from predators in posterior segments of the Tubificid *Branchiura sowerbyi*, *Hydrobiologia*, **180**, 65-71.
- Ducrot V., 2002, Mise au point de bioessais sur sédiments adaptés à la modélisation des effets biologiques chez *Chironomus riparius*: validation de modèles mécanistiques d'effets toxiques, Mémoire de master en science, Université de Metz, 43 p.
- Ducrot V., Péry A.R.R., Mons R. & Garric J., 2004, Energy-based modeling as a basis for the analysis of reproductive data with the midge *Chironomus riparius*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23**, 225-231.
- Ducrot V., Usseglio-Polatera P., Péry A.R.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.
- Ducrot V., Cognat C., Mons R., Mouthon J. and Garric J., 2005, Development of rearing and testing protocols for a new freshwater sediment test species: the gastropod *Valvata (Cincinna) piscinalis*, *Chemosphere*, sous presse.
- Dumnicka E. & Kasprzak K., 1979, Variability in certain anatomical and morphological characters in Oligochaeta, *Bulletin de l'académie polonaise des sciences*, **27**, 363-368.
- Egeler P., Römbke J., Meller M., Knacker T. & Nagel R., 1999, Bioaccumulation test with Tubificid sludgeworms in artificial media: development of a standardisable method, *Hydrobiologia*, **406**, 271-280.

Environment Canada, 1997, *Biological test method. Test for growth and survival in sediment using larvae of freshwater midges (Chironomus tentans or Chironomus riparius)*, Environment Canada (Ed.), 133 p.

European Chemicals Bureau, 2003, Effects Assessment, in *Technical guidance document on risk assessment Part II: Environmental risk assessment*, European commission joint research center, 93-133.

Escher B.I. & Hermens J.L.M., 2002, Modes of action in ecotoxicology: their role in body burdens, species sensitivity, QSARs, and mixture effects, *Environmental Science and Technology*, **36**, 4201-4217.

Falniowski A., Economou-Amilli A. & Anagnostidis K., 1988, *Valvata (Cincinna) piscinalis* OF Müller (*Mollusca, Prosobranchia*) and its epizoic Diatoms from Lake trichonis, Greece, *International Review of Hydrobiology*, **73**, 327-335.

Faria A.M.S., Noguiera A.J.A. & Soares A.M.V.M., 2002, The use of survival, growth and feeding rates tests with *Chironomus riparius* larvae to assess water quality, Communication affichée, 12th Annual Meeting of SETAC-Europe, Madrid.

Fargasova A., 2001, Winter third-to fourth-instar larvae of *Chironomus plumosus* as bioassay tools for assessment of acute toxicity of metals and their binary combinations, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **48**, 1-5.

Ferard J.F. & Ferrari B. , 2005, Wastoxhas : A bioanalytical strategy for solid wastes assessment, in *Small-scale Freshwater Toxicity Investigations*, vol.2, chap.12, Blaise C. & Féraud J.F.(Eds.), Kluwer Academic Publishers (à paraître).

Flammarion P. & Péry A.R.R., 2004, Apports de la modélisation des effets des toxiques sur l'individu et la population en écotoxicologie aquatique, *Revue des sciences de l'eau*, **17**, 489-502.

Forbes V.E. & Calow P., 1999, Is the per capita rate of increase a good measure of population-level effects in ecotoxicology ?, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **18**, 1544-1556.

Forbes V.E., Calow P. & Sibly R.M., 2001, Are current species extrapolation models a good basis for ecological risk assessment ?, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **20**, 442-447.

Frainay V., 1996, Impact d'un changement taxonomique ou fonctionnel pour la bioévaluation des communautés de macroinvertébrés benthiques, Mémoire de diplôme d'études approfondies en sciences, Université Lyon 1, 43 p.

Franquet E., 1999, Chironomid assemblage of a Lower Rhone dike field: relationships between substratum and biodiversity, *Hydrobiologia*, **397**, 121-131

Frayse B., Mons R. & Garric J., 2005, Development of a zebrafish 4-days embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, sous presse.

Fretter V. & Graham A., 1978, The Prosobranch molluscs of Britain and Denmark Part 3: *Neritacea, Viviparacea, Valvatacea*, terrestrial and freshwater *Littorinacea* and *Rissoacea*, *The Journal of Molluscan Studies*, **5**, 111-115.

Friberg N. & Jacobsen D., 1999, Variation in growth of the detritivore-shredder *Sericostoma personatum* (Trichoptera), *Freshwater Biology*, **42**, 625-635.

- Friberg N., Larsen A.D., Rodkjaer A. & Thomsen A.G., 2002, Shredder guilds in three Danish forest streams contrasting in forest type, *Archiv Fur Hydrobiologie*, **153**, 197-215.
- Fukuhara H., Kikuchi E. & Kurihara Y., 1980, The effect of *Branchiura sowerbyi* (*Tubificidae*) on bacterial populations in submerged ricefield soil, *Oikos*, **34**, 88-93.
- Garric J., 2002, Status report on aquatic micropollution in french inland waters, *Revue Medicale Veterinaire*, **153**, 337-344.
- Gerino M., Stora G., François-Carcaillet F., Gilbert F., Poggiale J.-C., Mermillod-Blondin F., Desrosiers G. & Vervier P., 2003, Macro-invertebrate functional groups in freshwater and marine sediments: a common mechanistic classification, *Vie et Milieu*, **53**, 221-231.
- Giesy J.P. & Hoke R.A., 1989, Freshwater sediment toxicity bioassessment: rationale for species selection and test design, *Journal of Great Lakes Research*, **15**, 539-569.
- Gillis P.L., Diener L.C., Reynoldson T.B. & Dixon D.G., 2002, Cadmium-induced production of a metallothioneinlike protein in *Tubifex tubifex* (*Oligochaeta*) and *Chironomus riparius* (*Diptera*): correlation with reproduction and growth, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **21**, 1836-1844.
- Gimbert F., De Vaufleury A., Douay F., Coeurdassier M., Scheifler R. & Badot P.M., 2005, Kinetics of cadmium transfer from soil to snail depending on soil characteristics and exposure concentration, Communication affichée, 15th annual meeting of SETAC-Europe, Lille, France.
- Goddeeris B.R., Vermeulen A.C., De Geest E., Jacobs H., Baert B. & Ollevier F., 2001, Diapause induction in the third and fourth instar of *Chironomus riparius* (*Diptera*) from belgian lowland brooks, *Archiv für Hydrobiologie*, **150**, 307-327.
- Granberg M. & Forbes T.L., 2005, Role of sediment organic matter and feeding history in dietary absorption and bioaccumulation of pyrene in a mud snail, Communication orale MO1-2/2, 15th annual meeting of SETAC-Europe, Lille, France.
- Grime J.P., 1979, *Plant strategies and vegetation processes*, Wiley (Ed.), Chichester, 352 p.
- Groenendijk D., Kraak M.H.S. & Admiraal W., 1999, Efficient shedding of accumulated metals during metamorphosis in metal-adapted populations of the midge *Chironomus riparius*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **18**, 1225-1231.
- Gurney W.S.C. & Middleton D.A.J., 1996, Individual energetics and the equilibrium demography of structured populations, *Theoretical Population Biology*, **49**, 344-368.
- Halpern M., Gasith A. & Broza M., 2002, Does the tube of a benthic chironomid larva play a role in protecting its dweller against chemical toxicants?, *Hydrobiologia*, **470**, 49-55.
- Hansen D.J., Berry W.J., Mahony J.D., Boothman W.S., Di Toro D.M., Robson D.L., Ankley G.T., Ma D., Yan Q. & Pesch C.E., 1996, Predicting the toxicity of metal-contaminated field sediments using interstitial concentration of metals and acid-volatile sulfide normalizations, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **15**, 2080-2094.
- Hassler C.S., Behra R. & Wilkinson K.J., 2005, Impact of zinc acclimation on bioaccumulation and homeostasis in *Chlorella kesslerii*, *Aquatic toxicology*, **74**, 139-149.
- Hare L., 1992, Aquatic insects and trace metals: bioavailability, bioaccumulation, and toxicity, *Critical Reviews in Toxicology*, **22**, 327-369.

Harkey G.A., Landrum P.F. & Klaine S.J., 1994, Comparison of whole-sediment, elutriate and pore-water exposures for use in assessing sediment-associated organic contaminants in bioassays, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **13**, 1315-1329.

Harrahy E.A. & Clements W.H., 1997, Toxicity and bioaccumulation of a mixture of heavy metals in *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae) in synthetic sediment, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **16**, 317-327.

Heard W., 1963, Reproductive features of Valvata, *Nautilus*, **77**, 94-68.

Hellpell S.S., Caswell H. & Crowder L.B., 2000, Life histories and elasticity patterns: perturbation analysis for species with minimal demographic data, *Ecology*, **81**, 654-665.

Hermens J.L.M., 1989, Quantitative structure-activity relationships for environmental pollutants, in *Handbook of environmental chemistry*, Springer Verlag (Ed.), Berlin, 111-162.

Hoekstra J.A., Vaal M., Notenboom J. & Slooff W., 1994, Variation in the sensitivity of aquatic species to toxicants, *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, **53**, 98-105.

Honkoop P.J.C. & Beukema J.J., 1997, Loss of body mass in winter in three intertidal bivalve species: an experimental and observational study of the interacting effects between water temperature, feeding time and feeding behaviour, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **212**, 277-297.

Ibrahim H., Kheir R., Helmi S., Lewis J. & Crane M., 1998, Effects of organophosphorus, carbamate, pyrethroid and organochlorine pesticides, and a heavy metal on survival and cholinesterase activity of *Chironomus riparius* Meigen, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **60**, 448-455.

Illic 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 Internationaler Vereinungen Limnology*, **12**, 1-57.

Indeherberg M.B.M., Van Straalen N.M. & Schockaert E.R., 1999, Combining life-history and toxicokinetic parameters to interpret differences in sensitivity to cadmium between populations of *Polycelis tenuis* (Plathelminthes), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **44**, 1-11.

Ingersoll C.G., Ankley G.T., Benoit D.A., Brunson E.L., Burton G.A., Dwyer F.J., Hoke R.A., Landrum P.F., Norberg-King T.J. & Winger P.V., 1995, Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: a review of methods and applications, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **14**, 1885-1894.

Isnard P., Flammarion P., Roman G., Babut M., Bastien P., Bintein S., Esserméant L., Féraud J.F., Gallotti-Schmitt S., Saouter E., Saroli M., Thiébaud H., Tomassone R. & Vindimian E., 2001, Statistical analysis of regulatory ecotoxicology tests, *Chemosphere*, **45**, 659-669.

Jackson L.J., Trebitz A.S. & Cottingham K.L., 2000, An introduction to the practice of ecological modeling, *BioScience*, **50**, 694-706.

Jager T., Crommentuijn T., Van Gestel C.A.M. & Kooijman S.A.L.M., 2004, Simultaneous modeling of multiple endpoints in life-cycle toxicity tests, *Environmental Science and Technology*, **38**, 2894-2900.

Juget J. & Lafont M., 1994, Theoretical habitat templates, species traits, and species richness - Aquatic oligochaetes in the Upper Rhône River and its floodplain, *Freshwater Biology*, **31**, 539-554.

- Kammenga J.E., Busschers M., Van Straalen N.M., Jepson P.C. & Bakker J., 1996, Stress-induced fitness reduction is not determined by the most sensitive life-cycle trait, *Functional Ecology*, **10**, 106-111.
- Kammenga J.E. & Riksen J.A.G., 1996, Comparing differences in species sensitivity to toxicants: phenotypic plasticity *versus* concentration-response relationships, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **15**, 1649-1653.
- Kawaguti S., 1936, On the respiration of *Branchiura sowerbyi*, *Memoirs of the Faculty of Science and Agriculture - Taihoku Imperial University*, **14**, 91-115.
- Kazi-Aoual F., Hitier S., Sabatier R. & Lebreton J.D., 1995, Refined approximations to permutation tests for multivariate inference, *Computational statistics & data analysis*, **20**, 643-656.
- Kemble N.E., Brumbaugh W.G., Brunson E.L., Dwyer F.J., Ingersoll C.G., Monda D.P. & Woodward D.F., 1994, Toxicity of metal-contaminated sediments from the upper Clark Fork River, Montana, to aquatic invertebrates and fish in laboratory exposures, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **13**, 1985-1997.
- Kikuchi E. & Kurihara Y., 1977, *In vitro* studies on the effects of Tubificids on the biological, chemical and physical characteristics of submerged rice field soil and overlaying water, *Oikos*, **29**, 348-356.
- Kipranova E.A. & Boiko O.I., 1992, Sensitivity to barium ions and EDTA as a taxonomic maker for the genus *Pseudomonas*, *Microbiology*, **61**, 362-366.
- Koeman J.H., 1991, From comparative physiology to toxicological risk assessment, *Comparative Biochemistry and physiology*, **100**, 7-10.
- Koivisto S., Ketola M. & Walls M., 1992, Comparison of five cladoceran species in short and long term copper exposure, *Hydrobiologia*, **248**, 125-136.
- Kooijman S.A.L.M., 1993, *Dynamic energy and mass budgets in biological systems. Theory and applications in ecotoxicology*, Cambridge University Press, Cambridge, Royaume Uni, 359 p.
- Kooijman S.A.L.M. & Bedaux J.J.M., 1996, *The analysis of aquatic toxicity data*, VU University Press (Ed.), Amsterdam, 149 p.
- Kooijman S.A.L.M., 2000, *Dynamic energy and mass budgets in biological systems. Second Edition*, Cambridge University Press (Ed.), Cambridge, Royaume Uni, 424 p.
- Korthals G.W., Popovici I., Iliev I. & Lexmond T.M., 1998, Influence of perennial ryegrass on a copper and zinc affected terrestrial Nematode community, *Applied Soil Ecology*, **4**, 107-117.
- Kosmala A., Charvet S., Roger M.C. & Faessel B., 1999, Impact assessment of a wastewater treatment plant effluent using instream invertebrates and the *Ceriodaphnia dubia* chronic toxicity test, *Water Research*, **33**, 266-278.
- Kranzberg G. & Stokes P.M., 1989, Metal regulation, tolerance and body burdens in the larvae of the Genus *Chironomus*, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **46**, 389-398.
- Krantzberg G. & Sherman R.K., 1995, Severn sound sediment chemistry and bioassessment 1988-1990, *Water Quality Research Journal of Canada*, **30**, 635-671.

Lafont M., 1989, Contribution à la gestion des eaux continentales: utilisation des oligochètes comme descripteurs de l'état biologique et du degré de pollution des eaux et des sédiments, Thèse de doctorat en sciences, Université Lyon 1, 105 p.

Lam P.K.S., Yu K.N. & Chong M.W.K., 1997, Cadmium uptake and depuration in the soft tissues of *Brotia Hainanensis* (Gastropoda: *Prosobranchia: Thiaridae*): a dynamic model, *Chemosphere*, **35**, 2449-2461.

Landahl J.T., Johnson L.L., Stein J.E., Collier T.K. & Varanasi U., 1997, Approaches for determining effects of pollution on fish populations of Puget Sound, *Transactions of the American Fisheries Society*, **126**, 519-535.

Lande R., 1988, Demographic models of the northern spotted owl (*Strix occidentalis caurina*), *Oecologia*, **75**, 601-607.

Le Blanc G.A., 1984, Interspecies relationships in acute toxicity of chemicals to aquatic organisms, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **3**, 47-60.

Leppänen M. & Kukkonen J.V.K., 1998, Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): implications for sediment toxicity testing, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **17**, 2196-2202.

Leppänen M., Postma J.F., Groenendijk D., Kukkonen J.V.K. & Buckert-De-Jong M., 1998, Feeding activity of midge larvae (*Chironomus riparius* Meigen) in metal-polluted river sediments, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **41**, 251-257.

Leslie P.H., 1945, On the use of matrices in certain population dynamics, *Biometrika*, **33**, 184-212.

Leslie P.H., 1948, Some further notes on the use of matrices in population mathematics, *Biometrika*, **35**, 213-245.

Levin L.A., Caswell H., Bridges T.S., DiBacco C., Cabrera D. & Plaia G., 1996, Demographic response of estuarine polychaetes to pollutants: life table response experiments, *Ecological Applications*, **6**, 1295-1313.

Liber K., Call D.J., Dawson T.D., Whiteman F.W. & Dillon T.M., 1996, Effects of *Chironomus tentans* larval growth retardation on adult emergence and ovipositing success: implications for interpreting freshwater sediment bioassays, *Hydrobiologia*, **323**, 155-167.

Lika K. & Nisbet R.M., 2000, A dynamic energy budget model based on partitioning of net production, *Journal of Mathematical Biology*, **41**, 361-386.

Lin B.L., Tokai A. & Nakanishi J., 2005, Approaches for establishing predicted-no-effect concentrations for population-level ecological risk assessment in the context of chemical substances management, *Environmental Science and Technology*, **39**, 4833-4840.

Long E.R. & Morgan L.G., 1990, *Potential for biological effects of sediment-sorbed contaminants tested in the national status and trends program*, National Oceanic and Atmospheric Administration (Ed.), 232 p.

Lotka A.J., 1939, A contribution to the theory of self renewing aggregates, with special reference to industrial replacement, *Annals of Mathematical Statistics*, **10**, 1-25.

Luoma S.N. & Rainbow P., 2005, Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept, *Environmental Science and Technology*, **39**, 1921-1931.

Lydy M.J., Lohner T.W. & Fisher S.W., 1990, Influence of pH, temperature and sediment type on the toxicity, accumulation and degradation of parathion in aquatic systems, *Aquatic Toxicology*, **17**, 27-44.

MacDonald D.D., Ingersoll C.G. & Berger T.A., 2000, Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **39**, 20-31.

Maltby L. & Naylor C., P. C., 1990a, Effect of stress on a freshwater benthic detritivore: scope for growth in *Gammarus pulex*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **19**, 285-291.

Maltby L. & Naylor C., P. C., 1990b, Field deployment of a scope for growth assay involving *Gammarus pulex*, a freshwater benthic invertebrate, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **19**, 292-300.

Marchese M.R. & Brinkhurst R.O., 1996, A comparison of two tubificid oligochaete species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions, *Hydrobiologia*, **334**, 163-168.

Mark U. & Solbe J., 1998, Analysis of the Ecetoc Aquatic Toxicity (EAT) database: the relevance of *Daphnia magna* as a representative test species, *Chemosphere*, **36**, 155-166.

Markich S.J. & Jeffree R.A., 1994, Absorption of divalent trace metals as analogues of calcium by australian freshwater bivalves: an explanation of how water hardness reduces metal toxicity, *Aquatic Toxicology*, **29**, 257-290.

Marmonier P., Bodergat A.M. & Doledec S., 1994, Theoretical habitat templates, species traits, and species richness: Ostracods (*Crustacea*) in the Upper Rhône River and its floodplain, *Freshwater Biology*, **31**, 539-554.

Martinez E.A., Moore B.C., Schaumlöffel J. & Dasgupta N., 2001, Induction of morphological deformities in *Chironomus tentans* exposed to zinc- and lead-spiked sediments, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **20**, 2475-2481.

Masala O. & O'Brien P., 2002, Influence of zinc on the formation of granules of calcium pyrophosphate, *Materials Research Society Symposium - Proceedings*, **711**, 307-312.

Masala O., McInnes E.J.L. & O'Brien P., 2002, Modelling the formation of granules: the influence of manganese ions on calcium pyrophosphate precipitates, *Inorganica Chimica Acta*, **339**, 366-372.

Masnado R.G., Geis S.W. & Sonzogni W.C., 1995, Comparative acute toxicity of a synthetic mine effluent to *Ceriodaphnia dubia*, larval fathed minnow and the freshwater mussel *Anodonta imbecilis*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **14**, 1913-1920.

Matisoff G., Wang X.S. & McCall P.L., 1999, Biological redistribution of lake sediments by tubificid oligochaetes: *Branchiura sowerbyi* and *Limnodrilus hoffmeisteri*, *Journal of Great Lakes Research*, **25**, 205-219.

Mc Pherson C. & Chapman P.M., 2000, Copper effects on potential sediment test organisms: the importance of appropriate sensitivity, *Marine Pollution Bulletin*, **40**, 656-665.

Menta C. & Parasi V., 2001, Metal concentrations in *Helix pomatia*, *Helix aspersa* and *Arion rufus*: a comparative study, *Environnemental Pollution*, **115**, 205-208.

- Miller M.P. & Hendricks A.C., 1996, Zinc resistance in *Chironomus riparius*: Evidence for physiological and genetic components, *Journal of the North American Benthological Society*, **15**, 106-116.
- Ministère de l'environnement du Québec, 1992, *Interim criteria for quality assessment of St Lawrence River sediment*, Environnement Canada, Ottawa
- Moe S.J., 2003, Density dependence in population level ecological risk assessment, *SETAC Pellston workshop on population level ecological risk assessment, Roskilde, Danemark*.
- Mooij W.M., Hülsmann S., Vijverberg J., Veen A. & Lammens E.H.R.R., 2002, Modelling *Daphnia* population dynamics and demography under natural conditions, *Hydrobiologia*, **491**, 19-34.
- Moore D.R.J. & Caux P.Y., 1997, Estimating low toxic effects, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **16**, 794-801.
- Mouthon J., 1982, *Les mollusques dulçaquicoles: Données biologiques et écologiques; Clés de détermination des principaux genres de Bivalves et de Gastéropodes de France*, Conseil Supérieur de la Pêche (Ed.), Paris, 27 p.
- Mouthon J. & Dubois J.P., 2001, Les peuplements de mollusques de la zone littorale du lac d'Annecy (Savoie, France), *Annales de Limnologie*, **37**, 267-276.
- Mordukhai-Botovskoi D., 1979, *The river Volga and its life*, Dr W. Junk Publishers (Ed.), The Hague-Boston-London, 213 p
- Munns W.R., Black D.E., Gleason T.R., Salomon K., Bengtson D. & Gutjahr-Gobell R., 1997, Evaluation of the effects of dioxin and PCBs on *Fundulus heteroclitus* populations using a modeling approach, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **16**, 1074-1081.
- Murdoch M.H., Chapman P.M., Norman D.M. & Quintino V.M., 1997, Spiking sediment with organochlorines for toxicity testing, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **16**, 1504-1509.
- Naitoh T. & Takabatake I., 1995, Observations on the tail movements and the contractions of the dorsal blood vessel and intestine in an anomalously double-tailed worm of *Oligochaeta*, *Branchiura sowerbyi* Beddard. A case report with implications for physiological mechanisms of contractility, *Memoirs of the faculty of science Shimane University*, **29**, 45-50.
- National Research Council of Canada, 1994, Tort- 2: Lobster hepatopancreas reference material for trace metals, in *Certified reference material NRC.*, NRC (Ed), Ottawa, Canada.
- Naylor C. & Howcroft J., 1997, Sediment bioassays with *Chironomus riparius*: understanding the influence of experimental design on test sensitivity, *Chemosphere*, **35**, 1831-1845.
- Nebeker A.V., Cairns M.A. & Wise C.M., 1984, Relative sensitivity of *Chironomus tentans* life stages to copper, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **3**, 151-158.
- Nisbet R.M., Ross A.H. & Brooks A.J., 1996, Empirically-based dynamic energy budget models: theory and an application to ecotoxicology, *Nonlinear World*, **3**, 85-106.
- Nisbet R.M., Gurney W.S.C., Murdoch W.W. & Mc Cauley E., 1989, Structured population models: a tool for linking effects at individual and population level, *Biological Journal of the Linnean Society*, **37**, 79-99.

Noonburg E.G., Nisbet R.M., Mc Cauley E., Gurney W.S.C., Murdoch W.W. & De Roos A.M., 1998, Experimental testing of dynamic energy budget models, *Functional Ecology*, **12**, 211-222.

Nordberg M., 1998, Metallothioneins: historical review and state of knowledge, *Talanta*, **46**, 243-253.

Northcott G.L. & Jones K.C., 2000, Spiking hydrophobic organic compounds into soil and sediment: a review and critique of adopted procedures, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **19**, 2418-2430.

Oli M.K., 2003a, Partial life-cycle analysis: a simplified model for post-breeding census data, *Ecological Modelling*, **168**, 101-108.

Oli M.K., 2003b, Partial life-cycle models: how good are they?, *Ecological Modelling*, **169**, 313-325.

Organisation de Coopération et Développement Economique .2000, *Sediment-water Chironomid toxicity test using spiked sediment*, OECD (Ed.), 23.p

Oughton J., 1938, *Valvata (Cincinna) piscinalis* (Müller) in the Great Lakes, *Nautilus*, **52**, 60-62.

Pack S., 1993, A review of statistical data analysis and experimental design in OECD aquatic toxicology Test Guidelines, OECD, 42.p

Parkerton T.F. & Konkel W.J., 2000, Application of quantitative structure-activity relationships for assessing the aquatic toxicity of phthalate esters, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **45**, 61-78.

Persaud D., Jaagumaji R. & Hayton A., 1992, *Guidelines for the protection and management of aquatic sediment quality in Ontario*, Ontario Ministry of the Environment, Water Resources Branch (Ed.), Toronto, Canada, 23p.

Péry A.R.R., 2003, Modélisation des effets toxiques sur le chironome *Chironomus riparius*, de l'individu à la population, Thèse de doctorat en sciences, Université Lyon 1, 120 p.

Péry ARR, Mons R & Garric, J., 2004c, Energy-based modeling to study population growth rate and production for the midge *Chironomus riparius* in ecotoxicological risk assessment, *Ecotoxicology*, **13**, 647-656.

Péry A.R.R., Babut M., Mons R. & Garric J., 2005, Deriving effects on *Chironomus* population carrying capacity from standard toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chemistry*, (sous presse).

Péry A.R.R., Ducrot V., Mons R. & Garric J., 2003a, Modelling toxicity and mode of action of chemicals to analyse growth and emergence tests with the midge *Chironomus riparius*, *Aquatic Toxicology*, **65**, 281-292.

Péry A.R.R., Ducrot V., Mons R., Miège C., Gahou J., Gorini D. & Garric J., 2003b, Survival tests with *Chironomus riparius* exposed to spiked sediments can profit from DEBtox model, *Water Research*, **37**, 2691-2699.

Péry A.R.R., Mons R., Ducrot V. & Garric J., 2004a, Effects of methiocarb on *Chironomus riparius* survival and growth with and without tube-building, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **72**, 358-364.

- Péry A.R.R., Mons R., Flammarion P., Lagadic L. & Garric J., 2002, A modeling approach to link food availability, growth, emergence, and reproduction for the midge *Chironomus riparius*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **21**, 2507-2513.
- Péry A.R.R., Sulmon V., Mons R., Flammarion P. & Lagadic L., 2004b, A model to understand the confounding effects of natural sediments in toxicity tests with *Chironomus riparius*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **22**, 2476-2481.
- Pouvreau S., Bacher C. & Heral M., 2000, Ecophysiological model of growth and reproduction of the black pearl oyster, *Pinctada margaritifera*: potential applications for pearl farming in French Polynesia, *Aquaculture*, **186**, 117-144.
- Poddubnaya T.L., 1980, Life cycles of mass species of Tubificidae, in *Aquatic Oligochaete Biology*, R.O. Brinkhurst & D.G. Cook (Eds), Plenum press, New York, 175-184.
- Pynnönen K., Holwerda D.A. & Zandee D.I., 1987, Occurrence of calcium concretions in various tissues of freshwater mussels, and their capacity for cadmium sequestration, *Aquatic Toxicology*, **10**, 101-114.
- Raburu P., Mavuti K.M., Harper D.M. & Clark F.L., 2002, Population structure and secondary productivity of *Limnodrilus hoffmeisteri* (Claparede) and *Branchiura sowerbyi* (Beddard) in the profundal zone of Lake Naivasha, Kenya, *Hydrobiologia*, **488**, 153-161.
- Rainbow P., 2002, Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what ?, *Environmental Pollution*, **120**, 497-507.
- Rasmussen J.B., 1984, The life-history, distribution, and production of *Chironomus riparius* and *Glyptotendipes paripes* in a prairie pond, *Hydrobiologia*, **119**, 65-72.
- Ren J.S. & Ross A.H., 2005, Environmental influence on mussel growth: a dynamic energy budget model and its application to the greenshell mussel *Perna canaliculus*, *Ecological Modelling*, sous presse.
- 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.
- Reynolds S.K. & Benke A.C., 2005, Temperature dependent growth rates of larval midges (Diptera: Chironomidae) from a southern U.S. stream, *Hydrobiologia*, **544**, 69-75.
- Richoux P., 1994, Theoretical habitat templates, species traits, and species richness - Aquatic coleoptera in the upper Rhône river and its floodplain, *Freshwater Biology*, **31**, 377-395.
- Rinke, K. & Vijverberg J., 2005, A model to evaluate the effect of temperature and food concentration on individual life history and population dynamics of *Daphnia*, *Ecological Modelling*, **186**, 326-344.
- Ristola T., Pellinen J., Ruokolainen M., Kostamo A. & Kukkonen J.V.K., 1999, Effect of sediment type, feeding level, and larval density on growth and development of a midge (*Chironomus riparius*), *Environmental Toxicology and Chemistry*, **18**, 756-764.
- Rittschof D., Sawardeker P. & Petry C., 2002, Chemical mediation of egg-capsule deposition by mud snails, *Journal of Chemical Ecology*, **28**, 2257-2269.

- Roesijadi G., 1992, Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals, *Aquatic Toxicology*, **22**, 81-114.
- Roex E.W.M., Keijzers R. & Van Gestel C.A.M., 2003, Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion, *Aquatic Toxicology*, **64**, 451-460.
- Roman G., 1996, Mise au point d'une méthodologie d'évaluation des concentrations sans effets des substances sur l'environnement aquatique, Thèse de doctorat en sciences, Université de Rouen, 354 p.
- Rubio M.R., Tineo P., Diaz J, Torreblanca A., 1993, Effects of cadmium exposure on the ultrastructure of hepatopancreatic cells of *Thais haemastoma* (Gastropoda, Prosobranchia), *Marine Environmental Research*, **35**, 47-51.
- Russel Hunter W., 1961, Life cycles of four freshwater snails in limited populations in Loch Mond, with a discussion of infraspecific variation, *Proceedings of the zoological society of London*, **137**, 135-170.
- Russev B.K., 1972., Influence of some ecological factors on changes of the standing crop of zoobenthos of the Danube in the Bulgarian stretch. In: Productivity problems of freshwater Warzawa Krakow. 1972. Proceeding of the IBP-UNESCO Symposim (Ed.), Sofia.
- Sanchez P. & Tarazona J.V., 2002, Development of a multispecies system for testing reproductive effects on aquatic invertebrates. Experience with *Daphnia magna*, *Chironomus prasinus* and *Lymnea peregra*, *Aquatic Toxicology*, **60**, 249-256.
- Seidman L.A., Bergtrom G., Gingrich D.J. & Remsen C.C., 1986, Accumulation of cadmium by the fourth instar larva of the fly *Chironomus thummi*, *Tissue Cell*, **18**, 407-412.
- Servia M.J., Cobo F. & Gonzalez M.A., 2000, Incidence and causes of deformities in recently hatched larvae of *Chironomus riparius* Meigen, 1804 (Diptera, Chironomidae), *Archiv für Hydrobiologie*, **149**, 387-401.
- Sherratt T.N., Roberts G., Williams P., Whitfield M., Biggs J., Shillabeer N. & Maund S.J., 1999, A life history approach to predicting the recovery of aquatic invertebrate populations after exposure to xenobiotic chemicals, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **18**, 2512-2518.
- Sibley P.K., Ankley G.T. & Benoit D.A., 2001, factors affecting reproduction and the importance of adult size on reproductive output of the midge chironomus tentans, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **20**, 1296-1303.
- Sibley P.K., Ankley G.T., Cotter A.M. & Leonard E.N., 1996, Predicting chronic toxicity of sediments spiked with zinc: an evaluation of the acid-volatile sulfide model using a life-cycle test with the midge *Chironomus tentans*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **15**, 2102-2112.
- Sibley P.K., Benoit D.A. & Ankley G.T., 1997, The significance of growth in *Chironomus tentans* sediment toxicity tests: relationship to reproduction and demographic endpoints, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **16**, 336-345.
- Sibly R.M., 1999, Population growth rate and carrying capacity should be the ecological endpoints, *Aspects of Applied Biology*, **53**, 261-262.
- Sibly R.M., Hansen D.J. & Forbes V., 2000, Confidence intervals for population growth rate of organisms with two-stages life histories, *Oikos*, **88**, 335-340.

- Simkiss K. & Taylor M.G., 1995, Transport of metals across membranes, in *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*, Teissier & Turner (Eds), Oxford, UK, 1-44.
- Simpson S.L., Angel B.M. & Jolley D.F., 2004, Metal equilibration in laboratory-contaminated (spiked) sediments used for the development of whole-sediment toxicity tests, *Chemosphere*, **54**, 597-609.
- Slooff W., 1983b, Benthic macroinvertebrates and water quality assessment: some toxicological considerations, *Aquatic Toxicology*, **4**, 73-82.
- Slooff W., Canton J.H. & Hermens J.L.M., 1983a, Comparison of the susceptibility of 22 freshwater species to 15 chemical compounds. I. (sub)acute toxicity tests, *Aquatic Toxicology*, **4**, 113-128.
- Slooff W., Van Oers J.A.M. & De Zwart D., 1986, Margins of uncertainty in ecotoxicological hazard assessment, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **5**, 841-852.
- Slynko Y.V., Korneva L.G., River I.K., Papchenkov V.G., Scherbina G.H., Orlova M.I. & Therriault T.W. 2002. The Caspian-Volga-Baltic invasion corridor. In: Invasive aquatic species of Europe. Distribution, impacts and management, Leppakoski & Olenin (Eds), Kluwer Academic press, Dordrecht-Boston-London, 399-411.
- Sokal R.R. & Michener C.D., 1958, A statistical method for evaluating systematic relationships, *University of Kansas Science Bulletin*, **38**, 1409-1438.
- Sokolowski A., Richard P., Fichet D., Radenac G. & Guyot T., 2003, Application of trichloroacetic acid (TCA) to extraction of the soft body for the determination of tissue Cd, Cu, Pb, and Zn in the Prosobranch *Hydrobia ulvae* (Pennant), *Marine Pollution Bulletin*, **46**, 1326-1333.
- Southwood T.R.E., 1977, Habitat, the templet for ecological strategies?, *Journal of Animal Ecology*, **46**, 337-365.
- Southwood T.R.E., 1988, Tactics, strategies and templets, *Oikos*, **52**, 3-18.
- Sporka F. & Nagy S. 1998. The macrozoobenthos of parapotamon-type side arms of the Danube river in Slovakia and its response to flowing conditions, *Biologia*, **53**, 633-643.
- Spromberg J.A. & Birge J., 2005, Modeling the effects of chronic toxicity on fish populations: the influence of life history strategies, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **24**, 1532-1540.
- Statzner B., Hoppenhaus K., Arens M.F. & Richoux P., 1997, Reproductive traits, habitat use and templet theory: a synthesis of world-wide data on aquatic insects, *Freshwater Biology*, **38**, 109-135.
- Stephan C.E. & Rogers J.W., 1985, Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests, in *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891*, R.C. Balmer and D.J. Hansen (Eds), American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 328-338.
- Stuijzand S.C., Jonker M.J., Van Ammelrooy E. & Admiraal W., 1999, Species-specific responses to metals in organically enriched river water, with emphasis on effects of humic acids, *Environmental Pollution*, **106**, 115-121.
- Stuijzand S.C., Poort L., Greve G.D., Van Der Geest H.G. & Kraak M.H.S., 2000, Variables determining the impact of diazinon on aquatic insects: taxon, developmental stage, and exposure time, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **19**, 582-587.

Sturmbauer C, Opadiya GB, Niederstatter H & Riedmann A, R D., 1999, Mitochondrial DNA reveals cryptic oligochaete species differing in cadmium resistance, *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 967-974.

Sverdrup L.E., Krogh P.H., Nielsen T. & Stenersen J., 2002, Relative sensitivity of three terrestrial invertebrate tests to polycyclic aromatic compounds, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **21**, 1927-1933.

Tachet H., Richoux P., Bournaud M. & Usseglio-Polatera P., 2000, *Invertébrés d'eau douce - Systématique, biologie, écologie*, CNRS éditions (Ed.), Paris, 588 pp

Tachet H., Usseglio-Polatera P. & Roux C., 1994, Theoretical habitat templets, species traits, and species richness: Trichoptera in the upper Rhône river and its floodplain, *Freshwater Biology*, **31**, 539-554.

Tarasov A.G., 1998., Antropogenic impact on the bottom macroinvertebrates in the delta region of the Volga River, *Okeanologiya*, **38**, 719-726.

Taylor E.J., Maund S.J. & Pascoe D., 1991, Toxicity of four common pollutants to the freshwater macroinvertebrates *Chironomus riparius* Meigen (Insecta: Diptera) and *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda), *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **21**, 371-376.

Thurston R.V., Gilfoil T.A., Meyn E.L., Zajdel R.K., Aoki T.I. & Veith G.D., 1985, Comparative toxicity of ten organic chemicals to ten common aquatic species, *Water Research*, **19**, 1145-1155.

Timm T., 1980, Distribution of aquatic Oligochaetes, in *Aquatic Oligochaete Biology*, R.O. Brinkhurst & D.G. Cook (Eds), Plenum press, New York, 55-77.

Timmermans K.R., Peeters W. & Tonkes M., 1992, Cadmium, zinc, lead and copper in *Chironomus riparius* (Meigen) larvae (Diptera, Chironomidae): uptake and effects, *Hydrobiologia*, **241**, 119-134.

Townsend B.E., Lawrence J.R. & Flannagan J.F., 1981, *Chironomus tentans* (Fabricius) introduction, in *Manual for the culture of selected freshwater invertebrates*, Lawrence S.G. (Ed.), Canada, 110-126.

Townsend C.R., Doledec S. & Scarsbrook M.R., 1997, Species traits in relation to temporal and spatial heterogeneity in streams: a test of habitat templet theory, *Freshwater Biology*, **37**, 367-387.

Townsend C.R. & Hildrew A.G., 1994, Species traits in relation to a habitat templet for river systems, *Freshwater Biology*, **31**, 265-275.

Tremolada P., Finizio A., Villa S., Gaggi C. & Vighi M., 2004, Quantitative inter-specific chemical activity relationships of pesticides in the aquatic environment, *Aquatic Toxicology*, **67**, 87-103.

Tsikhon-Lukanina E., 1961a, On the problem of the filtration feeding method of *Bythinia tentaculata* L. and *Valvata (Cincinna) piscinalis* Müller, *Byulleten Instituta Biologii Vodokhranil*, **10**, 28-30.

Tsikhon-Lukanina E., 1961b, The dependence of feeding and filtration rates in some freshwater gastropod molluscs on the concentration of food particles in the environment, *Byulleten Instituta Biologii Vodokhranil*, **10**, 31-34.

US EPA.1994, *Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates*, U.S. Environment Protection Agency (Ed), 133 p

US EPA, 1996, Calculation and evaluation of sediment effect concentrations for the amphipod *Hyalella azteca* and the midge *Chironomus riparius*, US EPA 905-R96-008, Great Lakes National Office Program, Region V, Chicago, 144 p.

US EPA, 2002, Aquatic toxicity information retrieval. Dernière remise à jour: 17/10/2000.www.epa.gov/ecotox/.

US EPA/USACE,1998, *Evaluation of Dredged Material Proposed for Discharge in Waters of the U.S. - Testing Manual*, EPA/USACE (Eds), 176 p.

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., 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. & Tachet H., 1994, Theoretical habitat templates, species traits, and species richness - Plecoptera and Ephemeroptera in the Upper Rhône River and its floodplain, *Freshwater Biology*, 31, 357-375.

Usseglio-Polatera P., Bournaud M., Richoux P. & Tachet H., 2000a, Biological and ecological traits of benthic freshwater macroinvertebrates: relationships and definition of groups with similar traits, *Freshwater Biology*, 43, 175-205.

Usseglio-Polatera P., Bournaud M., Richoux P. & Tachet H., 2000b, Biomonitoring through biological traits of benthic macroinvertebrates: how to use species trait databases?, *Hydrobiologia*, 422/423, 153-162.

Vaal M., Van der Wal J.T., Hoekstra J. & Hermens J., 1997a, Variation in the sensitivity of aquatic species in relation to the classification of environmental pollutants, *Chemosphere*, 35, 1311-1327.

Vaal M., Van der Wal J.T., Hermens J. & Hoekstra J., 1997b, Pattern analysis of the variation in the sensitivity of aquatic species to toxicants, *Chemosphere*, 35, 1291-1309.

Vaal M., Van Leeuwen C.J. & Hoekstra J.A., 2000, Variation in sensitivity of aquatic species to toxicant: practical consequences for effect assessment of chemical substances, *Environmental Management*, 25, 415-423.

Van den Berg M.S., Coops H., Noordhuis R., Van Schie J. & Simons J., 1997, Macroinvertebrate communities in relation to submerged vegetation in two *Chara*-dominated lakes, *Hydrobiologia*, 342/343, 143-150.

Van den Brinck F.W.B., Beljaards M.J., Botts N.C.A. & Van der Velde G., 1994, Macrozoobenthos abundance and community composition in three lower Rhine floodplain lakes with varying inundation regimes, *Regulated Rivers Research and Management*, 9, 279-293.

Van den Brink P.J., Maltby L., Pieters B.J., Blake N. & Brock T.C.M., 2005, Addressing interspecific variation in sensitivity and the potential to reduce this source of uncertainty in ecotoxicological assessments, Communication affichée, 15th annual meeting of SETAC-Europe, Lille, France,

Van den Brink F., Van der Velde G. & Cazemier W.G., 1990, The faunistic composition of the freshwater section of the river Rhine in the Netherland: present state and changes since 1900, *Limnologie aktuell*, **1**, 191-216.

Van Ewijk P.H. & Hoekstra J.A., 1993, Calculation of the EC₅₀ and its confidence interval when subtoxic stimulus is present, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **25**, 25-32.

Van Leeuwen C.J. & Van Der Zandt T.J., 1992, Application of QSARs, extrapolation and equilibrium partitioning in aquatic effects assessment. I. Narcotic industrial pollutants, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **11**, 267-282.

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.

Van Wijngaarden R.P.A., Crum S.J.M., Decraene K., Hattink J. & Van Kammen A., 1998, Toxicity of derosal (active ingredient carbendazim) to aquatic invertebrates, *Chemosphere*, **37**, 673-683.

Vindimian E., 2000, Les modèles mécanistiques d'effet toxique en écotoxicologie, in *Modélisation en écotoxicologie*, Association ECRIN (Ed.), Paris, 123-131.

Vindimian E., 2002, Apports de la modélisation aux études écotoxicologiques, Communication orale, *Séminaire sur les essais d'écotoxicité et de cancérogénéité des produits chimiques*, Université de Metz.

Von der Ohe P.C. & Liess M., 2003, Relative sensitivity distribution of aquatic invertebrates to organic and metal compounds, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23**, 150-156.

Wagner C. & Lokke H., 1991, Estimation of ecotoxicological protection levels from NOEC toxicity data, *Water Research*, **25**, 1237-1242.

Wagner R., 1990, A laboratory study on the life cycle of *Sericostoma personatum* (Kirby and Spence), and light-dark-dependent food consumption, *Hydrobiologia*, **208**, 201-212.

Wagner R., 1991, The influence of the diel activity pattern of the larvae of *Sericostoma personatum* (Kirby and Spence) (*Trichoptera*) on organic matter distribution in stream bed sediments: a laboratory study, *Hydrobiologia*, **224**, 65-70.

Wang X. & Matisoff G., 1997, Solute transport in sediments by a large freshwater Oligochaete: *Branchiura sowerbyi*, *Environmental Science & Technology*, **31**, 1926-1933.

Ward J., 1958, Hierarchical grouping to optimise on objective function, *Journal of the American Statistical Association*, **63**, 236-244.

Waringer J. & Graf W., 1997, *Atlas der Osterreichischen Köcherfliegenlarven*, Universitätsverlag (Ed.), Vienne, 286 pp.

Washington State Department of Ecology, 2002, Sediment Quality Chemical Criteria, Dernière remise à jour : 25/11/2002. www.ecy.wa.gov/programs/tcp/smu/sed_chem.htm.

Watts M.M. & Pascoe D., 1996, Use of the freshwater macroinvertebrate *Chironomus riparius* (*Diptera: Chironomidae*) in the assessment of sediment toxicity, *Water Science and Technology*, **34**, 101-107.

Weiner J.A., De Lorenzo M.E. & Fulton M.H., 2004, Relationship between uptake capacity and differential toxicity of the herbicide atrazine in selected microalgal species, *Aquatic Toxicology*, **68**, 121-128.

Wentzel R., McIntosh A., McCafferty W.P. & 1978, Emergence of the midge *Chironomus tentans* when exposed to heavy metal contaminated sediment, *Hydrobiologia*, **57**, 195-196.

Wentzel R., McIntosh A., McCafferty W.P., Atchinson G. & Anderson V., 1977, Avoidance response of midge larvae (*Chironomus tentans*) to sediments containing heavy metals, *Hydrobiologia*, **55**, 171-175.

Williams D.D. & Williams N.E., 1998, Aquatic insects in an estuarine environment: densities, distribution and salinity tolerance, *Freshwater Biology*, **39**, 411-421.

Wogram J. & Liess M., 2001, Rank ordering of macroinvertebrate species sensitivity to toxic compounds by comparison with that of *Daphnia magna*, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **67**, 360-367.

Wood R., Gaskell P., Ross S. & Maltby L., 2005, Using *in situ* bioassays to monitor the effects of highway runoff, Communication affichée, 15th Annual meeting of the SETAC-Europe, Lille, France.

Yamamura M., Suzuki K.T., Hatakeyama S. & Kubota K., 1983, Tolerance to cadmium and cadmium binding proteins induced in the midge larva *Chironomus yoshimatsui* (Diptera: Chironomidae), *Comparative biochemistry and physiology*, **75**, 21-27.

Yanling L., 1984, Annual production of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) in the Donghu Lake, Wuhan, China, *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, **2**, 102-108.

Young, 1975, The life cycles of six species of freshwater invertebrates molluscs in the Worcester-Birmingham canal, *Proceedings of the malacological society of London*, **41**, 533-548.

Zonnenveld C., 1992, Animal energy budgets: a dynamic approach, Thèse de doctorat en sciences, Université libre d'Amsterdam, 199 p.

Zoran M.J. & Drewes C.D., 1988, The rapid tail withdrawal reflex of the Tubificid worm *Branchiura sowerbyi*, *Journal of experimental Biology*, **137**, 487-500.

Zygmunt P.M.S. & Laskowski R., 2005, Maintenance costs in the grasshopper *Euthystira Brachyptera* originating from four sites in a gradient of heavy metal pollution, Communication affichée, 15th Annual Meeting of SETAC-Europe, Lille, France.

ANNEXES

ANNEXE 1. Composition taxonomique des groupes fonctionnels. Les taxa ont été classés sur la base de l'ordre hiérarchique correspondant au dendrogramme obtenu selon la méthode de Ward.

B = Bivalvia; Br = Branchiobdellida; C = Coleoptera; Cr = Crustacea; D = Diptera; E = Ephemeroptera; G = Gasteropoda; M = Megaloptera; N = Nematomorpha; O = Oligochaeta; Od = Odonata; P = Polychaeta; T = Trichoptera

No	Taxa	No	Taxa	No	Taxa
	Groupe 1	12	Uncinatis uncinata (O)	21	Radix (G)
1	Syrphidae (D)	13	Piguetiella blanci (O)	22	Gyraulus (G)
2	Scirtes (C)	14	other Lumbriculidae (O)	23	Valvata (G)
3	Cyphon (C)	15	Vejdovskyella (O)		Groupe 6
4	Ephydriidae (D)	16	Potamothenix moldaviensis(O)	1	Atrichops crassipes (D)
5	Microcara (C)	17	Paranais (O)	2	Beraemya squamosa (T)
6	Leptoconopinae (D)	18	Ophidonais serpentina (O)	3	Setodes (T)
7	Noterus (C)	19	Slavina appendiculata (O)	4	Athripsodes (T)
	Groupe 2	20	Specaria josinae (O)	5	Hydatophylax (T)
1	Conchostraca (Cr)	21	Amphichaeta (O)	6	Hexatomini (D)
2	Lepidurus apus (Cr)	22	Macromia splendens (Od)	7	Anabolia (T)
3	Triops cancriformis (Cr)	23	Oxygastra curtisii (Od)	8	Notidobia (T)
4	Corbicula (B)	24	Paragomphus genei (Od)	9	Sialis (M)
5	other Tubificidae (SSC1)	25	Dorydrius (O)	10	Molannodes tinctus (T)
6	other Tubificidae (ASC2)	26	Onychogomphus (Od)	11	Habrophlebia (E)
7	Branchiura sowerbyi (O)	27	Gomphus (Od)	12	Oulimnius (C)
	Groupe 3	28	Haplotaxis gordioides (O)	13	Esolus (C)
1	Pisidium (B)		Groupe 5	14	Schizopelex furcifera (T)
2	Musculium (B)	1	Tanytarsini (D)	15	Oecismus monedula (T)
3	Sphaerium (B)	2	Orthocladinae s. lato (D)	16	Sericostoma (T)
4	Hypania (P)	3	Eriopterini (D)	17	Halesus (T)
5	Corophium (Cr)	4	Beraeodes minutus (T)	18	Habroleptoides (E)
6	Chironomini (D)	5	other Limnephilini (T)	19	Tipulidae (D)
7	Ptychopteridae (D)	6	Pyrrhosoma nymphula (Od)	20	Cordulia aenea (Od)
8	Molanna (T)	7	Physa fontinalis (G)	21	Libellula (Od)
9	Potamopyrgus jenkinsi (G)	8	Lymnaea stagnalis (G)	22	Epitheca bimaculata (Od)
	Groupe 4	9	Planorbis (G)	23	Niphargidae (Cr)
1	Sparganophilus tamesis (O)	10	Stagnicola (G)	24	Eriocheir sinensis (Cr)
2	Dendrobaena subrubicunda (O)	11	Segmentina nitida (G)	25	Argulus (Cr)
3	Eiseniella tetraedra (O)	12	Psychodidae (D)	26	Caenis (E)
4	Enchytraeidae (O)	13	Forcipomyinae (D)	27	Ceratopogoninae (D)
5	Brachycercus harrisella (E)	14	Hippetis complanata (G)	28	Bithynia (G)
6	Ephoron virgo (E)	15	Oecetis (T)	29	Choroterpes picteti (E)
7	Pseudanodonta complanata (B)	16	Trienodes (T)	30	Potamanthus luteus (E)
8	Anodonta (B)	17	Mystacides (T)	31	Ephemera (E)
9	Unio (B)	18	Ceraclea/Homilia (T)	32	Orconectes limosus (Cr)
10	Nais (O)	19	Macroplea appendiculata (C)	33	Astacus astacus (Cr)
11	Dero + Aulophorus (O)	20	Dasyheleinae (D)	34	Branchiobdella (Br)
				35	Mermithidae (N)

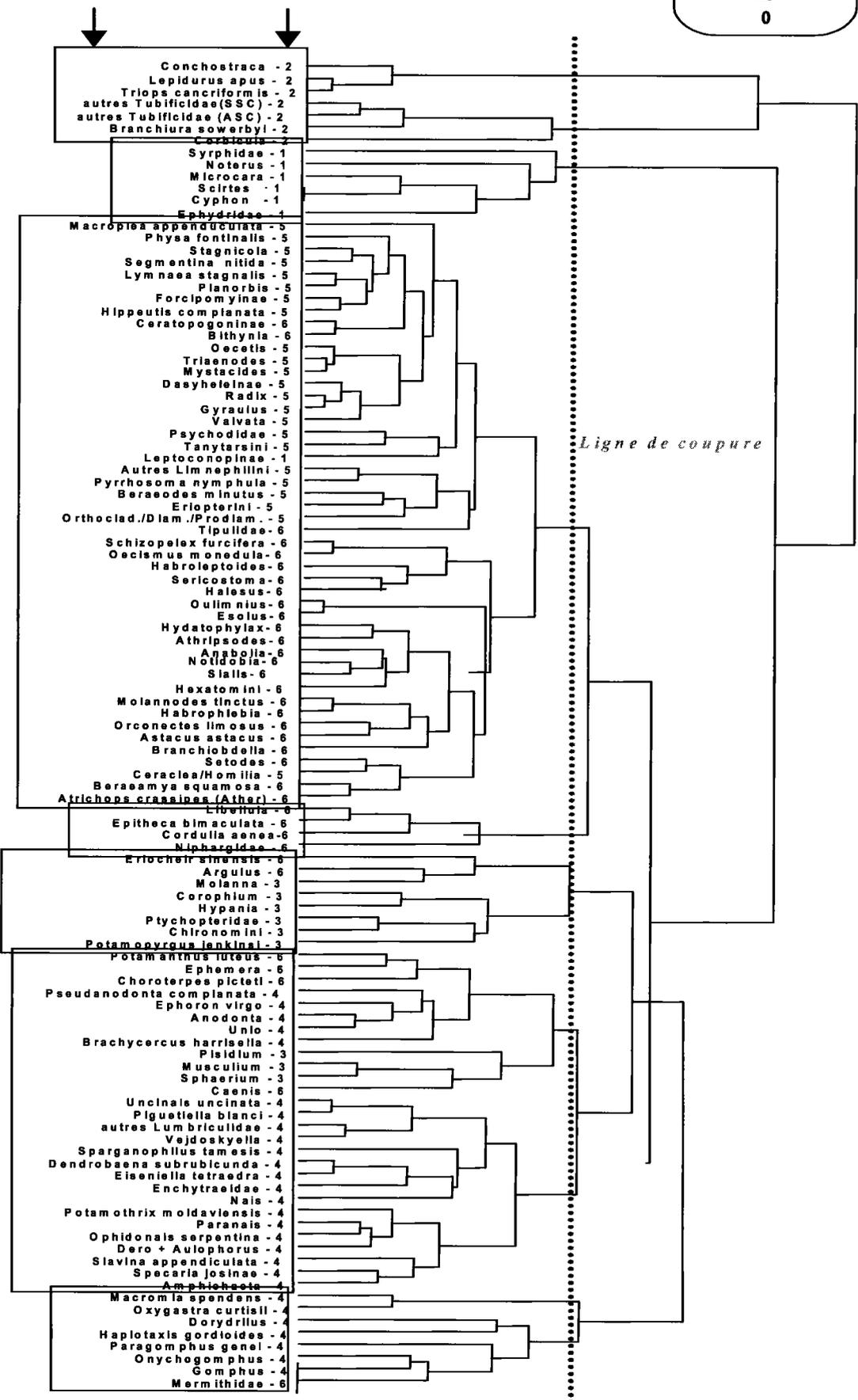
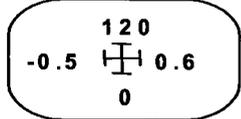
¹ Avec soies capillaires

² Sans soies capillaires

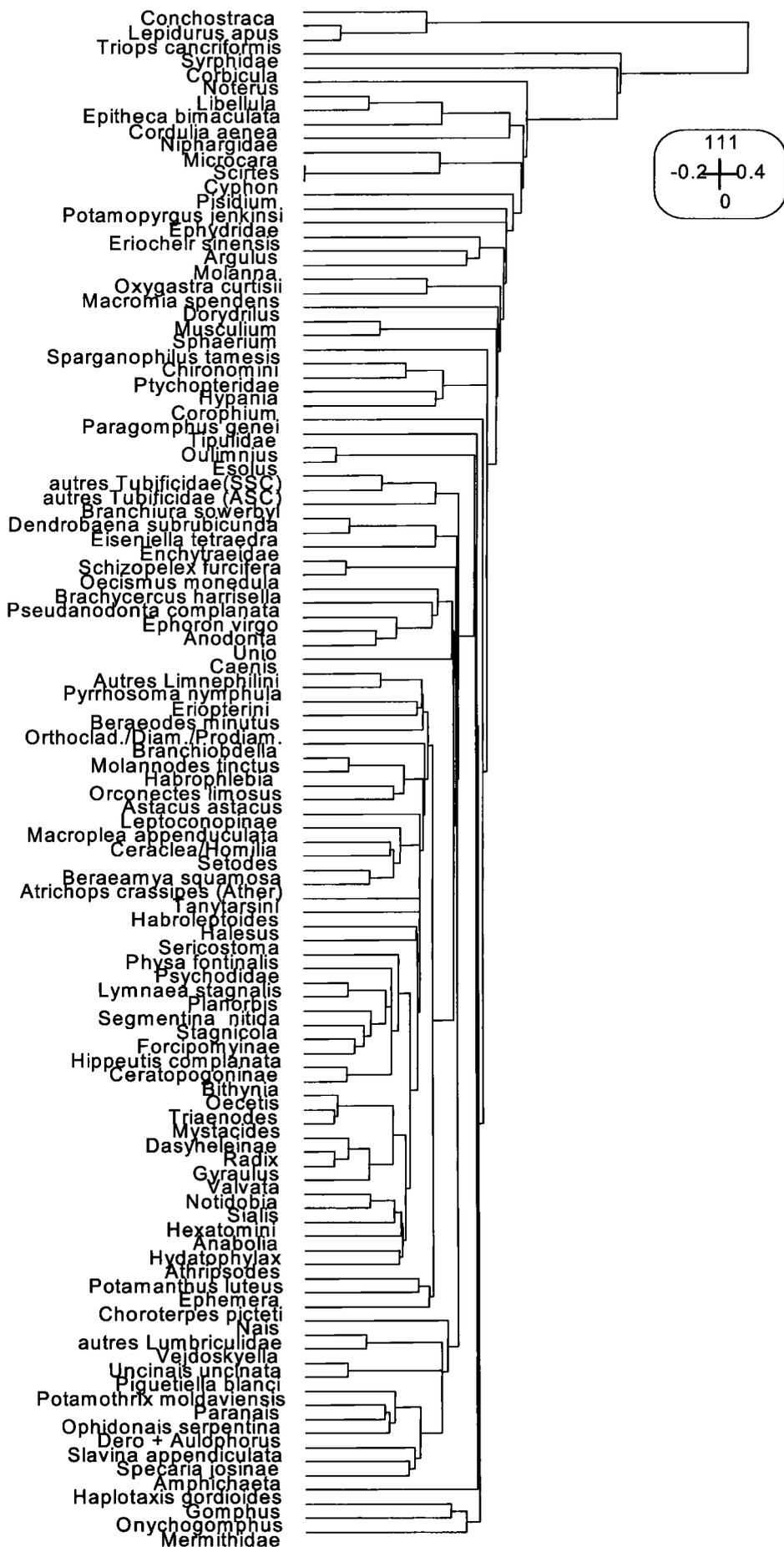
ANNEXE 2. Classification des taxa selon la méthode UPGMA et correspondance avec les six groupes fonctionnels issus de la classification selon la méthode de Ward.

Classification UPGMA

Correspondance
Classification de Ward



ANNEXE 3.. Dendrogramme présentant les groupes fonctionnels obtenus à partir de la classification des taxa selon la méthode de lien complet.



ANNEXE 4. Caractéristiques physico-chimiques du sédiment de Port-Galland (01)

Les principales caractéristiques physico-chimiques de ce sédiment sont les suivantes :

- il s'agit d'un substrat fin : 93% des particules ont une taille $<50\mu\text{m}$;
- sa teneur en eau moyenne est de l'ordre de 65% ;
- sa « valeur nutritive » pour les organismes benthique est relativement élevée : le ratio C/N atteint 8,2 (+/- 1,03), pour une teneur en azote totale de 0,48% et une teneur en carbone organique de 3,94% de la matière sèche ;
- son pH varie entre 6,9 et 7,2, et son potentiel d'oxydo-réduction varie entre -57 et -143 mV selon la saison. ;
- certains métaux ont été détectés, mais leur concentration reste relativement faible (As : 2 mg/kg MS, Pb : 16,5 mg/kg MS, Ni : 17 mg/kg MS, Cu : 15 mg/kg MS et Zn : 52 mg/kg MS) ;
- certains HAP ont été détectés à des concentrations inférieures à 0,5 mg/kg ;
- aucun PCB n'a été détecté.

ANNEXE 5. Protocole de préparation des organismes destinés aux bioessais

5.1. Larves de Chironomus riparius

Le protocole d'obtention d'un lot de larves de chironome s'articule en 4 étapes :

- prélèvement des pontes dans l'aquarium d'élevage au jour J0. Chaque masse est placée dans un pilulier individuel remplis d'eau d'élevage. Mise en incubation à 24°C ;
- tri des masses en vue de l'élimination des masses écloses au jour j1 ;
- tri des masses en vue de l'élimination des masses non écloses au jour j2 et mise en culture à 24°C des jeunes larves nées au jour j2, en présence d'eau de nappe, d'un substrat minéral grossier et d'un broyat de Tétramin® (0,75g pour 10 masses).

Les deuxième, troisième et quatrième stade sont respectivement atteints après 2, 4 et 7 jours de culture des nouveau-nés.

5.2 Juvéniles de Valvata (Cincinna) piscinalis

Le protocole d'obtention d'un lot de gastéropodes s'articule en quatre étapes :

- prélèvement de toutes les masses d'œufs pondues dans les élevages au jour -1. Ne connaissant pas la date de ponte de ces masses, ces masses ne sont pas utilisées ;
- prélèvement des masses pondues dans les élevages au jour 0 et mise en incubation pendant 11 jours à 24 °C en présence d'élevage ;
- mise en culture à 21°C des organismes nés au jour 12, en présence d'eau d'élevage (absence de substrat) et sous aération. Les nouveau-nés sont quotidiennement nourris (broyat de Tétramin® ; 0,1mg par individu par jour).

Les organismes sont introduits dans les enceintes d'essai lorsqu'ils atteignent une taille avoisinant 1 mm (soit 15 jours après la mise en culture).

5.3 Juvéniles de Branchiura sowerbyi

Ces juvéniles sont directement prélevés dans l'élevage, en tamisant délicatement le sédiment (ouverture du tamis = 315µm).

ANNEXE 6. Définition des paramètres utilisés dans nos modèles

Définition des paramètres communs aux modèles bioénergétiques (sans toxique et avec toxique) : les paramètres indiqués en gras ont été déterminés *via* les bioessais ; les autres paramètres ont été estimés en ajustant le modèle aux données issues des bioessais.

<i>Paramètre</i>	<i>Définition</i>	<i>Unité</i>
Q	Quantité totale de nourriture quotidiennement disponible pour les organismes	mg Tétramin®/ind./j
Q_{sed}	Quantité de nourriture quotidiennement disponible pour les organismes à partir du sédiment.	mg équivalent Tétramin®/ind./j
$Q_{t\acute{e}tra}$	Quantité de nourriture quotidiennement disponible pour les organismes à partir de la Tétramin®	mg Tétramin®/ind./j
C	Constante qui exprime la capacité de l'organisme à trouver de la nourriture	j/mg Tétramin®
f	Taux de nourriture ingéré par unité de temps par rapport à la quantité disponible	%
K	Quantité de nourriture assimilée par jour	mg Tétramin®/j
β	Fraction assimilable de la nourriture	%
i	Constante d'isomorphie	-
w	Poids de l'organisme	mg
w_{∞}	Poids asymptotique	mg
l	Longueur de l'organisme	mm
l_b	Taille de l'organisme à la naissance	mm
l_0	Taille en début de stade larvaire chez le chironome	mm
l_{max}	Taille maximale	mm
l_{∞}	Taille asymptotique	mm
l_p	Taille à la première reproduction	mm
L	Ratio entre la taille observée et la taille asymptotique	-
L_p	Ratio entre la taille observée et la taille asymptotique à la puberté	-
γ	Taux de croissance journalier	mm/j
α	Coût énergétique de fabrication d'une unité de biomasse	mg Tétramin®/ kg
g	Ratio décrivant le rendement de la croissance somatique	-
n	Coût énergétique de la nymphose chez le chironome	mg Tétramin® /œuf
δ	Coût énergétique de fabrication d'un œuf	mg Tétramin® /œuf
d_x	Durée du stade de développement x	j
D	Durée de la phase d'investissement énergétique pour la reproduction chez le chironome	j
t	Age des organismes	j
t_e	Age des chironomes à l'émergence	j
t_p	Age à la première reproduction	j
t_0	Temps théorique auquel les organismes mesureraient 0 mm s'ils grandissent selon le modèle de Von Bertalanffy	-
k	Taux de mortalité naturelle journalière	%
S_0	Nombre d'individu en début de test	-
S_e	Taux de survie embryonnaire	%
S_j	Taux de survie des juvéniles	%
S_a	Taux de survie des adultes	%/j
ψ	Accélération de la mortalité liée au vieillissement.	-
N	Fécondité individuelle	nombre d'œufs
N_{max}	Fécondité individuelle maximale	nombre d'œufs
N_c	Fécondité individuelle cumulée	nombre d'œufs

Définition des paramètres spécifiques aux modèles d'effets : les paramètres indiqués en gras ont été déterminé *via* les bioessais ; les autres paramètres ont été estimés en ajustant le modèle aux données issues des bioessais.

<i>Paramètre</i>	<i>Définition</i>	<i>Unité</i>
CSE_s	Concentration interne sans effets sur la survie	mg/kg de sédiments secs
CSE_a	Concentration interne sans effets sur l'assimilation	mg/kg de sédiments secs
CSE_c	Concentration interne sans effets sur la croissance	mg/kg de sédiments secs
CSE_m	Concentration interne sans effets sur la maintenance	mg/kg de sédiments secs
CSE_r	Concentration interne sans effets sur la reproduction	mg/kg de sédiments secs
C_i	Concentration interne en toxique	mg/kg d'organisme sec
c_e	Concentration en toxique dans le milieu d'essai	mg/kg de sédiments secs
c_i	Concentration interne normalisée	Mg/kg de sédiments secs
k_a	Taux d'absorption du toxique	mg/j
k_e	Taux d'élimination du toxique	mg/j
BCF	Facteur de bioconcentration	-
k	Taux de mortalité naturelle journalière	%/jour
b	Taux de toxicité de la substance	kg/mg d'organisme sec/j
t_c	Concentration tolérée	mg/kg de sédiments secs
g	Rendement de la croissance somatique	mg Tétramin® /oeuf
LC_{50}	Concentration létale pour 50% des organismes	mg/kg
h	Nombre de Hill	-

Définition des paramètres spécifiques aux modèles biodémographiques : les paramètres indiqués en gras ont été déterminé *via* les bioessais ; les autres paramètres ont été estimés en ajustant le modèle aux données issues des bioessais.

<i>Paramètre</i>	<i>Définition</i>	<i>Unité</i>
s	Sexe ratio	-
λ	Taux de croissance de la population	j^{-1}
z	Age à la première reproduction	j
F	Taux de reproduction journalier	oeufs/jour
S_n	Taux de survie des nymphes	%
T_r	Temps de résidence dans un stade de développement	j
m	Fécondité individuelle journalière	oeufs/jour
PR	Probabilité de rencontre	%
S_{L1}	Probabilité de survie de la naissance au 2 ^{ème} stade larvaire	%
R	Retard à la première reproduction	j
Cs_{dr}	Concentration sans effet sur l'âge à la première reproduction	mg/kg
$CSESP$	Concentration sans effet significatif sur la population	mg/kg
SEP	Seuil d'extinction de la population	mg/kg

ANNEXE 7. Tableau récapitulatif des équations

	<i>C. riparius</i>	<i>V. piscinalis</i>	<i>B. sowerbyi</i>
Conditions témoins			
Survie juvénile	Non modélisée	$S_j(t) = S_0 \times (1 - k)^t$	
Survie adulte	Non modélisée	$S_a(t) = S_a(0) \times e^{-\psi \times (t - t_p)^2}$	
Croissance	$l_{(t+1)} = \frac{f \times \beta}{3i \times \alpha} + l_{(t)}$	$l(t) = l_\infty - (l_\infty - l_b) \times e^{-\gamma}$	$w(t) = w_\infty \left[1 - e^{-\gamma(t-t_0)} \right]^3$
Fécondité cumulée	$N = \frac{Q \times f \times \beta \times D}{\delta}$	$N(l) = \frac{N_{\max}}{1 - L_p^3} \times \left(\frac{L^2 + L^3}{2} - L_p^3 \right)$	$N_c = 0,14 \times t - 1,02$
En présence de zinc dans le milieu			
Survie	$S(t) = e^{-kt}$ si $c_{i(t)} < CSE_s$ $S(t) = e^{-[kt + bt(ci - CSE_s)]}$ si $c_{i(t)} > CSE_s$		
Croissance (modèle ACC ₁)	$\frac{dl}{dt} = \frac{\gamma_0}{1 + b \times (c_{i(t)} - CSE_c)}$	$\frac{dl}{dt} = \gamma_0 \times \frac{2}{1 + \left(\frac{c_i - CSE_c}{t_c} \right)} \times (l_{\infty,0} - l)$	
reproduction (modèle ACO ₂)	$N_{ce} = \frac{N_0}{1 + b(c_{i(t)} - CSE_r)}$	$N(l) = \frac{N_{\max}}{(1 - L_p^3) \times \left(1 + \frac{c_i - CSE_r}{t_c} \right)} \times \left[\frac{L^2}{2} \times (1 + L) - L_p^3 \right]$	Non modélisée
Taux de croissance de la population	$\lambda^{z+1} - S_a \lambda^z - S_j F = 0$		

1. augmentation des coûts de croissance

2. augmentation des coûts de fabrication des œufs

RESUME

Nous avons cherché à améliorer la pertinence écologique des méthodes existantes d'évaluation des effets des substances chimiques pour les communautés d'invertébrés benthiques.

Nous avons tout d'abord mis au point une méthode qui permet de construire des batteries de test représentatives de la typologie de traits biologiques et écologiques rencontrés dans les communautés naturelles, grâce à l'analyse statistique des combinaisons de 22 caractéristiques biologiques et écologiques pour 479 espèces d'invertébrés rencontrées en Europe de l'Ouest. Nous avons utilisé cette méthode afin de construire une batterie de test représentative de la communauté d'invertébrés inféodés aux sédiments de zone aval de cours d'eau et de lacs. Cette batterie est constituée de cinq espèces : *Chironomus riparius*, *Valvata (Cincinna) piscinalis*, *Branchiura sowerbyi*, *Lumbriculus variegatus* et *Sericostoma personatum*.

Nous avons alors caractérisé la réponse biologique au zinc des populations de laboratoire pour *C. riparius*, *V. piscinalis* et *B. sowerbyi*. Pour ce faire, nous avons mis au point des méthodes d'élevage, décrit le cycle de vie en laboratoire en milieu non contaminé et réalisé des tests de toxicité afin de caractériser les effets d'une contamination du sédiment par le zinc sur la survie, la croissance et la reproduction des organismes. Ces effets ont été analysés au niveau individuel grâce à des modèles basés sur la perturbation de la gestion de l'énergie par le toxique. A partir de données individuelles, nous avons estimé les effets attendus au niveau des populations en couplant ces modèles d'effets sur les individus avec des modèles biodémographiques matriciels basés sur l'étude du cycle de vie des organismes.

L'étude de la sensibilité au zinc des populations de *C. riparius*, *V. piscinalis* et *B. sowerbyi* nous a permis d'estimer une concentration sans effet du zinc sur les communautés benthiques qui est relativement fiable par rapport aux résultats observés sur le terrain. La validation et l'adaptation des outils proposés en vue d'une utilisation en routine pour l'évaluation des effets des substances chimiques représentent les perspectives majeures de la thèse.

Mots clés : Invertébrés benthiques, Sensibilité, Traits biologiques, Traits écologiques, Evaluation du risque, Modélisation, Energie, Population, Zinc.

Discipline : Toxicologie de l'environnement

Laboratoire de recherches :

Cemagref - Groupement de Lyon, Laboratoire d'écotoxicologie.
3 bis Quai Chauveau, CP 220, 69336 Lyon Cedex 09, France.