



HAL
open science

Modélisation de distribution de sensibilité des espèces pour la protection des communautés

Vincent Baillard

► **To cite this version:**

Vincent Baillard. Modélisation de distribution de sensibilité des espèces pour la protection des communautés. Sciences de l'environnement. Université de Lorraine, 2021. Français. NNT : 2021LORR0065 . tel-03354004

HAL Id: tel-03354004

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03354004>

Submitted on 24 Sep 2021

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>



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

SIReNa



École doctorale n° 607 SIReNa : Sciences et Ingénierie des Ressources Naturelles

Thèse présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du grade de

Docteur de L'Université de Lorraine

Spécialité : "Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes"

par

Vincent BAILLARD

le 13 janvier 2021

**Modélisation de Distribution de Sensibilité des Espèces
pour la protection des communautés**

Directeur de thèse : **Simon DEVIN**
Co-encadrant de thèse : **Elise BILLOIR**

Devant un jury composé de :

M. Frédéric ALONZO,	Chercheur HDR	Rapporteur
M. Alexandre PÉRY,	ICPEF	Rapporteur
Mme. Elisabeth GROSS,	Professeur	Examineur
Mme Christelle LOPES,	Maître de conférence	Examineur

Université de Lorraine
Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC)
UMR CNRS 7360, 57070 Metz, France

*A Sami Samaali, puisque de toute
manière il ne m'aurait pas laissé
faire autre chose.*

Remerciements

"L'important n'est pas ce qu'on fait de nous, mais ce que nous faisons nous-même de ce qu'on a fait de nous." Cette citation de Jean Paul Sartre est probablement ma phrase préférée de l'histoire de l'humanité (désolé à tous ceux ne figurant pas dans ce top 1). Il est ainsi temps pour moi de remercier toutes les personnes ayant essayé, consciemment ou non, de faire des choses de moi et m'ayant ainsi donné l'opportunité d'intégrer ce fabuleux monde qu'est la recherche scientifique et celle de m'exprimer ici sur plus de deux cents pages.

En premier lieu, je souhaite bien entendu remercier mes deux directeurs de thèse, Elise Billoir et Simon Devin. Merci à tous les deux de m'avoir donné cette chance d'avoir pu dévier de mon parcours initial et de découvrir ce nouveau monde qu'est la modélisation en écotoxicologie. Merci de m'avoir donné l'occasion de coder sous R 8 heures par jour (cela peut avoir l'air d'un reproche, mais pas du tout!) et de produire des milliers (au bas mot) de graphiques. Merci d'avoir été là dès que j'en avais besoin, même lorsque je ne m'en rendais pas compte, en particulier en ces temps de confinements. Je n'aurais jamais tenu le choc sans cette motivation que vous avez su m'apporter. Elise, merci pour ces très nombreux conseils prodigués pendant trois ans, merci d'avoir répondu à mes milliers de questions et de toujours avoir été là lorsque j'avais besoin d'un coup de main. Merci également de m'avoir fait rencontrer ces autres personnes formidables que je remercierai bien sûr plus avant dans ce court texte. Simon, merci pour ta bonne humeur permanente communicative et tes super blagues (merci également de cautionner voire encourager les miennes!). Merci de tes mails en plein milieu de la nuit pour m'envoyer tes relectures et m'annoncer que tu m'as déchargé d'une partie de mon boulot administratif. En bref, merci à vous deux pour tout. J'espère vraiment être comme vous quand je serai grand.

Les prochains remerciements visent les nombreuses personnes ayant aidé mes travaux lors de ces trois belles années. En premier lieu, mes remerciements vont à Marie Laure Delignette-Muller qui m'a accueilli à plusieurs reprises à Lyon afin de me former à l'inférence bayésienne et de grandement m'aider pour l'article sur l'approche hiérarchique. Merci pour ces discussions très intéressantes sur de nombreux pans des statistiques et de la modélisation. Merci également pour ton

aide tout au long de ces trois ans et merci de m'avoir mis dans les mains dès le début de ma thèse les scripts de DROMICS, bien trop compliqués pour ma compréhension de R à cette époque, mais de fait diablement formateurs! Merci également d'avoir participé à mon comité de suivi de thèse. Je remercie ensuite Floriane Larras et Mechthild Schmitt-Jansen de m'avoir accueilli à Leipzig lors de l'été 2019. Merci de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur mes premières données de type omiques et de me frotter un peu à Galaxy, malgré le fait que ces traitements n'aient malheureusement pas pu aboutir lors de cette période de deux mois. Merci également à Cécile Sulmon et Arnaud Elger, premièrement pour avoir également pris part à mon comité de suivi de thèse, mais également pour m'avoir donné accès à vos jeux de données sans quoi cette thèse n'aurait bien entendu jamais eu lieu. Merci également pour les nombreuses discussions que nous avons pu avoir sur ces différents travaux, votre "point de vu de biologiste" a permis de considérablement améliorer la qualité des différents articles produits, ainsi que celle de ce manuscrit.

Je souhaite ensuite remercier Frédéric Alonzo, Alexandre Péry, Elisabeth Gross et Christelle Lopes pour avoir accepté d'évaluer ces travaux, en constituant le jury de ma thèse. Je ne doute pas que vos retours seront très intéressants et me permettront de m'améliorer en tant que scientifique.

Merci également à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer lors de cette thèse et de mes stages préalables au LIEC. Merci à mes collègues de bureau initiaux qui ont grandement contribué à mon intégration : Kevin, Clément, Marine et Carole. Merci à Marc et Quentin qui a la même période ont été mes nounous du labo. Merci à mes autres collègues de labo plus récents, bien que certains soient déjà repartis depuis un moment déjà : Jérémy, Quentin (encore!), Nicolas, Perrine, Ziming, Miriam, Claudia et Laurine que je remercie en même temps pour ses super travaux de stage. Merci à vous pour tout, pour la bonne humeur et l'ambiance studieuse quand il l'a fallu, mais aussi pour les batailles acharnées ayant rythmé plusieurs périodes. Mes condoléances vont aux fléchettes maintenant perdues dans d'obscurs recoins et qui ne reverront probablement pas la lumière du jour avant encore de nombreuses années. Merci également à toutes les autres personnes qui ont contribué à faire de ce laboratoire mon second chez-moi. Je ne me lancerai pas ici dans un inventaire à la Prévert : vous êtes bien trop nombreux et je suis terrifié à l'idée d'oublier ne serait-ce qu'un seul d'entre vous. Je sais que je peux souvent me montrer distant, mais sachez que j'ai apprécié votre compagnie à tous, merci beaucoup. Je ferai tout de même une exception à cette volonté de non-énumération en citant Lionel Léglize, Gérard Masson et Michael Danger. Mes encadrements de grande qualité n'ont en effet pas commencé avec celui d'Elise et Simon et les vôtres ont été tout bonnement admirables lors de mes différents stages. Merci de m'avoir donné le goût et l'envie de poursuivre mes aventures dans le grand monde qu'est la recherche.

Quitte à mentionner ceux ayant contribué à faire naître chez moi cette vocation, je souhaite en profiter pour remercier Sami Samaali qui a su transformer ma vision des SVT de "matière obligatoire" à "bon sang, c'est que je veux faire de ma vie!". Puissiez-vous faire naître encore de nombreuses vocations!

D'autres personnes sont bien entendu à remercier, toujours en dehors des murs du LIEC. Merci au groupe d'irréductibles déserteurs du Manoir, Trickster, Op's, Exo, Smileless, Nyméria et bien entendu Lucie. Vous avez largement assez supporté mes plaintes et ma stupidité pour mériter une statue (mais le mieux que je puisse faire, c'est un concept art avec Paint). Vous êtes à couper le souffle!

Les dernières personnes que je souhaite remercier (mais non des moindres) sont les membres de ma famille, bien entendu. Ma p'tite môman, mon p'tit pôpa, merci d'avoir toujours cru en moi. Merci de m'avoir toujours poussé à donner le meilleur de moi-même et merci de m'avoir toujours soutenu dans mes choix, quels qu'ils soient. Merci de m'avoir toujours poussé à faire ce que j'aimais et de m'avoir parfois forcé à faire des choses pour découvrir ce que j'aime (il aurait été quelque peu dommage d'arrêter la biologie au lycée comme je l'avais prévu à l'époque). Dans tous les cas, bravo pour avoir élevé un fils aussi génial, beau, intelligent et modeste. Damien, puisqu'on parle de toi, merci à toi d'avoir toujours été là. Merci de m'avoir écouté quand j'en avais besoin et merci pour ces élucubrations sans queue ni tête que nous sommes les seuls à comprendre. Quand ce confinement sera terminé et que l'on pourra se croiser, tu auras droit à un dab de la victoire. Enfin, la dernière personne à remercier est celle qui partage maintenant ma vie. Lucie, faire la liste de toutes les choses pour lesquelles je devrais te remercier serait trop long. Je me contenterai simplement de te remercier pour ta présence dans les bons et les mauvais moments. Merci pour tout, tu es fabuleuse.

En annexe à cette liste, merci à l'indéfectible présence du café dans ma vie. Merci de nourrir au quotidien mon addiction. Rien de bien original dans ce genre de domaines, mais il y a peu de choses capables de me motiver aussi efficacement à travailler qu'une tasse fumante de café bien noir (sans sucre, bien entendu, pour que l'amertume de la vie finisse noyée dans celle de ce breuvage quasi divin). Un calcul basique sans prise en compte de sources de variabilité intradoctorantielle (je pose l'hypothèse que la prise en compte de ce genre de sources de variabilité ne modifie pas les résultats finaux de modélisation, quelqu'un devrait faire une thèse là-dessus, un jour) m'a mené à une estimation finale d'environ 3.420 tasses de café consommées lors de ces trois ans, soit un peu plus d'un mètre cube. Mais j'essaie de me soigner. Promis.



Table des matières

Table des matières	ix
Liste des figures	xi
Liste des tableaux	xiii
Liste des abréviations	xv
Publications, communications scientifiques et bourses obtenues	xvii
Expériences et formations	xix
Introduction	1
1 Etat de l'Art	5
1.1 L'Evaluation du risque Environnemental	6
1.2 Les Distributions de Sensibilité des Espèces	25
1.3 Les sources de variabilité des données	40
2 Prise en compte de la variabilité intraspécifique dans les SSDs et accent sur la variabilité intergénomique	43
2.1 Présentation	44
2.2 Ébauche d'article soumis prochainement	45
2.3 Tentative de généralisation	72
3 Effets de la compétition interspécifique sur les SSD	75
3.1 Présentation	76
3.2 Approche classique	76
3.3 Approche hiérarchique	118
4 Discussion générale	151
4.1 Lien entre les approches classique et hiérarchique de l'étude des effets de la compétition interspécifique	152
4.2 Comment améliorer la représentativité de l'ERA et des SSD?	156
4.3 Que faire de la variabilité intraspécifique?	164
4.4 Perspectives	166
Conclusion générale	169
Références	171
A <i>Supplementary information des articles intégrés au manuscrit</i>	I
A.1 <i>Supplementary information</i> de l'article sur l'approche classique paru dans <i>Ecotoxicology and Environmental Safety</i> en Section 3.2.2	I
A.2 <i>Supplementary information</i> de l'article sur l'approche hiérarchique soumis dans <i>Environmental Science and Technology</i> en Section 3.3	VII

Résumé en français et anglais

XXX

Liste des figures

1.1	Principes généraux de l'ERA	11
1.2	Schema de calcul de la NOEC et de la LOEC	15
1.3	Présentation des formes de CRC pouvant être appliquées par l'outil DRomics	19
1.4	Schéma de calcul de trois CEC présentés	22
1.5	Présentation des quatre <i>tiers</i>	24
1.6	Exemple de visualisation de SSD.	29
3.1	Schémas des différents processus de sélections envisagés	113
3.2	Quelles sont les IC ₁₀ possibles pour une CRC non monotone	115
3.3	Corrélation entre endpoints dans le jeu de données sur la compétition	117

Liste des tableaux

1.1 Exemples de valeurs d'AF utilisées	25
1.2 Tableau récapitulatif de l'effet de différents choix de modélisation sur les SSD.	39
4.1 Tableau comparatif des résultats de l'étape de sélection.	153
4.2 Tableau des HC ₅ calculées avec l'approche hiérarchique.	155

Liste des abréviations

- AF** Facteur de Sécurité –ou *Assessment Factor*–. 3, 10, 13, 21, 23, 24, 27, 28, 34, 157, 158, 170
- AIC** Critère d'Information d'Akaike –ou *Akaike Information Criterion*–. 17, 114, 159
- BMD_{zsd}** Dose Seuil associée à une variation de z fois l'écart-type –ou *Benchmark Dose associated to a z times standard deviation variation*–. 20
- CEC** Concentration à Effet Critique –ou *Critical Effect Concentration*–. 13–16, 18, 20, 21, 23, 25, 27–35, 37, 39, 40, 76, 77, 114–116, 154, 155, 157–163, 165
- CRC** Courbe Concentration-Réponse –ou *Concentration-Response Curve*–. 16–18, 20, 21, 30, 31, 76, 112, 114, 115, 118, 159, 170
- DAG** Graphe Orienté Acyclique –ou *Directed Acyclic Graph*–. 122
- DDT** Dichlorodiphényltrichloroéthane. 7
- EC_x** Concentration présentant x pourcent d'effet –ou *x percent Effective Concentration*–. 18, 20, 30, 114, 155, 161
- EQC** Norme de Qualité Environnementale –ou *Environmental Quality Criterion*–. 13, 26
- ERA** Evaluation du Risque Environnemental –ou *Environmental Risk Assessment*–. 2–4, 6, 7, 9, 10, 15, 18, 21, 23–25, 27–29, 35, 37, 38, 42, 44, 45, 76, 155, 156, 158–160, 163, 165, 170
- ESD** Distribution de Sensibilité des Endpoints –ou *Endpoint Sensitivity Distribution*–. 154, 155
- HC₅** Concentration Dangereuse pour 5 pourcents des espèces –ou *Hazardous Concentration for five percent of species*–. 2–4, 25–29, 33, 36–40, 44, 45, 74, 112, 152–155, 157, 162, 166, 170
- IC_x** Concentration d'Inhibition de x pourcent –ou *x percent Inhibition Concentration*–. 20, 21
- LOEC** Concentration Minimale avec Effets Observés –ou *Lowest Observed Effect Concentration*–. 15, 36, 161
- MCMC** Monte-Carlo par chaînes de Markov –ou *Markov Chain Monte Carlo*–. 120
- NOEC** Concentration Sans Effet Observé –ou *No Observed Effect Concentration*–. 15, 18, 25, 30, 35, 36, 39, 161, 162
- OECD** Organisation de Coopération et de Développement Economiques –ou *Organisation for Economic Co-operation and Development*–. 14
- PAF** Fraction Potentiellement Affectée –ou *Potentially Affected Fraction*–. 25, 29, 36
- PEC** Concentration Environnementale Prédite –ou *Predicted Environmental Concentration*–. 10, 13
- PNEC** Concentration Prédite n'ayant Pas d'Effet –ou *Predicted No Effect Concentration*–. 10, 13–15, 23, 27, 28, 39, 45

REACH Enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des substances chimiques –ou *Registration, Evaluation, Authorization and restriction of Chemicals*–. 14

RQ Quotient de Risque –ou *Risk Quotient*–. 10

SSD Distribution de Sensibilité des Espèces –ou *Species Sensitivity Distribution*–. 2–4, 23–40, 44, 45, 72, 74, 76, 111, 112, 114–116, 152–157, 159, 161–163, 166, 170

TK-TD Toxicocinétique-toxicodynamique –ou *Toxicokinetic-toxicodynamic*–. 23

USEPA Agence américaine de Protection de l'Environnement –ou *United States Environmental Protection Agency*–. 8, 26, 44, 161, 166

Publications, communications scientifiques et bourses obtenues

Publications dans des journaux à comité de lecture

- F. LARRAS, E. BILLOIR, V. BAILLARD, A. SIBERCHICOT, S. SCHOLZ, T. WUBET, M. TARKKA, M. SCHMITT-JANSEN et M.-L. DELIGNETTE-MULLER. 2018, "DRomics : A Turnkey Tool to Support the Use of the Dose-Response Framework for Omics Data in Ecological Risk Assessment", *Environmental Science and Technology*, vol. 52, no24, doi : 10.1021/acs.est.8b04752, p. 14 461–14 468, ISSN 0013-936X. URL : <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b04752>.
- V. BAILLARD, C. SULMON, A.-K. BITTEBIERE, C. MONY, I. COUEE, G. GOUESBET, M. L. DELIGNETTE-MULLER, S. DEVIN, E. BILLOIR, "Effect of interspecific competition on species sensitivity distribution models : analysis of plant responses to chemical stress", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 200, doi :10.1016/j.ecoenv.2020.110722, p. 110 722, ISSN 0147-6513. URL : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651320305613>.
- V. BAILLARD, M. L. DELIGNETTE-MULLER, C. SULMON, A.-K. BITTEBIERE, C. MONY, I. COUEE, G. GOUESBET, S. DEVIN, E. BILLOIR, "How does interspecific competition modify the response of grass plants against herbicide treatment? A hierarchical concentration-response approach", *Science of the Total Environment*, vol. 778, doi :10.1016/j.scitotenv.2021.146108, p. 146 108, ISSN : 0048-9697. URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004896972101175X>
- **En phase finale de rédaction** : Vincent BAILLARD, Arnaud ELGER, Eva ROUBEAU DUMONT, Laurine MALARDIER, Simon DEVIN, Elise BILLOIR, "Modification of Species Sensitivity Distributions by intergenotypic variability - a simulation-based approach"

Présentations en congrès

- **SEFA 2019, Lyon, présentation orale : Vincent Baillard**, Marie Laure Delignette-Muller, Cécile Sulmon, Anne-kristel Bittebiere, Cendrine Mony, Elise Billoir, Simon Devin : "Approche de modélisation hiérarchique pour la description de l'effet de la compétition interspécifique sur la tolérance chimique d'herbacées."
- **ADLaF 2019, Metz, présentation orale : V. Baillard**, L. Malardier, M. L. Delignette-Muller, E. Roubeau, A. Elger, A. Bouchez, M. Laviale, S. Devin, E. Billoir : "Importance de la variabilité intraspécifique de la polluosensibilité pour l'évaluation du risque ecotoxicologique basée sur l'approche SSD (Species Sensitivity Distribution)."
- **SETAC YES 2019, Gand (Belgique), présentation orale : Vincent Baillard**, Cécile Sulmon, Anne Kristel Bittebiere, Cendrine Mony, Simon Devin, Elise Billoir : "SSD models used for assessing interspecific competition impact on organism's tolerance against chemical stress."
- **AFEM 2019, Bussang, poster : Ziming Wang**, Aurélie Cébron, **Vincent Baillard**, Michael Danger : "Effects of environmental stressors on the optimal N :P ratios of microbial decomposers."

- **Sfécologie 2018, Rennes, poster : Vincent Baillard**, Cécile Sulmon, Anne Kristel Bittebiere, Cendrine Mony, Simon Devin, Elise Billoir : "Can SSD models help assessing interspecific competition impact on organisms' tolerance against chemical stress?"
- **SETAC Europe 28th Annual Meeting 2018, Rome (Italie), poster : E. Billoir, F. Larras, V. Baillard**, S. Devin, M. Schmitt-Jansen, M. L. Delignette-Muller : "Defining simple toxicity values (EC, BMD) is not so simple."
- **SETAC Europe 28th Annual Meeting 2018, Rome (Italie), poster et poster spotlight (présentation orale de 3 minutes) : Vincent Baillard**, Cécile Sulmon, Anne Kristel Bittebiere, Cendrine Mony, Simon Devin, Elise Billoir : "Interspecific competition impact on organism response to chemical stress : an SSD-based approach."

Bourses obtenues et déplacements associés

- **2019 : Bourse DrEAM (Doctor, Explore and Achive More!, dispositif de l'Initiative Lorraine Université d'Excellence) pour déplacement de deux mois au laboratoire UFZ de Leipzig (Allemagne) (2300€)** : Participation au pré-traitement de données transcriptomiques *via* l'outil Galaxy, revue bibliographique sur le traitement de divers types de données omiques, intégration à l'équipe de recherche sur place.
- **2019 : Bourse du comité d'organisation de la SETAC YES (200€)** : Remboursement des frais de transport afin de participer au congrès associé.
- **2018 : Bourse du GDR Ecologie Statistique pour deux déplacements d'une semaine chacun au laboratoire LBBE de Lyon (800€)** : Formation à l'inférence bayésienne et à la construction de modèles hiérarchiques.

Expériences et formations

Expériences professionnelles

Séjour en Allemagne (2 mois)

Helmholtz Centre for Environmental Research - UFZ

2019

Leipzig, Allemagne

Traitement bioinformatique de données de transcriptomique afin de permettre leur analyse (sous la direction de Floriane LARRAS et Mechthild SCHMITT-JANSEN).

Stage de Master 2 (6 mois)

Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux

2017

Metz

Effets des changements climatiques sur les besoins élémentaires des décomposeurs et détritivores et conséquences fonctionnelles (sous la direction de Michael DANGER). Expérimentations sur amphipodes et communautés fongiques : élevage, modification de qualité stoechiométrique des ressources, mesures de croissance individuelle et populationnelle. Modélisation des résultats : courbes concentration-réponse non-monotones, définition d'optimums locaux.

Stage de Master 1 (2 mois)

Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux

2016

Metz

Evolution des traits d'histoire de vie de poissons exposés à un rejet industriel (sous la direction de Gérard MASSON). Statistiques et modélisation sur une base de données de pêches sur 15 ans : évolution de la population et des traits des poissons la composant *vs.* température et concentration en cuivre.

Enseignements

En doctorat, Contrat de Doctorant Contractuel Chargé d'Enseignement (DCCE) de trois ans, soit un équivalent de 192heqTD à l'UFR SciFA (Licence Sciences de la Vie et Master Gestion de l'Environnement).

- **Master 2** : Initiation au logiciel R (4 heures de CM et 68 heures de TP sur deux ans) : Prise en main du logiciel RStudio, création et manipulation d'objets, bases de programmation (fonctions SI, boucles), construction de graphiques (avec R natif et ggplot2), utilisation de tests statistiques (paramétriques et non-paramétriques, comparaisons de moyennes et de variances, tests de régression). Examen et correction des rendus.
- **Master 1** : Biostatistiques (8 heures de CM et 12 heures de TP sur deux ans) : Présentation des concepts théoriques et de l'application (sur papier et via R) de tests d'analyse de variance : ANOVA à un et deux facteurs et ANCOVA. Analyse des résultats et validation des modèles linéaires associés. Examen et correction des copies.
- **Master 1** : Dynamique des populations (24 heures de TP sur un an) : Réalisation d'un modèle d'évolution de population de gammares à partir d'un jeu de données expérimental (effectifs à chaque classe de taille pour différentes campagnes de pêche). Ajustement d'un modèle de croissance individuelle de von Bertalanffy, définition de classes d'âge et construction d'une

matrice de Leslie. Modification et précision du modèle afin de prendre en compte diverses hypothèses écologiques. Prédiction de la modification de l'état de la population suite à l'application de différents stress. Correction du rapport demandé devant présenter la méthodologie appliquée et les résultats obtenus.

- **Licence 3** : Création de pages internet (47 heures de TP sur deux ans) : présentation des langages HTML et CSS et de leur utilisation, production de pages internet simples et de divers éléments de contenu (illustrations, listes, tableaux...), application de styles de manière local ou dans des fichiers séparés. Examen et correction des rendus.
- **Licence 3** : Toxicologie systémique et appliquée, physico-chimie et biomarqueurs (6 heures de TD sur un an) : Lecture de publications scientifiques sur l'utilisation de différents biomarqueurs et sur l'action de toxines d'origine animale, présentation de méthodologies associées, synthèse des lectures en groupes.
- **Licence 2** : Introduction à la toxicologie et à l'écotoxicologie (4 heures de TD sur un an) : Lecture de publications scientifiques sur les effets toxicologiques et écotoxicologiques des parabènes, présentation de méthodologies associées, synthèse des lectures en groupes.
- **Licence 1** : Histologie animale (48 heures de TP sur un an) : réalisation de dessins d'observation de lames histologiques de différents épithélia (glande salivaire de rat, tube digestif de rat, épithélium externe de lombric). Correction des dessins d'observation produits.

En ATER, service de 11 mois, soit un équivalent de 176heqTD à l'IUT STID (DUT et Licence Pro STID).

- **Licence Pro** : Analyse de données et plans d'expérience (CM, TD et TP).
- **DUT 2^{ème} année** : Analyse de données, estimation et tests statistiques et modèles linéaires (CM et TD).
- **DUT 1^{ère} année** : Statistique descriptive, probabilités et simulations, études statistiques et enquêtes, programmation statistique (TD et TP).

Encadrements

- Encadrement de Laurine MALARDIER (Master 1, deux mois) pour travail préliminaire sur l'approche du chapitre sur la variabilité intraspécifique dans les SSD, bibliographie, recherche de données et premiers essais de simulations.

Formation initiale

Doctorat	10/2017 - 12/2020
<i>Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux</i>	<i>Metz</i>

Modélisation de distribution de sensibilité des espèces pour la protection des communautés. Thèse financée par la Région Grand Est et l'Université de Lorraine.

Master Environnement, Ecotoxicologie et Ecosystèmes	2015 - 2017
<i>Université de Lorraine</i>	<i>Metz</i>

Mention Bien. Parcours Gestion et Valorisation des Milieux Aquatiques Continentaux. Ecotoxicologie, écologie, écologie fonctionnelle, statistiques et modélisation.

Licence Sciences de la Vie et de l'Environnement	2012 - 2015
<i>Université de Lorraine</i>	<i>Metz</i>

Mention Assez Bien. Formation généraliste en biologie. Introductions à l'écologie, la toxicologie et l'écotoxicologie.

Formations suivies lors du doctorat

- Initiation à LATEX
- Formation à l'inférence bayésienne
- Formation à la culture de prévention
- Culture de l'intégrité scientifique
- Innovations pédagogiques et outils numériques
- Doctoriales de Lorraine
- Séminaire Ecole Doctorale SIRENa (présentation orale)
- Séjour dans un laboratoire allemand

Autres activités

- Représentant des étudiants de Licence Sciences de la Vie.
- Participation à la Fête de la Science : animation d'atelier et accueil du public.
- Participation à une journée internationale de discussions sur le thème de l'écologie organisée par la ville de Metz.

Introduction

« Un jour, je trouverai une citation adaptée. »

Vincent Baillard

Chaque jour, les activités humaines produisent et rejettent des composés pouvant altérer les environnements dans lequel nos sociétés évoluent. Ces composés peuvent être issus de nombreuses sources (*e.g.* agriculture, industries pétrochimiques ou pharmaceutiques...) et également être de nature différente en fonction de leur origine et des objectifs liés aux activités dans lesquelles ils sont impliqués (*e.g.* pesticides conçus pour avoir un effet sur des organismes spécifiques, nanoparticules incluses dans divers produits d'hygiène, microplastiques issus de la dégradation de plastiques...). Il existe ainsi un très grand nombre de composés qui transitent au moins un temps dans l'environnement et peuvent alors y avoir des effets. A ce jour, plus de 25.000 substances sont enregistrées dans le catalogue de l'European Chemical Agency [ECHA, 2020] qui "est le maître d'œuvre de la mise en application de la législation de l'Union européenne en matière de substances chimiques" et se définit comme "garante d'une utilisation sans risque des substances chimiques". Ce nombre de substances est en constante augmentation avec le développement de nouvelles activités et la production et l'utilisation de nouvelles molécules. Il est ainsi important d'évaluer les effets de ces composés sur l'environnement afin de contrôler les risques qui y sont liés et tenter de garder les dégradations des milieux naturels à un niveau considéré "acceptable".

Le domaine scientifique évaluant ces effets est l'écotoxicologie, défini par RAMADE [1977] comme la science "dont l'objet est l'étude des polluants toxiques dans les écosystèmes et la biosphère tout entière". Cette discipline, jeune à l'échelle des sciences, se trouve à la croisée de la chimie, qui étudie le comportement des composés dans un milieu, la toxicologie, qui étudie les effets délétères de diverses sources sur les organismes, et de l'écologie qui étudie les organismes dans leur environnement ainsi que leurs interactions entre eux et entre eux et leur environnement. L'écotoxicologie applique ainsi les méthodes de la toxicologie à l'échelle de l'environnement et étudie, en plus des effets de l'activité humaine sur les organismes, la répercussion de ces effets à des échelles supérieures d'organisation biologique tels que les effets sur les communautés. Les résultats produits par l'écotoxicologie ont aidé à mettre en place et aident toujours à amender l'[Evaluation du Risque Environnemental –ou *Environmental Risk Assessment*– \(ERA\)](#) et les méthodes utilisées afin de l'appliquer. L'ERA a en effet pour rôle d'évaluer les effets de l'activité humaine sur l'environnement et d'aider à garder ces effets dans les limites de ce qui est considéré comme "acceptable". Parmi les nombreux outils utilisés afin d'évaluer ces effets, on trouve les [Distribution de Sensibilité des Espèces –ou *Species Sensitivity Distribution*– \(SSD\)](#), des outils de modélisation permettant d'extrapoler, à l'échelle des communautés, des résultats écotoxicologiques obtenus à l'échelle des organismes. Ces modèles permettent de calculer une valeur de concentration de référence en contaminant censée protéger les communautés, la [Concentration](#)

Dangereuse pour 5 pourcents des espèces –ou *Hazardous Concentration for five percent of species*– (HC₅).

Les SSD souffrent cependant d'un certain nombre de biais. En effet, étant très largement influencés par les données avec lesquelles ils ont été construits, ces modèles ne peuvent pas prendre en compte les facteurs non testés dans les protocoles expérimentaux ayant permis d'obtenir ces données. Trois des principaux biais rencontrés dans les résultats de ces procédures sont dus aux faits que :

- Les tests écotoxicologiques sont le plus souvent réalisés sur des organismes isolés dans leurs dispositifs expérimentaux, ce qui est peu représentatif de l'environnement où les organismes sont impliqués dans de nombreuses interactions biotiques (*e.g.* compétition intra et interspécifique, comensalisme, prédation).
- Les organismes ne sont en général exposés qu'à une seule substance alors que l'environnement contient un mélange de nombreuses substances. Les interactions entre ces contaminants multiples ne sont ainsi que rarement prises en compte.
- Les valeurs de sensibilité associées à chaque espèce doivent être uniques afin d'être incluses dans une SSD et ne peuvent ainsi pas inclure les diverses sources de variabilité intraspécifique possibles telles que la variabilité inter-génotypique, la variabilité inter-laboratoires ou encore la variabilité liée aux conditions expérimentales.

Seul le dernier de ces biais est spécifique aux SSD, les autres sont communs à la plupart des méthodes mises en place en écotoxicologie. Ces biais sont censés être compensés par un *Facteur de Sécurité* –ou *Assessment Factor*– (AF) venant diviser l'HC₅ afin de la rendre plus protectrice avant son inclusion en ERA. Dans les faits, les AF appliqués aux SSD sont cependant assez arbitraires, même si les normes imposent des valeurs minimales et maximales pour ces AF. Il est cependant légitime de se demander si ces AF sont assez élevés pour réellement compenser les biais des SSD.

Ces travaux de thèse ont eu pour objectif d'évaluer l'effet de la prise en compte de sources de variabilité des données de sensibilité des espèces sur l'ERA et plus précisément sur les SSD. Pour ce faire, ce manuscrit commencera, dans le chapitre 1, par présenter de manière plus avancée ce que sont l'ERA et les SSD, ainsi que la manière dont ils sont appliqués dans la production scientifique et la réglementation. Dans le chapitre 2 sera présentée l'approche de modélisation basée sur des simulations employée sur le jeu de données publié dans ROUBEAU DUMONT et collab. [2019] afin d'évaluer les effets de la variabilité intraspécifique en général et de la variabilité inter-génotypique

en particulier sur les SSD et les HC₅ en découlant. Ce chapitre contiendra également une ébauche d'article sur le sujet. Le chapitre 3 présentera les travaux réalisés sur un jeu de données évaluant les effets d'un autre facteur de variabilité sur l'ERA et les SSD, la compétition interspécifique. Sur ce jeu de données ont été réalisées deux approches différentes, la première dite "approche classique" ayant pour objectif de mimer la procédure appliquée dans l'ERA afin de produire des SSD à visée réglementaire et ayant conduit à la publication de l'article [BAILLARD et collab. \[2020\]](#) et la seconde dite "approche hiérarchique" visant à modéliser les nombreuses données sous la forme d'un modèle unique permettant de décrire de manière fine et ciblée les effets de la compétition sur les relations concentration-réponse et ayant conduit à la rédaction d'un article soumis dans le journal *Science of the Total Environment*. Le chapitre 4 viendra discuter de manière plus poussée les résultats présentés dans les chapitre précédents, fera le lien entre eux et proposera des perspectives sur la prise en compte des facteurs de variabilité en ERA et leurs effets sur les résultats finaux. Enfin, une conclusion générale viendra clore cet exercice.

Chapitre 1

Etat de l'Art

« [...] en d'autres termes, il me faut exposer brièvement l'état actuel de nos connaissances dans un sujet que je ne domine pas. Ceci ne peut être évité et je m'en excuse, particulièrement vis-à-vis des biologistes, pour le caractère amateur de mon résumé. »

Erwin Schrödinger – Qu'est-ce que la vie? (1944)

Sommaire

1.1 L'Evaluation du risque Environnemental	6
1.1.1 Présentation	6
1.1.2 Historique	7
1.1.3 Principes de base	10
1.1.3.1 Définition de la PEC	10
1.1.3.2 Définition de la PNEC	13
1.1.4 Méthodes classiques de calcul des CEC	15
1.1.4.1 CEC basées sur des tests statistiques	15
1.1.4.2 CEC basées sur la modélisation de la relation concentration-réponse	16
1.1.5 Les quatre <i>tiers</i>	21
1.2 Les Distributions de Sensibilité des Espèces	25
1.2.1 Concept	25
1.2.2 Historique	26
1.2.3 L'AF pour les SSD : qu'est-il censé prendre en compte?	27
1.2.4 Méthodologie des SSD	29
1.2.4.1 Choix des données à utiliser	29
1.2.4.2 Choix de la distribution à utiliser	35
1.2.4.3 Niveau d'HC _x à utiliser	37
1.3 Les sources de variabilité des données	40
1.3.1 Les sources de variabilité biologiques	40
1.3.2 Les sources de variabilité environnementales/expérimentales	41
1.3.3 Les sources de variabilité issues de la modélisation des données	42

1.1 L'Evaluation du risque Environnemental

1.1.1 Présentation

Au XXI^{ème} siècle, les contaminations d'origine humaine sont multiples et omniprésentes. La question n'est ainsi plus de savoir si des contaminations sont présentes dans un environnement donné, mais à quel point ces contaminations sont importantes et comment "gouverner un monde toxique" (BOUDIA et JAS [2019]). L'ERA vise ainsi à évaluer l'impact des diverses modifications apportées par l'activité humaine sur l'environnement et les organismes qui s'y trouvent, ainsi que sur les personnes. Elle vise la protection des écosystèmes, considérant leur structure, leur fonctionnement et les services qu'ils fournissent (AMIARD et AMIARD-TRIQUET [2015]). D'après MURALIKRISHNA et MANICKAM [2017], le risque est défini comme étant la probabilité d'occurrence d'un effet néfaste à la suite d'une action ou d'une condition, le plus souvent réalisée ou mise en place à la suite d'une activité humaine. Ainsi, le risque lié, par exemple, à une substance d'origine anthropique résulte de la combinaison entre le danger qui lui est associé et la probabilité d'exposition à ladite substance, le danger étant défini comme le potentiel de la substance à pouvoir produire un effet délétère chez un organisme si elle se retrouve en contact avec lui en quantité suffisante. Un composé peut donc être catégorisé comme dangereux, car capable d'induire des effets néfastes, mais non risqué dans les conditions actuelles car les probabilités d'exposition à des concentrations entraînant ces effets délétères sont minimales. L'ERA présente deux composantes, l'évaluation du risque concernant la santé humaine ainsi que l'évaluation du risque écologique. Au sein de chacune de ces deux composantes, plusieurs risques peuvent également être évalués au niveau des écosystèmes : le risque physique (*e.g.* des radiations), le risque biologique (*e.g.* l'introduction d'espèces invasives ou de pathogènes) et le risque chimique (*e.g.* le ruissellement d'un herbicide dans un cours d'eau) (MURALIKRISHNA et MANICKAM [2017]). Il est par exemple possible d'évaluer un risque biologique sur la santé humaine ou un risque physique sur la composante écologique. Dans ce manuscrit ne sera traité en détail que de l'évaluation du risque chimique sur la composante écologique et par la suite, le sigle ERA fera référence à ce type de risque uniquement.

L'ERA est un enjeu de société important car elle aide à définir jusqu'à quel point les activités humaines sont autorisées à dégrader l'environnement et, par extension, la santé humaine. Cette discipline présente donc à la fois un aspect scientifique concernant la caractérisation des risques encourus, ainsi qu'un aspect politique puisque les seuils de concentration entraînant un risque "acceptable" sont fixés arbitrairement par le législateur qui doit ainsi concilier les données produites par la science avec la nécessité de maintenir une activité économique.

1.1.2 Historique

Le 31 août 1794, à 7h15, les 150 tonnes de poudre stockés dans le magasin de poudre du Château de Grenelle explosent. Sur les 2.000 ouvriers travaillant à la production de la-dite substance dans une atmosphère surchauffée, environ la moitié trouve la mort. Aucune mesure de protection contre les risques n'avait été mise en place jusqu'alors et cet évènement passe pour être à l'origine de la réglementation française de 1810 sur les établissements dangereux, insalubres et incommodes [BUREAU D'ANALYSE DES RISQUES ET POLLUTIONS INDUSTRIELS, 2006]. Les premiers textes réglementaires concernant cette fois-ci les composés eux-mêmes issus de l'industrie chimique remontent quant à eux au début du XX^{ième} siècle. En France par exemple, un texte encadre la détention et la circulation de substances définies comme "vénéneuses" dès 1916 (BOUDIA et JAS [2019]). Avec le temps, de nombreuses réflexions furent entreprises entre Etats, industriels et organisations (telles que l'Organisation Mondiale de la Santé ou la *Food and Agriculture Organisation*) afin de mettre au point des systèmes de régulations efficaces pour protéger la santé humaine (et dans une certaine mesure, l'environnement) tout en assurant une activité économique suffisante. Ces réflexions avaient principalement comme base le principe édicté par Philippus Aureolus Theophrastus Bombast von Hohenheim, dit Paracelse (1493-1541) : « *Tout est poison, rien n'est poison : c'est la dose qui fait le poison* ». La croyance qu'il existait pour chaque substance une concentration limite empêchant la survenue d'effets délétères a perduré et a été la norme pendant plusieurs siècles. Ce concept provenait principalement de l'expérience acquise pour de nombreuses substances dans le cadre, par exemple, de la médecine humaine et vétérinaire vis-à-vis de substances connues pour leurs toxicités élevées (telles que le mercure), ou encore dans le cadre de substances utilisées comme armes chimiques lors de la Seconde Guerre Mondiale et pour lesquelles la définition de seuils de toxicité était cruciale (BOUDIA et JAS [2019]). Des valeurs limites d'expositions furent ainsi mises en place pour différentes substance présentant des risques non négligeables, notamment aux Etats-Unis et en Europe, tout au long des années 50 et 60. L'universalité de ce principe ne sera remise en cause que plus tard avec notamment la découverte d'effets sans seuils, par exemple pour des composés aux effets cancérigènes.

Ces régulations ne concernaient cependant quasiment que la santé humaine et les considérations écologiques associées aux risques liés à ces substances ne furent pris en compte dans les textes réglementaires que plus tard. L'un des véritables points de départ de l'ERA correspond, en effet, à la parution du livre *Silent Spring* (CARSON [1962]). Cet ouvrage traite principalement des effets sur les espèces non cibles de pesticides de synthèses comme le [Dichlorodiphényltrichlo-](#)

roéthane (DDT) susceptibles de se bioaccumuler à l'intérieur des organismes situés à de hauts niveaux dans les réseaux trophiques. Il ne milite pas pour l'interdiction des pesticides, mais pour leur usage raisonné, l'un des arguments utilisés étant qu'un usage trop important de ces composés pourrait mener au développement d'une forme de résistance de la part des organismes cibles et donc entraîner la nécessité de toujours utiliser des concentrations plus élevées en pesticides. Quelques paragraphes en fin d'ouvrage traitent également des possibles effets délétères de l'usage trop intense de pesticides vis-à-vis de la santé humaine. Cet ouvrage a eut une forte médiatisation à sa sortie et, qu'il soit critiqué ou encensé, il a très peu laissé indifférent aux Etats-Unis. Il est depuis très souvent considéré comme l'un des livres scientifiques les plus importants du XX^{ème} siècle, comme par exemple par le magazine de vulgarisation scientifique Discover qui le mentionne dans sa liste des 25 plus grands ouvrages scientifiques de tous les temps (**DISCOVER MAGAZINE** [2006]). La décennie suivante s'ouvre en 1970 sur la création de l'**Agence américaine de Protection de l'Environnement –ou *United States Environmental Protection Agency*– (USEPA)** qui devient une référence internationale. L'écotoxicologie se désolidarise de la toxicologie pour devenir une science à part entière lors de cette période sur l'impulsion, entre autres, de chercheurs français tels que René Truhaut ou François Ramade. Aux Etats-Unis, les ONG écologistes et les industriels s'affrontent afin de faire pencher l'évaluation du risque vers leur conception de ce qu'elle devrait être : très protectrice pour les premiers, assez lâche pour permettre de générer des profits pour la seconde. C'est dans ce contexte que le Sénat étasunien fait financer une grande étude dont le but est de définir des bases solides et objectives de ce que devrait être l'évaluation du risque. Le résultat est le rapport *Risk assessment in the federal government managing the process* (**NATIONAL RESEARCH COUNCIL STAFF et collab.** [1983]), aussi appelé le *Red Book* à cause de la couleur de sa couverture [**BOUDIA et JAS**, 2019]. Ce texte pose les bases des grands principes de l'évaluation des risques telles qu'elles sont présentées dans la section 1.1.3, à savoir la définition du danger et de la potentielle exposition à ce danger afin de définir un risque probabiliste.

Du 6 au 16 juin 1972 s'est ensuite tenu le *United Nation Conference on the Human Environment* ou Sommet de la Terre à Stockholm. Ce sommet international rassemblant 132 pays a fait suite aux début des revendications écologiques amorcées dans les années 60 et témoigne du début de la prise de conscience du caractère fini des stocks de ressources naturelles à disposition ainsi que d'une critique de la pollution de l'environnement, qu'elle soit non visible directement et considérée "de fond" ou au contraire plus spectaculaire lors d'évènement plus localisés et visibles comme l'incident de Minamata au Japon où de nombreux pêcheurs et leurs familles ont été victimes de contaminations graves au mercure causées par la présence d'une usine de pétrochimie

(BOUDIA et JAS [2019]).

De nombreuses autres catastrophes environnementales causées par l'activité humaine ont largement contribué à faire évoluer les consciences sur la nécessité de mettre en place une évaluation efficace des différents types de risques afin de faciliter leur prévention. Il est possible, par exemple, de citer (d'après WIKIPÉDIA [2020]) :

- La pollution à la dioxine par l'usine de Seveso en Italie en 1976.
- L'explosion de l'usine de Bhopal en Inde en 1984 et l'épandage de 40 tonnes de pesticides en décollant.
- L'explosion de la centrale nucléaire de Tchernobyl en Ukraine en 1986.
- Les marées noires causées par les naufrages de l'Exxon Valdez en 1989 et de l'Erika en 1999.

En parallèle de ces catastrophes et au fur et à mesure que la prise de conscience des contaminations croissantes que l'humanité impose aux écosystèmes, d'autres sommets internationaux sont venus prendre le relais du Sommet de la Terre de Stockholm. On peut citer par exemple le Sommet de la Terre de Rio de Janeiro en 1992 qui a vu la naissance du mot "biodiversité" et de la Convention sur la Diversité Biologique, le protocole de Kyoto en 1997 centré sur la réduction de l'émission de gaz à effet de serre ou plus récemment la Conférence de Paris de 2015 sur les changements climatiques (COP21). Cette évolution parallèle des crises et des sommets permettant de les prendre en compte a largement contribué à forger l'ERA telle qu'elle se présente de nos jours.

Ces nouvelles réglementations n'ont cependant pas encore permis de faire disparaître ces catastrophes environnementales. Un des exemples les plus médiatisés de la dernière décennie est l'accident nucléaire de Fukushima au Japon, en 2011, qui outre les effets sur la faune et la flore locale a provoqué le décès de plus de 2000 personnes lors de l'évacuation de la zone. Plus récemment et localement, le 26 septembre 2019, la zone de stockage de l'usine de Lubrizol de Rouen connaît plusieurs explosions ainsi qu'un incendie. Si l'incident lui-même n'a pas produit de victimes, le nuage de fumées en résultant a voyagé vers le nord-est sur près de 200 kilomètres et a contaminé plusieurs zones humides ainsi que la Seine. Des conséquences plus indirectes des effets de l'activité humaine ont de plus pu mener à diverses catastrophes, notamment récemment. Les changements climatiques globaux sont par exemple en grande partie responsables des incendies de 2019 et 2020 en Australie menant à la destruction de 3 millions d'hectares de forêt. La crise sanitaire liée au virus SARS-CoV-2 en cours depuis fin 2019 est un autre exemple de grande ampleur des effets de l'activité humaine. Les phénomènes de mondialisation des échanges à tous les niveaux (e.g. économiques, culturels...) conduisent ainsi progressivement à une mondialisation

des catastrophes environnementales qui passent d'évènements localisés dûs le plus souvent à des défaillances locales à des évènements de très grande ampleur géographique, même si les évènements plus ponctuels ne disparaissent pas pour autant. La médiatisation toujours plus importante de ces évènements aide cependant à la prise de conscience des risques liés à l'activité humaine, ce qui ajoute une pression supplémentaire sur l'ERA censée évaluer et prévenir ces risques.

1.1.3 Principes de base

L'ERA est principalement basée sur le calcul, pour une substance et un écosystème donnés, du **Quotient de Risque –ou Risk Quotient– (RQ)** traduisant le risque associé à la substance sur l'écosystème considéré à partir des données liées à l'exposition et au danger de la substance :

$$RQ = PEC/PNEC \quad (1.1)$$

La **Concentration Environnementale Prédite –ou Predicted Environmental Concentration– (PEC)** traduit d'une part l'exposition de l'écosystème considéré à la substance étudiée. La **Concentration Prédite n'ayant Pas d'Effet –ou Predicted No Effect Concentration– (PNEC)** traduit d'autre part le danger lié à la substance. Si la valeur de **RQ** est inférieure à un, cela signifie que la valeur de **PEC** est inférieure à la valeur de **PNEC** et donc que la concentration prédite dans l'environnement ne dépasse pas la concentration considérée comme présentant un effet. Dans ce cas, le risque est considéré comme acceptable. Dans le cas contraire, le risque est considéré comme trop important. Il est cependant possible, avant de mettre en place des mesures de réduction de ce risque, d'effectuer de nouveaux tests écotoxicologiques, plus robustes et représentatifs des conditions environnementales et nécessitant donc des **AF** moins élevés (voir sous-section 1.1.3.2). Ces principes de base sont récapitulés dans la Figure 1.1.

1.1.3.1 Définition de la PEC

Les explications présentées dans cette section sont basées sur le travail d'**AMIARD et AMIARD-TRIQUET [2015]**. Les détails de l'estimation de la **PEC** ne seront que survolés car ils n'ont qu'un rapport secondaire avec les travaux présentés dans ce manuscrit.

1.1.3.1.a Données d'émission du composé

Il est difficile d'obtenir des données représentatives de la contamination en un composé précis d'un milieu. Cela est dû à plusieurs facteurs s'additionnant les uns aux autres. Premièrement,

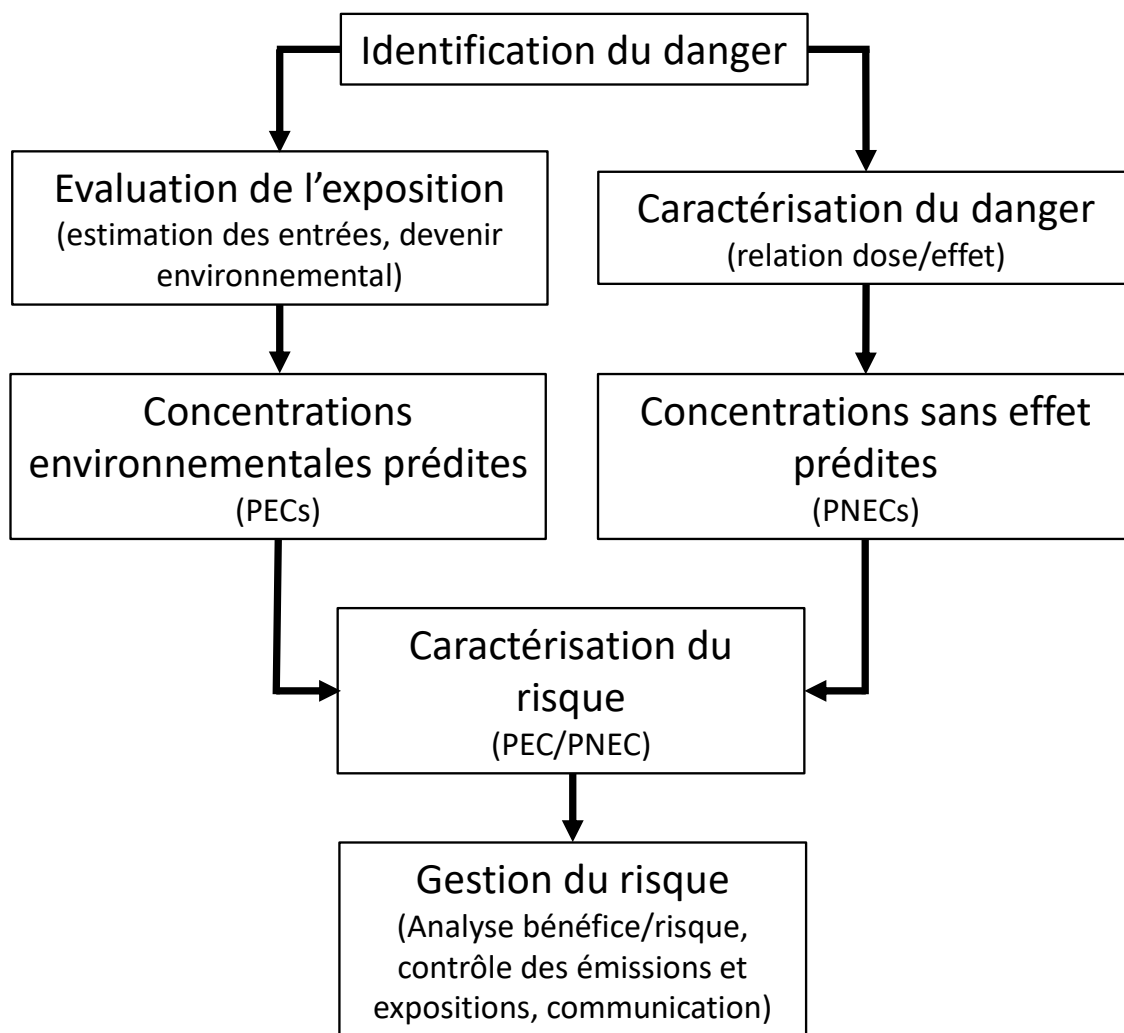


FIGURE 1.1 – Schéma des principes généraux de l'ERA modifié d'après [AMIARD et AMIARD-TRIQUET \[2015\]](#).

le niveau de contamination d'un milieu n'est pas constant, mais fluctue dans le temps. Cela est particulièrement vrai dans le cadre des milieux aquatiques, notamment des cours d'eau. Ce problème implique de devoir réaliser de nombreux prélèvements à des périodes et des heures de la journée différentes. Il peut cependant être en partie résolu grâce aux récentes avancées des capteurs passifs qui enregistrent en continu la concentration d'un ou plusieurs composés dans l'environnement. Cela requiert néanmoins qu'un capteur passif spécifique au composé étudié ait été développé, ce qui ne peut notamment pas être le cas pour les composés mis sur le marché récemment. Deuxièmement, la contamination dans un milieu peut être répartie de manière hétérogène dans l'espace. S'il est en général considéré que les milieux terrestres sont plus hétérogènes vis-à-vis de la répartition en contaminants, les courants aquatiques entraînant un brassage du milieu n'existant pas en milieux terrestres, cela est également vrai dans le cas des milieux aquatiques, le courant imposé par la topographie du milieu pouvant générer des zones de sur-concentrations en contaminants et d'autres présentant des concentrations moindres. Ce phénomène est encore amplifié par le fait que les organismes sont répartis dans différentes zones de ces environnements (colonne d'eau, sédiments...). Cela implique de multiplier les points d'observation afin d'obtenir une vision plus claire de l'exposition du milieu étudié. Troisièmement, de faibles contaminations en micropolluants peuvent être difficiles à détecter et quantifier, notamment à cause de protocoles expérimentaux encore non-optimaux comme ce peut être le cas pour certains polluants dits émergents tels que les nanoparticules, les microplastiques ou encore certains composés issus de l'industrie pharmaceutique. La présence de ces composés n'a été découverte dans les écosystèmes que récemment, même si leur usage par l'Homme ne l'est pas forcément, et ils ne sont pas encore pris en compte dans les textes réglementaires (et donc non recherchés lors des campagnes de mesure). Certains de ces composés ne possèdent d'ailleurs même pas encore d'autorisations de mise sur le marché. La modélisation des concentrations de ces composés dans l'environnement peut alors être une solution. Cette estimation est basée sur l'évaluation de l'émission nette en contaminant (prenant ainsi en compte l'élimination sur site et en station d'épuration du contaminant) dans les différents compartiments environnementaux (air, sol/sédiments, eau). Des scénarios génériques d'exposition (notamment des scénarios du "pire cas" réalistes) peuvent être appliqués lorsque les données sont manquantes. L'émission peut être déterminée au niveau local ou au niveau régional.

1.1.3.1.b Devenir du composé dans l'environnement

Une fois dans l'environnement, le composé ne reste pas de manière inerte à l'endroit où il est déposé. Il peut en effet subir un ensemble de transformations biotiques ou abiotiques dans chaque compartiment dans lesquels il est présent. Ces transformations incluent l'hydrolyse et l'oxydation dans l'eau, la photolyse dans les eaux de surface et dans l'air, la dégradation microbienne dans les eaux de surface, les sols et les sédiments et la métabolisation chez les macroorganismes. L'étude de la dégradation n'a cependant pas besoin d'être conduite dans le cas de composés inorganiques, même si dans l'absolu il serait nécessaire de connaître leur spéciation afin d'estimer leur biodisponibilité pour les organismes. Enfin, il est important d'avoir des informations sur la distribution du composé dans l'environnement après son émission. Les composés hydrophiles se retrouvent de fait principalement dans l'eau alors que les composés hydrophobes ont tendance à se répartir dans l'air, le sol, les sédiments et le biote. Des modèles permettent de prédire la répartition des composés organiques dans les différents composants de l'environnement.

1.1.3.1.c Calcul de la PEC

La PEC peut être définie au niveau local quand une seule source d'émission est reconnue, par exemple une station d'épuration. Ces estimations ponctuelles contribuent cependant à des concentrations à grande échelle, menant au calcul de PEC à l'échelle régionale. A chacune de ces échelles d'étude, la PEC est calculée pour le compartiment aquatique, le compartiment sédimentaire et le compartiment biologique. Les calculs menant à ces diverses valeurs ne seront pas détaillés ici (voir AMIARD et AMIARD-TRIQUET [2015]).

1.1.3.2 Définition de la PNEC

La PNEC (parfois également appelée Norme de Qualité Environnementale –ou *Environmental Quality Criterion*– (EQC)) est le plus souvent calculée grâce à des jeux de données issus de bioessais standardisés en concentration-réponse permettant de calculer des Concentration à Effet Critique –ou *Critical Effect Concentration*– (CEC). Les concentrations seuils ainsi obtenues sont finalement divisées par un AF, une valeur permettant de rendre la valeur cible plus protectrice afin de prendre en compte une éventuelle hausse de la toxicité du composé étudié dans des conditions environnementales non prises en compte lors de l'expérimentation (e.g. variabilité intraspécifique de la réponse, variabilité interlaboratoires ou interactions biotiques). Plus le protocole expérimental appliqué est robuste et représentatif de l'environnement étudié, plus l'AF appliqué sera proche

de la valeur de un.

En écotoxicologie, un bioessai consiste à exposer des organismes à une ou plusieurs concentrations d'un (voire plusieurs) contaminant(s) afin d'observer et de quantifier ses (leurs) effets sur une ou plusieurs caractéristiques des organismes testés. Ces caractéristiques peuvent être, par exemple, biochimiques (*e.g.* photosynthèse, luminescence, activités enzymatiques...), macroscopiques (*e.g.* la taille ou la masse de tout ou partie de l'organisme, ses capacités reproductives...), omiques (*e.g.* des mesures métabolomiques afin d'observer quelles protéines sont plus ou moins exprimées par la présence du contaminant) ou encore populationnelles (*e.g.* la biomasse d'une communauté bactérienne ou les taux de survie observés au sein d'une population). Ces caractéristiques mesurées seront appelées endpoints dans la suite de ce manuscrit.

Dans certains cadres réglementaires, le type de bioessais à réaliser pour la définition de la PNEC pour une substance peut varier en fonction de divers paramètres comme par exemple les tonnages produits du composé dans le cas d'une molécule utilisée dans l'industrie chimique. C'est le cas par exemple du règlement européen [Enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des substances chimiques –ou *Registration, Evaluation, Authorization and restriction of Chemicals*– \(REACH\)](#) et de l'US Toxic Substances Control Act où (voir [AMIARD et AMIARD-TRIQUET \[2015\]](#), d'après [TARAZONA et collab. \[2014\]](#)) :

- Pour un tonnage de 1 à 10 tonnes par an, des tests à court terme sur des invertébrés (préférentiellement des espèces du genre *Daphnia*) et d'inhibition de croissance sur des plantes aquatiques (préférentiellement des algues) sont requis.
- Pour un tonnage de 10 à 100 tonnes par an, des tests à court terme sur des poissons sont, de plus, requis.
- Pour un tonnage supérieur à 100 tonnes par an, des tests à long terme sur des invertébrés (préférentiellement des espèces du genre *Daphnia*) et poissons sont, de plus, requis.

Les bioessais appliqués sont le plus souvent des tests standardisés par divers organismes tels que l'[Organisation de Coopération et de Développement Economiques –ou *Organisation for Economic Co-operation and Development*– \(OECD\)](#). Ces tests peuvent être de plusieurs types, mais le plus souvent, il s'agit de tests monospécifiques en conditions contrôlées, qui sont donc réalisés dans des conditions peu représentatives de l'environnement mais présentent l'avantage de pouvoir être quelque peu reproductibles et d'être bien moins onéreux que des tests plus représentatifs de situations environnementales tels que les bioessais en mésocosmes par exemple.

Les résultats de ces bioessais sont ensuite utilisés afin de calculer des valeurs de CEC, utilisées

ensuite pour générer une PNEC.

1.1.4 Méthodes classiques de calcul des CEC

Une grande partie des procédures d'ERA consiste en la dérivation de CEC. Ces valeurs sont en effet des résumés statistiques des résultats de bioessais obtenus pour une espèce et une substance. Il en existe deux grand types : les CEC dont le calcul est basé sur des tests statistiques et celles dont le calcul est basé sur la modélisation de la relation concentration-réponse.

1.1.4.1 CEC basées sur des tests statistiques

Parmi les CEC encore les plus utilisées à ce jour et toujours présentes dans de nombreux textes réglementaires, on retrouve les Concentration Sans Effet Observé –ou *No Observed Effect Concentration*– (NOEC) et les Concentration Minimale avec Effets Observés –ou *Lowest Observed Effect Concentration*– (LOEC). Ces deux CEC sont basées sur les résultats d'un test statistique de comparaison de moyennes : la NOEC correspond à la concentration testée la plus élevée ne présentant pas de différence significative avec le témoin et la LOEC correspond à la concentration testée la plus faible présentant une différence significative avec le témoin. La figure 1.2 présente sous forme schématique le principe de calcul de ces deux CEC.

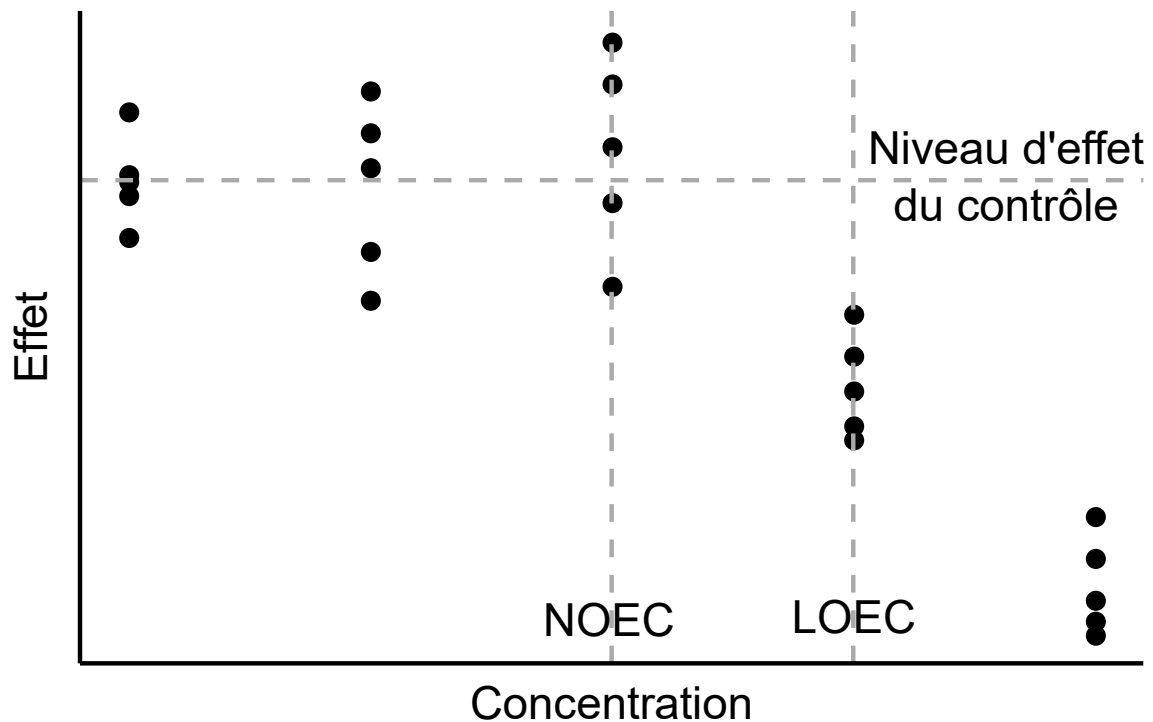


FIGURE 1.2 – Schéma de calcul de la NOEC et de la LOEC. Les points sont les effets mesurés sur les organismes pour une concentration donnée. La ligne pointillée horizontale indique le niveau d'effet du contrôle et les lignes pointillées verticales les positions de la NOEC et de la LOEC.

Ces deux valeurs, si elles présentent certains intérêts comme leur facilité de calcul, montrent cependant de nombreux désavantages (JAGER [2012]). En effet, elles sont, en premier lieu, basées sur un pré-requis statistique erroné, à savoir que le fait de ne pas avoir réussi à mettre en évidence un effet statistique ne permet pas d'affirmer qu'il n'existe pas d'effet du facteur testé (en l'occurrence, la concentration en contaminant), mais uniquement que le design expérimental n'était pas adapté ou assez rigoureux pour montrer cet effet s'il existe. De plus, ces valeurs sont extrêmement dépendantes du plan expérimental puisqu'elles correspondent à des concentrations testées et qu'elles peuvent donc se trouver éloignées de la réalité biologique si le plan expérimental n'était pas adapté au contaminant et à l'espèce utilisés.

1.1.4.2 CEC basées sur la modélisation de la relation concentration-réponse

Un autre type de CEC est celui basé sur la modélisation de la relation concentration-réponse entre l'endpoint mesuré et la concentration en contaminant à laquelle les organismes sont exposés. La Courbe Concentration-Réponse –ou *Concentration-Response Curve*– (CRC) obtenue de cette manière est le plus souvent de forme sigmoïde et est en général modélisée par une relation log-logistique (également appelée modèle de Hill) dont l'équation est la suivante :

$$f(x) = c + \frac{d - c}{1 + \exp(b(\ln(x) - \ln(e)))} \quad (1.2)$$

où x est la concentration du contaminant étudié, c et d sont respectivement le niveau des asymptotes horizontales haute et basse du modèle, e est le point d'inflexion de la courbe et b est un paramètre de forme proportionnel à l'inverse de la pente. D'autres types de modèles sont également utilisables afin de modéliser une relation de forme sigmoïde tels le modèle log-probit dont l'équation est la suivante :

$$f(x) = d - \Delta dc * \Phi\left(\frac{\ln(x/e)}{b}\right) \quad (1.3)$$

où x est la concentration du contaminant étudié, d est la valeur de l'asymptote du modèle pour de faibles concentrations, Δdc est la différence entre les deux asymptotes du modèle, e est le point d'inflexion de la courbe et b est un paramètre de forme. Plus précisément, b correspond à l'écart-type de la loi Gaussienne en échelle logarithmique des concentrations dont Φ est la fonction de distribution cumulée. Au lieu d'être exprimée par d et Δdc , le modèle log-probit peut également être exprimé avec d et c comme l'exemple donné du modèle log-logistique, tout comme ce dernier

peut être également exprimé avec d et Δdc .

La forme sigmoïde n'est cependant pas la seule que peut prendre une CRC. En effet, cette forme de courbe implique un certain nombre d'hypothèses *a priori* qui ne sont pas forcément vraies pour toutes les relations concentration-réponse : (1) le contaminant modifie toujours la valeur de l'endpoint dans la même direction, quelle que soit sa concentration (la courbe obtenue est monotone), (2) le contaminant ne modifie que très peu la valeur de l'endpoint à de très faibles concentrations et finit par atteindre un point au-delà duquel la concentration en contaminant n'a quasiment plus d'effet sur la valeur de l'endpoint mesuré (la courbe obtenue présente des asymptotes horizontales à gauche et à droite), (3) la dynamique de réponse de l'endpoint au contaminant est la même de part et d'autre de l'EC₅₀ (la courbe présente une symétrie au niveau de son point d'inflexion). Ces différents points peuvent en effet ne pas se révéler vrais dans tous les cas. Le point (1) peut par exemple se révéler erroné dans le cas d'espèces présentant une réaction d'hormèse. Ce phénomène, dont il est supposé qu'il est universel et qui a notamment été observé pour un nombre conséquent de plantes, consiste pour l'organisme à activer ses mécanismes de défense contre le contaminant alors qu'il n'est pas présent en quantité assez importante pour causer un effet observable [CALABRESE, 2008]. Cela se traduit par l'observation d'un effet de l'ordre de 30 à 60% en moyenne et de direction inverse à celui normalement provoqué par le contaminant [CALABRESE, 2008]. Par exemple, si un herbicide est censé faire baisser la masse sèche des parties aérienne d'une plante, on observera, dans le cas d'un phénomène d'hormèse, une augmentation de la masse sèche des parties aériennes de la plante pour de très faibles concentrations en contaminant avant d'observer la baisse attendue à des concentrations plus fortes. Le point (2) peut, pour sa part, se révéler faux dans des cas où un effet important est observable à des concentrations testées très faibles. C'est également le cas lorsqu'une relation linéaire est observable entre la concentration en contaminant et la valeur de l'endpoint mesuré. Le point (3) peut se révéler faux dans des cas où, par exemple, la valeur de l'endpoint est très fortement affectée à de faibles concentrations du contaminant étudié, mais où cet effet est de moins en moins marqué avec l'augmentation de la concentration en contaminant. Si ces effets sont relativement peu fréquents dans le cadre de bioessais observant des caractères macroscopiques où les courbes sigmoïdes sont adaptées le plus souvent, ce n'est pas le cas quand les endpoints choisis sont plus atypiques comme dans le cas de mesures omiques. Par exemple, dans le cadre de mesures transcriptomiques au sein d'un plan expérimental en concentration-réponse, LARRAS et collab. [2018] ont mis en place un procédure permettant, pour chacune des 61 535 probes (dont 18 562 probes indépendantes), de sélectionner automatiquement, à l'aide de valeurs calculées de Critère d'Infor-

mation d'Akaike –ou *Akaike Information Criterion*– (AIC), le modèle le plus approprié pour décrire la relation concentration-réponse observée. Cinq modèles ont été testés, le modèle de Hill, présenté précédemment, un modèle linéaire ne présentant pas d'asymptotes, un modèle exponentiel présentant une seule asymptote (pour de faibles ou de fortes concentrations) ainsi qu'un modèle Gauss-probit et un log-Gauss-probit. Ces derniers sont des modèles non-monotones permettant de décrire les effets d'hormèse. Le modèle log-probit est d'ailleurs un cas particulier du modèle log-Gauss-probit. Ces cinq modèles peuvent chacun présenter 2 à 4 allures différentes, menant à 12 situations possibles. Ces situations sont présentées dans la Figure 1.3. La procédure de choix du modèle a donné les résultats suivants : 29,3% des CRC ont été modélisées avec un modèle Gauss-probit, 28,1% avec un modèle exponentiel, 26,5% avec un modèle linéaire, 14,6% avec un modèle log-Gauss-probit et 1,5% seulement avec un modèle de Hill. La forme sigmoïde pure, qui est la norme dans le cadre d'observations macroscopiques, devient ainsi largement marginale lorsque l'échelle d'étude change vers des mesures de transcriptomique.

La modélisation d'une CRC permet de prédire le niveau de réponse du caractère mesuré en fonction de la concentration en contaminant. Cette relation permet ainsi de calculer plusieurs types de CEC dont quelques exemples sont présentés au sein des sous sections suivantes. La Figure 1.4 présente les procédures de calcul de ces CEC. Ces différentes CEC sont toutes basées sur le même principe : une valeur du caractère mesuré est considérée comme étant impactée par rapport au contrôle grâce à l'information contenue dans la courbe dose réponse modélisée. Cette valeur sera par la suite notée valeur affectée (VA). La valeur de CEC correspond ensuite à la concentration pour laquelle le modèle prend la valeur de la VA.

1.1.4.2.a L'EC_x

La *Concentration présentant x pourcent d'effet* –ou *x percent Effective Concentration*– (EC_x) (ce terme sera utilisé de manière générique dans ce manuscrit, même dans des cas où l'endpoint mesuré est un taux de mortalité et où le terme serait normalement LC_x pour *x percent Lethal Concentration*) est une CEC de plus en plus utilisée depuis une vingtaine d'années, que ce soit en ERA ou dans la production scientifique. Sa VA correspond à un effet observé de x% entre les asymptotes horizontales pour de très faibles et de très fortes concentrations. Un exemple de calcul d'EC₅₀ est présent en sous Figure 1.4a. Le calcul de l'EC₅₀ est le plus répandu pour les bioessais basés sur des expositions aiguës alors que l'EC₁₀ est souvent utilisée dans le cadres d'expositions chroniques. Par ailleurs, il est à noter que, par analogie avec les CEC basés sur des tests statistiques présentées précédemment, les NOEC calculées dans la littérature scientifique correspondent en moyenne à

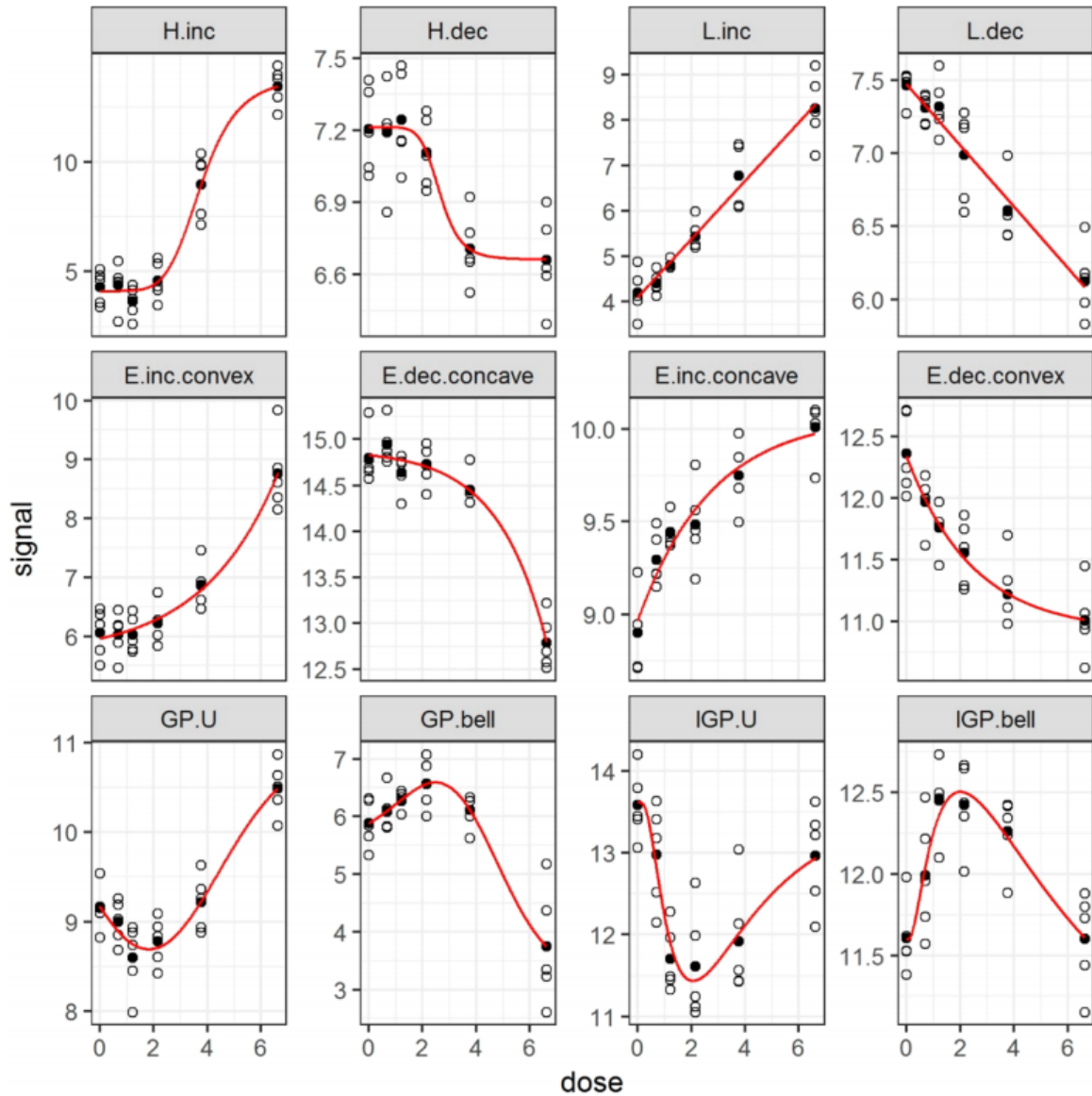


FIGURE 1.3 – Figure présentant les diverses formes de modèle de concentration-réponse pouvant être appliquées par l’outil de modélisation dose-réponse pour données omiques DRomics (extraite depuis [LARRAS et collab. \[2018\]](#)). Pour chaque étiquette de sous graphique, la première partie correspond au modèle utilisé et la seconde à la forme de ce modèle visible sur le graphique. Pour le modèle, H correspond au modèle de Hill, L au modèle linéaire, E au modèle exponentiel, GP au modèle Gauss-probit et IGP au modèle log-Gauss-probit. Pour la forme, inc correspond à une forme croissant, dec à une forme décroissant, convex à une forme convexe, concave à une forme concave, U à une forme en U et bell à une forme en cloche.

des effets équivalents à des EC_x compris entre des EC_{10} et des EC_{34} [CRANE et NEWMAN, 2000]. Le calcul d' EC_x est aisé dans le cas d'une courbe sigmoïde, les deux valeurs extrêmes de la courbe nécessaires à son calcul correspondant aux deux asymptotes du modèle, mais compte tenu de sa définition par rapport aux asymptotes, ce calcul est impossible lorsque la relation concentration-réponse doit être décrite par d'autres formes de modèles, en particulier pour celles ne présentant pas d'asymptotes horizontales pour des hautes concentrations (par exemple dans le cas d'un modèle exponentiel). Dans ce types de cas, il est nécessaire de calculer des alternatives à l' EC_x dont voici deux exemples.

1.1.4.2.b L' IC_x

La *Concentration d'Inhibition de x pourcent –ou x percent Inhibition Concentration–* (IC_x) est effectivement calculable quelle que soit la forme du modèle appliqué pour décrire la relation concentration-réponse entre le caractère étudié et la concentration appliquée en contaminant. Sa VA correspond simplement à une variation de $\pm x\%$ de la valeur de l'endpoint par rapport à la valeur du modèle au contrôle. Un exemple de calcul d' IC_{50} est présent en sous Figure 1.4b. Cette CEC est ainsi calculable, quelle que soit la forme du modèle utilisé pour modéliser la relation concentration-réponse. Cette CEC, bien qu'elle soit calculable dans des cas où l' EC_x ne l'est pas, présente quelques désavantages. En effet, puisque sa méthode de calcul ne prend en compte que la valeur de départ de la CRC et pas l'amplitude totale de la réponse observée, elle est fortement soumise à la valeur du paramètre au contrôle : si la valeur du contrôle est élevée par rapport à l'amplitude totale de la réponse, l' IC_x aura tendance à être élevée alors qu'elle le sera beaucoup moins dans le cas où la valeur du contrôle est faible par rapport à l'amplitude totale de la réponse. De plus, si l' IC_x est calculée pour des modèles présentant une asymptote horizontale pour des concentrations élevées en contaminants, elle peut ne pas être calculable dans certains cas. En effet, si la valeur de la réponse modifiée de $\pm x\%$ est située au-delà de cette asymptote horizontale à droite, le modèle ne pourra jamais l'atteindre et il sera ainsi impossible de calculer l' IC_x associée. L' IC_x est également parfois appelée $BMD_{x\text{-fold}}$ [EFSA SCIENTIFIC COMMITTEE et collab., 2017], il est ainsi important de ne pas la confondre avec la CEC présentée dans la sous-section suivante.

1.1.4.2.c La BMD_{zsd}

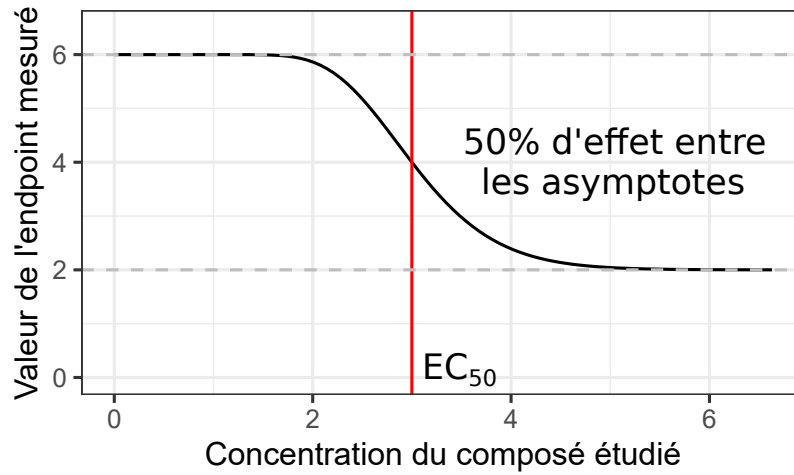
La *Dose Seuil associée à une variation de z fois l'écart-type –ou Benchmark Dose associated to a z times standard deviation variation–* (BMD_{zsd}) est une autre CEC calculable. Elle a été au départ développée et utilisée dans le champ disciplinaire de la toxicologie, mais peut se révéler

également très utile en écotoxicologie. Son usage a d'ailleurs été recommandé par l'**EFSA SCIENTIFIC COMMITTEE et collab. [2017]**. Elle reste cependant à ce jour très rarement utilisée dans les procédures d'**ERA**. Son principe de calcul est très proche de celle de l'**IC_x**. Cependant, au lieu de correspondre à la valeur correspondant au contrôle modifié de $\pm x\%$, sa VA (appelée BMR pour *Benchmark Response*) consiste en la valeur prédite par le modèle égale au contrôle $\pm z \cdot sd$, sd étant égal à l'écart-type résiduel de la **CRC**. Un exemple de calcul de BMD_{1sd} est présent en sous Figure 1.4c. La valeur de z conseillée par l'**EFSA SCIENTIFIC COMMITTEE et collab. [2017]** est de 1. La valeur de 2 présente, pour sa part, l'avantage de représenter la concentration pour laquelle la valeur prédite est égale à l'une des bornes de l'intervalle de variabilité du contrôle (celui-ci étant égale à la valeur du contrôle $\pm 2 \cdot sd$). Cette **CEC** présente l'avantage, comparée à l'**IC_x**, d'être bien moins dépendante de la valeur absolue du contrôle par rapport à l'amplitude de la réponse. De plus, cette **CEC** prend en compte l'incertitude associée aux données (si l'écart-type utilisé est celui associé aux données) ou celle associée directement à la **CRC** utilisée pour décrire les données (si l'écart-type utilisé est celui associé au modèle). Cependant, cette **CEC** présente le même problème que l'**IC_x**, à savoir qu'elle ne peut pas être calculée dans certains cas, ici les cas où l'écart-type résiduel de la **CRC** est trop élevé et que la valeur de contrôle $\pm z \cdot sd$ se situe au-delà de l'amplitude entre asymptotes du modèle.

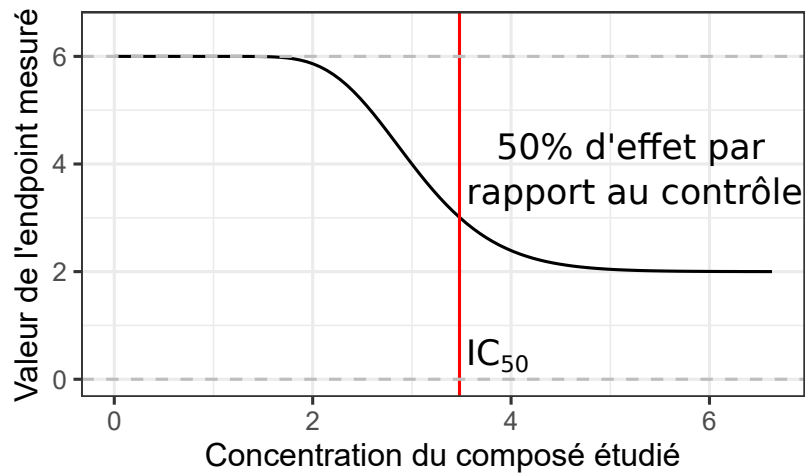
Les quatre types de **CEC** présentés dans cette section ont cependant tous le même problème majeur : ils ne sont représentatifs que des conditions dans lesquelles les expérimentations ont été menées (pH, température, durée d'exposition...). Les résultats ainsi obtenus peuvent de fait difficilement être extrapolés à d'autres conditions et il est ainsi nécessaire de répliquer ces expérimentations afin d'obtenir des informations sur l'effet de ces conditions expérimentales ou de compenser cette méconnaissance par l'usage d'un **AF** élevé. Afin de rendre les résultats de l'**ERA** plus protectrices, il est également possible de ne pas considérer l'estimation ponctuelle des valeurs de **CEC**, mais la borne inférieure de leur intervalle de confiance (le plus souvent à 90 ou 95%, **AMIARD et AMIARD-TRIQUET [2015]**).

1.1.5 Les quatre *tiers*

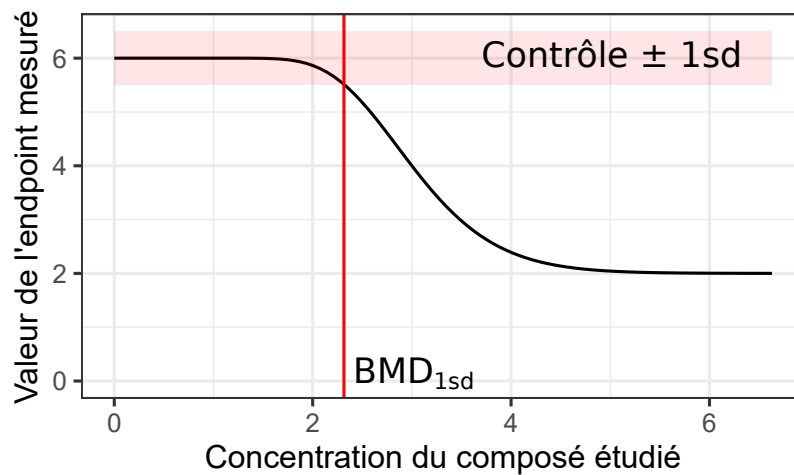
Toutes les méthodes utilisées dans le cadre de l'**ERA** ne présentent en effet pas le même niveau de représentativité écologique. Dans un cas théorique parfait, les méthodes les plus qualitatives et représentatives de l'environnement seraient toujours utilisées afin d'obtenir une information la plus complète et précise possible sur le risque associé à une substance. Cependant, la réalité impose des contraintes techniques et économiques faisant que cela est rarement possible. Les quatre



(a) Schéma explicatif du calcul de l' EC_x . La valeur de 50 a été choisie pour x dans cet exemple.



(b) Schéma explicatif du calcul de l' IC_x . La valeur de 50 a été choisie pour x dans cet exemple.



(c) Schéma explicatif du calcul de la BMD_{zsd} . La valeur de 1 a été choisie pour z dans cet exemple.

FIGURE 1.4 – Schéma de calcul des trois CEC présentés basées sur la modélisation de la relation concentration-réponse.

tiers (qui ne correspondent pas à un total d'environ 133% mais au mot anglais signifiant "paliers" ou "échelons") sont là pour faire face à cette réalité. Ils consistent en un classement des méthodes d'ERA, les méthodes appartenant à des *tiers* plus élevés utilisant des données plus représentatives de l'environnement, mais étant en contrepartie associées à des AF moins protecteurs. Les principes généraux de l'approche par *tiers* sont les suivant, d'après AAGAARD et collab. [2013] :

- Les *tiers* inférieurs sont moins conservateurs que les *tiers* supérieurs.
- Les *tiers* supérieurs visent à être plus réalistes que les *tiers* inférieurs.
- Les *tiers* inférieurs requièrent généralement moins d'efforts que les *tiers* supérieurs.
- Dans chaque *tier*, toute l'information scientifique pertinente est utilisée.
- Tous les *tiers* visent à atteindre le même niveau de protection.

La philosophie derrière cette hiérarchisation des méthodes est de pouvoir obtenir un résultat assez fiable et protecteur pour être appliqué tout en rationalisant les coûts. Par exemple, lors de l'application des protocoles d'ERA pour une nouvelle substance, le principe est d'appliquer une méthode de *tier* 1, facile et peu coûteuse à réaliser mais peu représentative de l'environnement. Si le risque caractérisé pour cette substance avec cette méthode est trop élevé, il est possible, avant de mettre en place des mesures de réduction de ce risque, de réaliser de nouvelles mesures d'évaluation du risque en utilisant une méthode de *tier* 2. Cette méthode sera plus coûteuse à réaliser, mais plus représentative de l'environnement, ce qui est censé mener à une évaluation plus fiable du risque associé à la substance étudiée. La Figure 1.5 résume ces principes et montre quels types de données sont associés à quel *tier*.

Le **premier *tier*** consiste en l'utilisation directe de données acquises via bioessais monospécifiques au design expérimental simple en laboratoire. L'une des méthodes possibles est d'obtenir trois valeurs de CEC pour les trois niveaux trophiques classiquement considérés en eau douce, une pour un producteur primaire (le plus souvent *Lemna minor*), une pour un consommateur primaire (le plus souvent *Daphnia magna* et une pour un consommateur secondaire (le plus souvent *Danio rerio*) et de conserver la valeur la plus basse des trois. Cette CEC est ensuite divisée par un AF très élevé, 1000 dans ce cas (voir Tableau 1.1).

Le **deuxième *tier*** est basé sur la réutilisation de données de *tier* 1 et leur modélisation afin d'aider à extrapoler les résultats par exemple à d'autres espèces ou d'autres conditions environnementales. Par exemple, la modélisation de SSD ou les modèles de Toxicocinétique-toxicodynamique –ou Toxicokinetic-toxicodynamic– (TK-TD) sont des méthodes de *tier* 2. Les AF appliqués sur les résultats de ces méthodes afin d'obtenir des PNEC sont bien plus bas que ceux appliqués pour

les méthodes de *tier* 1. Par exemple, l'AF appliqué aux résultats d'un SSD est généralement compris entre 1 et 5 en fonction de la qualité et de la représentativité des données utilisées pour le construire (Tableau 1.1).

Le **troisième tier** est basé sur la production et l'utilisation de données de bioessais en laboratoire plus complexes et représentatives de l'environnement que celles produites pour le *tier* 1. Ce sont typiquement des expérimentations à l'échelle de la population ou de la communauté, telles des expérimentations en mésocosmes. Les modèles d'écosystèmes entrent également dans ce *tier*. Pour ces méthodes, les valeurs d'AF ne sont pas imposées par les textes réglementaires, mais sont définies au cas par cas en fonction de la représentativité environnementale des expérimentations effectuées et des données utilisées.

Les méthodes du **quatrième tier** sont les plus représentatives de l'environnement. On retrouve parmi elles les études de terrain qui sont les plus représentatives possibles puisque basées sur de réels écosystèmes, ainsi que des modèles à l'échelle du paysage qui intègrent donc différents types d'écosystèmes. Comme pour le *tier* 3, les AF appliqués aux méthodes de *tier* 4 sont définis au cas par cas en fonction de la représentativité environnementale des expérimentations effectuées et des données utilisées.

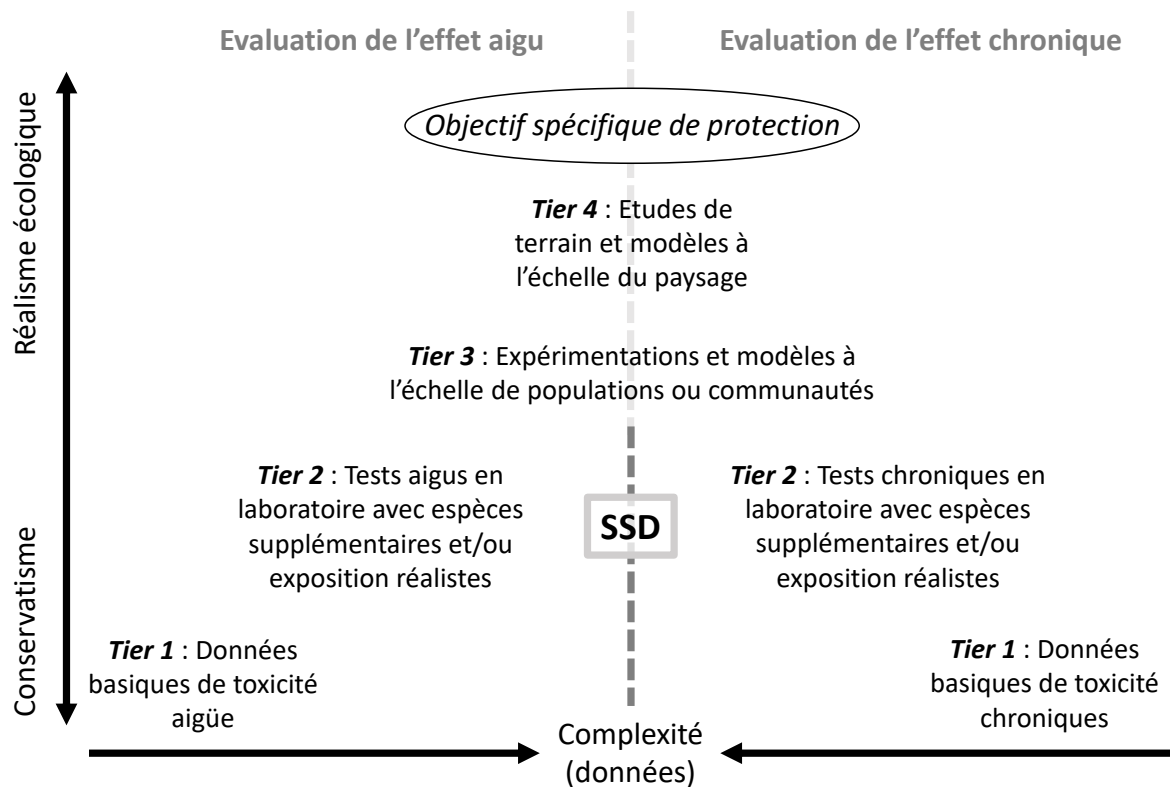


FIGURE 1.5 – Schéma de présentation du principe des quatre tiers utilisés en ERA et des types de données associés à chacun. Figure modifiée d'après [AAGAARD et collab. \[2013\]](#).

TABLEAU 1.1 – Tableau des valeurs d'AF appliquées pour diverses méthodes d'ERA afin d'obtenir des PNEC dans le cas d'une évaluation du risque en milieu dulcicole. Tableau modifié d'après AMIARD et AMIARD-TRIQUET [2015]

Données disponibles	AF
Au moins une valeur d'EC ₅₀ à court terme sur chacun des trois niveaux trophiques basiques (poisson, daphnie et algue)	1.000
Une NOEC à long terme (poisson ou daphnie)	500
Deux NOEC à long terme d'espèces représentant deux niveaux trophiques (poisson et/ou daphnie et/ou algue)	50
Trois NOEC à long terme sur trois espèces représentant trois niveaux trophiques (normalement poisson, daphnie et algue)	10
Méthode de distribution de sensibilité des espèces (SSD)	1-5
Données de terrain ou modèle d'écosystème	Défini au cas par cas

1.2 Les Distributions de Sensibilité des Espèces

1.2.1 Concept

Les écosystèmes naturels sont caractérisés par une diversité biologique que l'on peut caractériser à différentes échelles. Au sein d'un écosystème, on s'intéressera notamment à la diversité génétique au sein d'une population, et à la diversité spécifique au sein d'une communauté. Au niveau des espèces, cette diversité se traduit par des différences de fonctions, de traits et donc de sensibilité à divers contaminants, signifiant que pour un contaminant à une concentration donnée, diverses espèces pourront présenter des niveaux de réponse différents. Les SSD sont basés sur l'étude de cette diversité interspécifique de tolérance chimique tout en n'essayant cependant pas de l'expliquer. Les SSD sont une méthode d'ERA de tier 2 basés sur la modélisation de données écotoxicologiques de tier 1 pour plusieurs espèces. Ils consistent en la modélisation, pour un contaminant donné, de la distribution des CEC obtenues pour plusieurs espèces. Cette distribution permet d'extrapoler la sensibilité d'espèces théoriques non testées et ainsi d'estimer la concentration du composé d'intérêt à ne pas dépasser afin de protéger un haut pourcentage des espèces présentes. Ce pourcentage d'espèces non protégées est souvent fixé à 5% et la concentration n'impactant que ce pourcentage d'espèces "sacrifiables" est notée HC₅. Le calcul de cette valeur d'HC₅ correspond à l'approche dite "inverse" par opposition à l'approche dite "forward". L'approche "forward" consiste quant à elle à calculer la Fraction Potentiellement Affectée –ou Potentially Affected Fraction– (PAF), c'est à dire le pourcentage des espèces qui vont être affectées, à une concentration en contaminant donnée, par exemple celle mesurée dans l'environnement (POSTHUMA et collab. [2001]).

L'hypothèse principale sous-jacente au concept de SSD est le fait que les données écotoxicologiques disponibles sont le résultat d'un échantillonnage réalisé au sein de la distribution véritable

(et inaccessible de manière directe) de sensibilité des espèces. L'objectif est ainsi de produire une estimation de cette distribution afin d'avoir un aperçu de la répartition totale de sensibilité des espèces et donc de pouvoir protéger un grand nombre de ces espèces.

1.2.2 Historique

Les SSD ont été en premier lieu proposés afin d'estimer des critères de qualité environnementale entre la fin des années 70 et les années 80 comme par KOOIJMAN [1987], à la fois en Europe et aux Etats-Unis (POSTHUMA et collab. [2001]). L'évolution de l'outil s'est ainsi effectuée en parallèle entre ces deux continents. Alors que l'usage des SSD s'est progressivement étendu en écotoxicologie, des discussions intensives ont pris place dans les années 90 afin d'en évaluer divers points tels que les hypothèses *a priori*, les limitations liées aux données (*e.g.* nombre d'espèces à inclure, utilisation de données chroniques estimées à partir de données aiguës...) ou de manière plus générale, leurs modalités d'application (par exemple, ALDENBERG et SLOB [1993]).

En 1978 aux Etats-Unis, à la suite des réflexions initiées par le "Red Book", une méthode statistique permettant de protéger 95% des espèces d'une population est intégrée à la réglementation américaine *via* l'USEPA (POSTHUMA et collab. [2001]). Deux valeurs finales sont utilisées à partir des SSD produits : (1) la valeur finale aiguë correspondant à une HC₅ produite *via* une SSD construite à partir d'EC₅₀, puis divisée par deux afin de prendre en compte des effets inférieurs à 50% sur les organismes et (2) la valeur finale chronique qui correspond à une HC₅ dérivée à partir de données d'exposition chroniques si elles sont disponibles en assez grand nombre ou obtenue en appliquant un facteur aigu-vers-chronique à une HC₅ obtenue à partir de données aiguës (DUBOUDIN et collab. [2004]). L'USEPA a par la suite continué à inclure les SSD dans les textes de régulations relatifs à la définition d'EQC dont elle était à l'origine. Les méthodes de production d'EQC *via* l'utilisation de SSD n'ont cependant pas évolué depuis 1985, principalement car les fonds dont dispose l'USEPA ont été alloués au développement de nouvelles méthodes d'évaluation comme celles basées sur l'étude des communautés aquatiques présentes dans un écosystème afin d'en évaluer le degré de perturbation (POSTHUMA et collab. [2001]). Un point intéressant est cependant que les Etats-Unis, au contraire de l'Europe, ne possèdent pas de réglementation concernant le calcul d'EQC pour les sols. Ceci est imputable au manque d'intérêt des organisations environnementales sur le sujet comparé à celui de la contamination des masses d'eau. L'évaluation de la contamination des sols s'est de plus majoritairement faite *via* de l'évaluation du risque sur des sites spécifiques et non sur des critères nationaux (POSTHUMA et collab. [2001]).

1.2.3 L'AF pour les SSD : qu'est-il censé prendre en compte ?

De par la manière dont ils sont construits, les SSD impliquent un certain nombre d'hypothèses considérées *a priori* comme acceptables. Ils incluent également, par extension, toutes les hypothèses *a priori* inhérentes aux CEC utilisées et à l'éotoxicologie en général. La plus fondamentale d'entre elles est le fait que les bioessais monospécifiques réalisés en laboratoire sont considérés comme apportant une information utile et représentative de ce qui peut être observé dans l'environnement pour la protection des communautés. FORBES et CALOW [2002] listent deux types d'hypothèses *a priori* induites par l'utilisation des SSD, celles liées à la théorie sous-jacente aux SSD et celles liées à la manière dont les SSD sont appliqués. Les hypothèses listées liées à la théorie sont les suivantes :

- **T1.** Les interactions entre espèces n'influencent pas les distributions de sensibilité.
- **T2.** Toutes les espèces ont le même poids, sous-entendu que la perte d'une espèce a le même effet sur l'environnement que la perte d'une autre.
- **T3.** La structure de la communauté est le point important.

Les hypothèses listées liées à l'application sont, quant à elles, les suivantes :

- **P1.** L'échantillon d'espèces utilisé pour produire la SSD est un échantillon non biaisé du groupe d'espèces visé pour lesquelles on souhaite tirer des conclusions.
- **P2.** L'endpoint utilisé est représentatif d'un point de vue écologique.
- **P3.** Le niveau de protection choisi est approprié (par exemple, avec le choix d'utiliser des EC₁₀ plutôt que des EC₅₀ dans le cadre d'un écosystème perçu comme plus fragile).
- **P4.** Le niveau d'intervalle de confiance choisi autour de la valeur d'HC₅ est approprié.
- **P5.** La forme de la distribution est adaptée aux données.
- **P6.** Le nombre d'espèces utilisé pour modéliser la SSD est adapté.

L'AF est censé compenser les possibles inconsistances écologiques inhérentes aux méthodes utilisées et ainsi rendre les résultats des méthodes d'ERA plus protectrices. Pour rappel, un AF correspond à une valeur chiffrée venant diviser les résultats de la procédure choisie d'ERA afin d'obtenir la PNEC (Tableau 1.1). L'AF est censé compenser des phénomènes divers tels que les éventuelles hypothèses *a priori* listées ci-dessus qui pourraient ne pas se trouver vérifiées. D'autres hypothèses *a priori* peuvent être formulées vis-à-vis des SSD et ainsi être prises en compte par l'AF si elles n'étaient pas vérifiées. En voici quelques exemples :

- La valeur de CEC utilisée pour chaque espèce est représentative de la sensibilité réelle associée à l'espèce en question.
- La valeur de sensibilité représentative d'une espèce ne varie pas d'une population à une autre.
- La sensibilité d'une espèce ne varie pas en fonction des conditions environnementales (pH, température, quantité de nutriments présents...).
- La valeur de CEC calculée pour une espèce ne varie pas d'un laboratoire à un autre et au sein d'un même laboratoire.

Nombre de ces hypothèses peuvent ne pas être vérifiées. Par exemple, ROUBEAU DUMONT et collab. [2019] a montré que les CEC calculées peuvent changer d'une population à une autre pour des macrophytes exposés à du cuivre, WATSON-LEUNG et collab. [2016] qu'une variabilité intralaboratoire pouvait être observée dans la mesure de bioaccumulation d'arsenic chez *Hexagenia spp* et PEREIRA et collab. [2017] a montré qu'une variation de CEC chroniques pouvait être observée en fonction de la température du milieu lors de l'exposition de *Daphnia magna* à des métaux. Il est ainsi nécessaire de choisir avec soin la valeur d'AF à appliquer à une HC₅ afin d'obtenir une PNEC intégrant l'ensemble de ces incertitudes. Comme indiqué dans le Tableau 1.1, les valeurs d'AF utilisées dans la réglementation européenne sont comprises entre 1 et 5 pour les SSD réalisés sur des espèces dulcicoles. Cette valeur est définie en fonction de la qualité et de la représentativité de la SSD construite et doit être choisie selon plusieurs critères (d'après AMIARD et AMIARD-TRIQUET [2015]) :

- La qualité des données utilisées par rapport au mode d'exposition (bioessais aigus ou chroniques, en mésocosmes ou sur le terrain...).
- Les modèles biologiques testés (représentativité des groupes taxonomiques, stratégies de nourrissage et niveaux trophiques, sensibilité des stades de vie testés, adéquation avec le mode d'action du contaminant.)
- La qualité de l'ajustement de la SSD ou la taille de l'intervalle de confiance autour de l'HC₅.

Ces hypothèses *a priori*, qu'elles soient validées ou non, conditionnent en partie les modalités d'application des SSD. Il est cependant à noter que le sens de l'effet de ces différents facteurs sur les HC₅ ne peut pas toujours être estimé *a priori* et que ceci peut notamment résulter en de potentielles compensations entre facteurs ayant des effets de sens différent sur l'HC₅. L'ERA se doit cependant d'envisager les pires scénarios possibles, impliquant ainsi de considérer que tous

ces facteurs pourraient potentiellement entraîner une baisse de la valeur réelle d' HC_5 lorsqu'ils sont pris en compte. Certains de ces facteurs sont présentés dans la section suivante.

1.2.4 Méthodologie des SSD

Comme indiqué précédemment, un SSD consiste en la concaténation et la modélisation de la distribution de CEC pour plusieurs espèces pour un contaminant donné. La SSD est ensuite visualisée sous la forme d'une fonction de distribution cumulée. Un exemple de SSD extrait du livre de **POSTHUMA et collab. [2001]** est présenté en Figure 1.6. Plusieurs éléments sont ainsi importants à prendre en compte. Un ensemble de choix méthodologiques peuvent en effet modifier de manière visible les résultats du processus de modélisation et donc avoir un effet notable sur l'ERA où les valeurs finales seront utilisées.

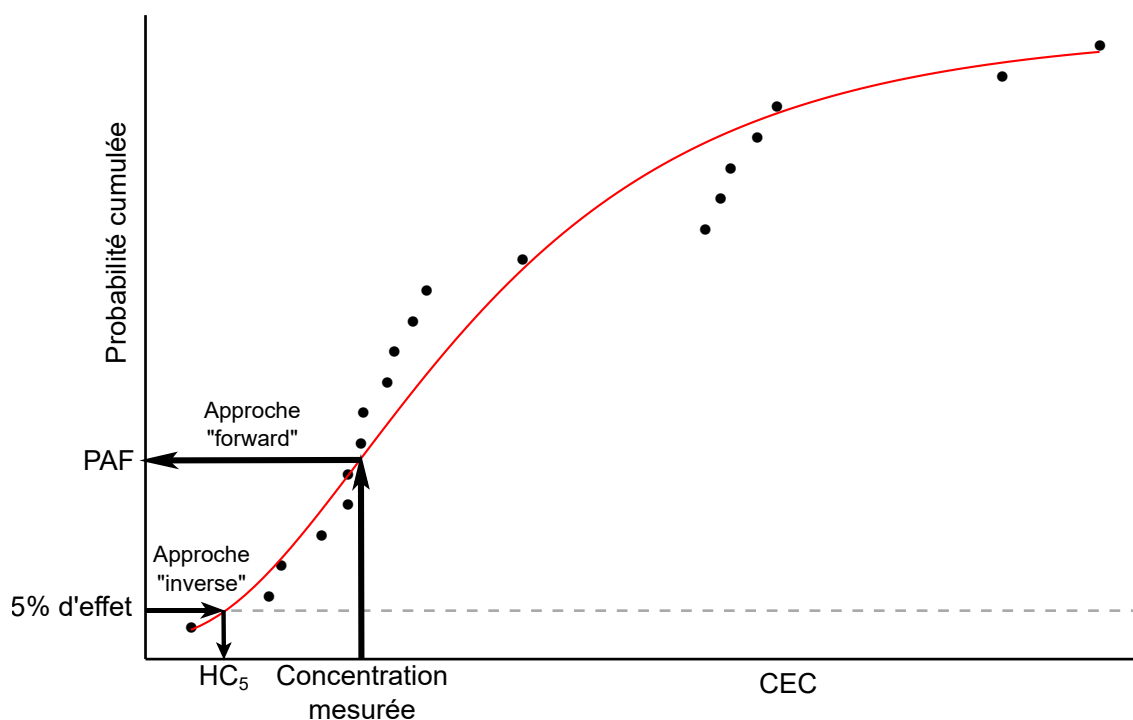


FIGURE 1.6 – Exemple de SSD sous la forme d'une fonction de distribution cumulée et illustration des approches "forward" et "inverse" permettant respectivement de calculer une HC_5 et une PAF.

1.2.4.1 Choix des données à utiliser

En premier lieu, le choix des données à utiliser est important. En effet, puisque les données utilisées sont la plupart du temps issues de sources différentes, il est nécessaire d'assurer un minimum de cohérence dans le jeu de données final.

Premièrement, les SSD sont habituellement construits à partir de données issues de bioessais

chroniques. Lorsque ces données ne sont pas disponibles en assez grand nombre, il est possible de les inférer en appliquant à des données issues de bioessais aigus un facteur de conversion aigu-vers-chronique. Comme toute extrapolation, cela implique cependant des risques et les données utilisées doivent être de bonne qualité (notamment en présentant un intervalle de confiance réduit autour de la CEC estimée). De plus, ces facteurs de conversion ne sont pas disponibles pour tous les composés et leur qualité dépend des données disponibles pour le composé en question, ce qui augmente encore les risques associés à ces méthodes [AHLERS et collab. \[2006\]](#).

Lorsque les données sont extraites depuis des bases de données, comme cela est le plus souvent effectué lors des procédures d'évaluation du risque, il n'est souvent pas possible d'avoir un accès direct aux données brutes, mais uniquement aux CEC calculées. Le type de CEC calculé est ainsi important, puisqu'il est nécessaire d'avoir le même type de CEC pour toutes les espèces afin de pouvoir en modéliser la distribution. De nombreux textes réglementaires préconisent toujours l'utilisation de NOEC afin de modéliser des SSD, mais de plus en plus d'entre eux proposent également d'utiliser des EC_x , notamment des EC_{10} et des EC_{50} . Cependant, pour certaines substances, notamment celles mises sur le marché récemment, les données disponibles peuvent être peu nombreuses et il peut être compliqué d'obtenir un jeu de données homogène au niveau du type de CEC. Si d'autres informations sont disponibles, telles que par exemple les paramètres des CRC modélisées, il peut parfois être possible d'inférer des valeurs d' EC_{10} à partir de valeurs d' EC_{50} . Certains travaux, tels que par exemple [AURISANO et collab. \[2019\]](#) considèrent pour leur part que les EC_{10} sont équivalents à des NOEC (ce cas ne traite cependant pas de SSD, mais de facteurs d'extrapolation aigu-vers-chronique). Le choix du type de CEC pourrait cependant avoir un impact limité sur les résultats des SSD, les résultats des SSD produits avec des NOEC et des EC_{10} pouvant s'avérer proches [\[IWASAKI et collab., 2015\]](#). Ceci reste cependant dépendant d'un bon design expérimental et notamment d'un choix éclairé des concentrations testées. Ce choix de concentrations peut se faire à l'aide de résultats obtenus lors d'une pré-expérimentation permettant de localiser l'ordre de grandeur des concentrations auxquelles se trouve la "pente" de la relation concentration-réponse. L'étendue des concentrations testées lors de l'expérimentation elle-même doit ensuite être assez large pour mettre en évidence la position des deux asymptotes (en particulier dans des cas où leurs valeurs ne sont pas connues à l'avance, au contraire de mesures de mortalité, par exemple, où l'asymptote à droite a une valeur de 100% de mortalité) et les concentrations réparties de manière régulière et assez rapprochée pour observer de manière précise la relation concentration-réponse. Dans le cas de calcul de CEC via un test statistique, il est important de privilégier le nombre de réplicats au nombre de concentrations afin de maximiser

la puissance statistique alors que dans le cas de modélisation de CRC, il est plus important d'augmenter le nombre de concentrations testées et de réduire le nombre de réplicats afin de pouvoir décrire plus finement la relation concentration-réponse.

Si les données à utiliser dans un SSD pour les différentes espèces devraient normalement être basées sur les mesures du même endpoint afin d'inclure le même type de mesures au sein de la distribution, cela s'avère souvent compliqué dans les faits. Les données provenant communément de sources multiples, les endpoints mesurés sont ainsi régulièrement variables, en particulier quand les données sont issues de tests non-normalisés. Les endpoints mesurés n'étant dans ce cas pas fixés par une norme, la décision de mesurer certains endpoints et non d'autres est basée sur un ensemble de variables : physiologie et morphologie des organismes utilisés (des taux de chlorophylle ne peuvent par exemple être mesurés que chez des organismes photosynthétiques), facilité de mesure (il est par exemple compliqué de définir des taux de mortalité pour des plantes, la mort de ces organismes étant difficile à attester), mesures de routine (par exemple lorsque des tests standardisés existent pour des taxons proches)... Certains endpoints sont heureusement mesurables facilement pour de très nombreux taxons, tel que la masse sèche totale, ce qui fait que leurs mesures sont souvent réalisées en routine et que les CEC pour ces endpoints sont en général assez nombreuses. Il n'existe cependant pas d'endpoint "universel" et même la masse sèche d'un individu peut être compliquée à mesurer lorsque l'individu en question est une algue unicellulaire (les mesures sur ce type d'organismes ne se font cependant que peu à l'échelle de l'individu, mais le plus souvent à l'échelle de la population ou de la communauté).

Lorsque plusieurs valeurs de CEC sont disponibles pour une même espèce, que ce soit car elles ont été calculées à partir d'endpoints différents ou parce-qu'elles sont issues de laboratoires ou d'études différents, plusieurs possibilités sont proposées dans les textes réglementaires. Le plus souvent, il est imposé de réaliser la moyenne géométrique des différentes valeurs disponibles (pour éviter une éventuelle mauvaise prise en compte de valeurs ayant plusieurs ordres de grandeur de différence). Il est également proposé dans certains textes de conserver la plus faible valeur disponible uniquement [BELANGER et collab., 2016]. Utiliser la moyenne géométrique permet de prendre en compte toute l'information disponible alors que prendre la valeur la plus faible permet d'être plus protecteur. Cette seconde possibilité implique cependant de prendre le risque d'utiliser comme valeur représentative un unique point de données, potentiellement extrême et non représentatif de la distribution réelle des valeurs. Au sein des publications modélisant des SSD, la moyenne géométrique est la méthode la plus utilisée.

Les différents points évoqués précédemment mènent au fait que la quantité de données néces-

saire à la construction d'une SSD n'est pas toujours atteinte (voir paragraphe suivant). Un moyen d'augmenter le nombre de points dans une SSD est d'y inclure les données censurées disponibles, comme préconisé par DOWSE et collab. [2013]. Une donnée est dite censurée lorsque sa valeur est seulement partiellement connue. Ce type de données est principalement généré dans des analyses de survie. Si l'expérimentation dure 15 jours et que certains organismes ne sont pas morts à cette date, leur durée de survie est donc supérieure à 15 jours et il n'est pas possible de produire une information quantitative plus précise que cela. On dit que la donnée est censurée à droite. Les données censurées en écotoxicologie le sont, la plupart du temps, à droite, ce qui traduit en général le fait que l'expérimentation réalisée n'a pas permis de mettre en évidence un effet sur l'endpoint étudié dans la gamme de concentrations testées. La seule information disponible consiste alors à poser l'hypothèse qu'il existe un effet de la substance sur l'endpoint étudié à une concentration située entre la valeur maximum de concentration testée et *inf* et la CEC prendra ainsi comme valeur cet intervalle. Une donnée censurée peut également l'être sur un intervalle fini. Pour reprendre l'exemple de la mesure de temps de survie sur 15 jours, si une contrainte empêche de réaliser les relevés de mortalité au jour 13 et que des individus sont retrouvés morts au jour 14, alors leurs temps de survie seront donc censurés sur l'intervalle [13; 14]. DOWSE et collab. [2013] proposent trois méthodes différentes pour construire des SSDs incluant des données censurées à droite et/ou sur un intervalle. Le package R *fitdistrplus* [DELIGNETTE-MULLER et DUTANG, 2015] propose également une fonction permettant simplement de modéliser et représenter graphiquement des SSDs incluant des données censurées à gauche, à droite et/ou sur un intervalle. Ces différentes méthodes ne seront cependant pas explicitées ici.

Les éléments/limites/contraintes mentionnées dans les deux paragraphes précédents conduisent à une forte limitation du nombre d'espèces pour lesquelles des CEC permettant de construire des SSD sont disponibles. Ce nombre d'espèces est pourtant un élément clé dans la démarche de modélisation de la distribution de sensibilité des espèces. Plus ce nombre d'espèces sera important, plus l'estimation des paramètres de la distribution pourra être précise et plus l'incertitude qui leur est associée pourra être réduite. Ce nombre d'espèces nécessaires afin d'obtenir une estimation convenable peut être modulé en fonction de la qualité intrinsèque des données utilisées, certains travaux montrant de plus que la qualité des données est plus importante que leur quantité (FORBES et CALOW [2002]). Cependant, ces outils sont destinés à être utilisés par un public de professionnels travaillant hors du champ de la recherche, ce qui implique de fixer un cadre le plus précis possible quant à la manière de mettre en application ces outils. Les textes réglementaires imposent ainsi un nombre minimum d'espèces allant de quatre pour la régle-

mentaire néerlandaise (DE BRUIJN et collab. [2001]) et cinq pour la réglementation australienne et néo-zélandaise (AUSTRALIAN AND NEW ZEALAND ENVIRONMENT AND CONSERVATION COUNCIL et AGRICULTURE AND RESOURCE MANAGEMENT COUNCIL OF AUSTRALIA AND NEW ZEALAND [2000]) pour les textes les moins contraignants à dix pour la réglementation européenne (EUROPEAN CHEMICAL BUREAU [2003]) d'après le tableau récapitulatif présenté par KON KAM KING [2015]. Cependant, même cette valeur imposée par la réglementation européenne peut se révéler insuffisante. En effet, NEWMAN et collab. [2000] ont montré, grâce à une méta-analyse basée sur trente jeux de données publiés, que la taille d'échantillon nécessaire pour minimiser la variance associée à l' HC_5 était comprise entre 15 et 55 espèces avec une valeur médiane de 30, ce qui est bien supérieur aux valeurs imposées par les textes réglementaires. Pour leur part, DOWSE et collab. [2013] ont montré que 10 à 15 espèces au minimum étaient nécessaires pour produire des estimations convaincantes de valeurs d' HC_5 . Plus le nombre d'espèces est faible, plus il y a de risques que la valeur d' HC_5 soit plus basse que la valeur minimum des CEC utilisées, ce qui implique que la valeur d' HC_5 obtenue sera extrapolée. Cette extrapolation n'est cependant pas forcément un problème en soi, l'intérêt des SSD étant de pouvoir estimer une HC_5 tout en ne mesurant pas la sensibilité de toutes les espèces, espèces les plus sensibles comprises. KLAINE et collab. [1996] et FORBES et CALOW [2002] ont calculé les pourcentiles empiriques associés au plus bas point de données d'une SSD en fonction de la taille totale du jeu de données. Ils y montrent qu'en dessous de 19 espèces incluses dans le SSD, la valeur de sensibilité la plus basse correspond toujours à une valeur de pourcentage supérieure à cinq, menant au fait que la valeur calculée d' HC_5 a de grandes chances d'être plus faible que la sensibilité la plus basse utilisée dans le jeu de données, entraînant à nouveau une extrapolation de la valeur d' HC_5 .

Le nombre seul d'espèces utilisé n'est cependant pas le seul point important à prendre en compte. Les espèces testées doivent en effet être représentatives de la diversité des organismes présents dans l'environnement pour que les SSD produits puissent être protecteurs de cette diversité. Si une SSD n'est produite qu'à partir de données pour des espèces issues d'un même groupe taxonomique, par exemple des plantes herbacées, les valeurs d' HC_5 produites ne seront représentatives que des plantes herbacées et ne seront ainsi pas adaptées pour protéger les autres groupes taxonomiques. Les textes réglementaires précisant le cadres d'application des SSD précisent ainsi le plus souvent la répartition attendue des différentes espèces. Pour reprendre les trois exemples cités dans le paragraphe précédent, la réglementation néerlandaise (DE BRUIJN et collab. [2001]) impose que quatre espèces différentes soient représentées, la réglementation australienne et néo-zélandaise (AUSTRALIAN AND NEW ZEALAND ENVIRONMENT AND CONSERVATION COUN-

CIL et AGRICULTURE AND RESOURCE MANAGEMENT COUNCIL OF AUSTRALIA AND NEW ZEALAND [2000]) impose quant à elle le test de cinq espèces minimum alors que la réglementation européenne (EUROPEAN CHEMICAL BUREAU [2003]) impose l'usage de dix espèces minimum testées.

Inclure des données pour toutes les espèces disponibles sans réflexion préalable peut cependant se montrer contre-productif. MALTBY et collab. [2005] a par exemple, au sein d'une méta-analyse de jeux de données en concentration-réponse pour 16 insecticides différents, produit des SSD de manière indépendante pour différents groupes taxonomiques (vertébrés, arthropodes, non-arthropodes et invertébrés), différents habitats (eau de mer, eau douce, faciès lotique et faciès lentique) et différentes régions géographiques (Paléarctique, Nearctique, tempérée et tropicale). Seul le groupe taxonomique a eu une influence significative sur les valeurs d'HC₅. Les SSD produits avec les espèces recommandées par les normes et ceux produits pour les espèces non-recommandées n'ont cependant pas montré de différences significatives. La force de cette étude est la comparaison effectuée avec des données de terrain. Il en ressort que les SSD produits avec les données des arthropodes uniquement étaient plus proches de la réalité observée sur le terrain. La borne inférieure de l'intervalle de confiance à 95% de cette valeur d'HC₅ s'est en effet révélée protectrice pour l'écosystème observé. La médiane de cette valeur d'HC₅ s'est révélée protectrice dans le cadre d'une application unique de pesticide, mais pas pour des situations d'application multiples ou continues. Il a également été déterminé qu'un AF d'une valeur de 5 au minimum devait être appliqué à des valeurs médianes d'HC₅ pour qu'elles puissent être utilisées de manière convaincante en évaluation du risque (cette valeur de 5 étant, pour rappel, la valeur maximale d'AF proposée par les textes réglementaires pour les SSD). Il est ainsi important d'utiliser principalement, dans les SSD produits, des organismes qui font parti du groupe taxonomique ciblé par le contaminant (lorsque celui-ci ne cible qu'un ou des groupes taxonomiques en particulier, ici, les arthropodes). En effet, intégrer des espèces non-cibles présentant mécaniquement des CEC bien plus élevées implique de tirer la distribution vers ces valeurs plus élevées et ainsi de rendre le dispositif d'évaluation du risque moins protecteur. De plus, intégrer à la fois des espèces cibles et non-cibles peut conduire à vouloir inclure dans la même distribution des points de données issus de deux distributions différentes, menant ainsi à une distribution multimodale. Le fait de ne sélectionner qu'une frange réduite des espèces disponibles peut cependant paraître contradictoire avec l'un des principes basiques des SSD qui implique que les espèces choisies doivent être représentatives de l'intégralité des espèces présentes dans l'écosystème considéré. Au delà des contraintes mathématiques, ce sont deux philosophies différentes qui transparaissent dans ces deux approches. Utiliser uniquement les espèces cibles d'une substance comme des plantes

uniquement pour un herbicide est par exemple ce qui est classiquement fait lors d'une procédure d'autorisation de mise sur le marché de pesticides. Cependant, ces pesticides peuvent avoir des effets sur d'autres organismes que ceux ciblés, notamment lorsque la substance en question se déverse dans l'environnement. Par exemple, des effets de l'atrazine, un herbicide, sur trois espèces de cladocères *D. magna*, *Ceriodaphnia silvestrii* et *Macrothrix flabelligera* ont été observés avec des CEC calculées de l'ordre de la dizaine de milligrammes par litre [MOREIRA et collab., 2014]. Ces effets sont cependant souvent visibles à des concentrations plus hautes que pour les organismes cibles (des CEC de l'ordre de la dizaine de microgrammes par litre pour des algues vertes ont été par exemple observées [LEBOULANGER et collab., 2001]). S'il est ainsi important d'évaluer la toxicité des pesticides pour d'autres communautés que celles normalement ciblées par les composés en question, afin d'évaluer leurs effets réels sur l'environnement, viser à protéger les espèces ciblées (et donc souvent plus sensibles) peut la plupart du temps suffire à protéger les autres espèces potentiellement impactées.

1.2.4.2 Choix de la distribution à utiliser

Un second élément d'importance est le choix du type de distribution utilisé pour modéliser les données. Les deux distributions les plus utilisées sont la distribution log-normale et la distribution log-logistique. Elles sont toutes les deux symétriques et présentent des allures proches. Cependant, ces deux distributions se distinguent par leurs queues de distribution. Les queues de la distribution log-logistique sont en effet plus lourdes, menant ainsi à des valeurs plus extrêmes pour les percentiles très bas ou très hauts. Cela implique des valeurs d'HC₅ calculées plus basses avec cette distribution qu'avec la distribution log-normale. La distribution log-logistique permet donc de manière structurelle de produire des valeurs plus protectrices et son usage en ERA a été recommandé par ALDENBERG et SLOB [1993]. Le choix de la distribution à utiliser a également été étudié par NEWMAN et collab. [2000]. Sur l'échantillon de 30 SSD utilisés dans cette étude, la moitié s'est avérée non conforme à la loi log-normale par l'utilisation d'un test de Shapiro-Wilks. Des statistiques de chi-2 sur les valeurs d'EC₅₀ ont de plus permis de montrer que la distribution log-logistique était plus adaptée aux données deux fois plus souvent que la distribution log-normale.

D'autres distributions sont parfois utilisées pour produire des SSD. Le travail de NEWMAN et collab. [2000] a par exemple montré que le modèle de Gompertz présentait, dans le cas de SSD produits avec des NOEC, des ajustements de meilleure qualité que les distributions log-normale ou log-logistique. Un autre exemple est celui de la distribution log-triangulaire, conseillée dans le cadre de la législation étatsunienne (ERICKSON et STEPHAN [1988]). Cette distribution présente en

effet l'avantage d'atteindre les asymptotes horizontales $PAF = 0$ et $PAF = 1$, permettant ainsi le calcul d'une HC_0 , ce qui est impossible avec les deux distributions présentées auparavant. Certaines distributions, plus complexes et utilisant un nombre plus important de paramètres, permettent également de modéliser des distributions non symétriques. C'est le cas par exemple de la distribution du Burr III. Des distributions multimodales peuvent également être construites à l'aide de modèles de mélanges permettant d'assembler plusieurs distributions en une distribution multimodale [FOX et collab., 2020; ZAJDLIK et collab., 2009]. Ces distributions nécessitent cependant un plus grand nombre de points de données afin d'être correctement ajustées du fait de leurs nombreux paramètres à estimer. D'autres distributions sont également utilisées telles que les distributions Gamma, log-t, log-Gumbel, Weibull, Pareto et Gompertz [FOX et collab., 2020].

Enfin, d'autres méthodes ne nécessitent pas d'avoir à choisir une distribution pour les données. La méthode la plus simple est celle présentée par VAN DER HOEVEN [2001]. Cette méthode consiste à ordonner les valeurs de sensibilité du jeu de données de la plus haute à la plus basse puis de sélectionner en tant qu' HC_5 la $k^{\text{ième}}$ valeur de sensibilité tel que k est l'entier le plus grand situé en dessous de $0,05 * (n + 1)$, n étant l'effectif du jeu de données. La publication en question indique également comment définir un intervalle de confiance à 95% autour de cette valeur d' HC_5 estimée. Cette procédure d'estimation présente un certain nombre de problèmes, notamment celui d'être très sensible aux valeurs extrêmes et potentiellement aberrantes. Un autre problème de taille est proche de celui évoqué dans le cadre de l'utilisation des NOEC et des LOEC, à savoir que la valeur de référence obtenue est forcément égale à l'un des points de données, ce qui la rend fortement dépendante du plan expérimental appliqué. Les méthodes basées sur le bootstrap fournissent une alternative pour le calcul des valeurs d' HC_5 sans hypothèse sur la distribution des données. Cette technique de rééchantillonnage consiste à générer un nouveau jeu de données à partir de celui existant en effectuant dans le jeu de données originel autant de tirages aléatoires avec remise qu'il y a de points de données différents. On obtient ainsi un nouveau jeu de données, composé des données contenues dans le jeu original, mais en proportions différentes (certains points pourront ainsi être présents en plusieurs exemplaires et d'autres être absents). L'application du bootstrap aux SSD n'implique pas, comme indiqué précédemment, d'estimer une distribution pour les données, mais d'estimer directement la HC_5 comme 5^{ième} percentile empirique des données. Cette valeur ne peut être correctement estimée qu'à partir de 19 points de données différents. Le rééchantillonnage est réalisé un grand nombre de fois et, à chacune, une valeur d' HC_5 est calculée, permettant ainsi d'obtenir une estimation ponctuelle et un intervalle de confiance associés à cette valeur. NEWMAN et collab. [2000] ont montré que les valeurs d' HC_5 estimées à partir de bootstraps

étaient proches de celles estimées à l'aide de l'estimation de distributions log-normales (avec une similarité de plus de 90%).

1.2.4.3 Niveau d'HC_x à utiliser

Si la valeur finale extraite d'une SSD est habituellement fixé à HC₅, valeur historiquement utilisée dès les débuts de l'utilisation de cette méthode [POSTHUMA et collab., 2001], le choix de cette valeur n'est pas appuyé scientifiquement et son choix n'est que politique. Les distributions les plus classiques pour créer des SSD ne permettent effectivement pas de protéger toutes les espèces théoriques de la communauté (à l'exception de la distribution log-triangulaire) et il est ainsi nécessaire de définir une valeur permettant de protéger un grand nombre d'espèces, tout en étant cohérent avec les contraintes inhérentes à l'ERA. Cependant, le niveau de protection des espèces est également défini par le type de CEC choisi. Par exemple, une HC₅ produite grâce à des EC₁₀ correspond à la concentration à laquelle 5% des espèces sont atteintes à hauteur d'au moins 10% concernant leur endpoint mesuré. Certaines espèces ne sont donc affectées qu'à hauteur de 10% environ alors que d'autres peuvent être impactées de manière bien plus significative. Il est ainsi important, lors de l'analyse des résultats d'une SSD, de ne pas se focaliser uniquement sur la HC₅ elle-même, mais de vérifier comment la SSD a été construite afin d'en comprendre les implications réelles : quel type de CEC a été utilisé? Quel est le niveau d'effet auquel les espèces sont considérées comme étant affectées par le contaminant? Sur quel(s) endpoint(s) les CEC utilisées ont-elles été mesurées? Les réponses à ces questions définissent ce que montre réellement la SSD produite et ainsi ce que signifie la HC₅ en découlant d'un point de vue biologique et environnemental.

L'HC₅ obtenue suite à l'application de la procédure de production de SSD peut de plus ne pas s'avérer fiable vis-à-vis des effets réellement observables dans l'environnement à cette concentration. Par exemple, SMETANOVÁ et collab. [2014] ont montré, lors d'expériences utilisant des concentrations environnementales de plusieurs pesticides en mélange, que les valeurs d'HC₅ issues des SSD produits avaient tendance à largement sous-estimer (d'un facteur allant de 2 à 1.000) les effets observables dans l'environnement à ces concentrations.

L'importance de certains des points soulevés dans les sous-sections 1.2.4.1, 1.2.4.2 et 1.2.4.3 a été étudiée par DEL SIGNORE et collab. [2016]. Ces travaux sont récapitulés dans le Tableau 1.2 extrait de la publication mentionnée. Il est possible d'y voir que si certains des points étudiés n'ont qu'un effet mineur sur les SSD et les HC₅ qui en sont dérivées (e.g. le type d'habitat des organismes et le type de distribution utilisé), certains autres ont des effets bien plus marqués sur les résultats

de la méthode (*e.g.* le nombre de points de données inclus dans la distribution et le mode d'action du contaminant). Il est intéressant de noter que parmi les sources de variabilité testées dans cette étude, les facteurs liés à la biologie de organismes tels que la situation géographique ou le type d'habitat des espèces semblent avoir un effet réduit sur cette méthode d'ERA. Au contraire, les facteurs liés à l'application de la méthode tels que le nombre de points de données ou la sélection du groupe d'espèces semblent présenter des effets importants sur les SSD et les HC₅ dérivées. Cette observation n'est cependant pas universelle puisque le mode d'action du contaminant présente une importance considérable sur les résultats alors qu'au contraire le type de distribution utilisé n'a qu'un effet limité sur l'évaluation du risque réalisée grâce à cette méthode. La tendance dégagée par ce tableau semblerait cependant indiquer que, tant que cela est réalisé de manière à respecter une certaine cohérence dans le jeu de données (*e.g.* en intégrant des espèces issues de groupes taxonomiques variés, en ne limitant pas le jeu de données à des espèces sensibles uniquement, en prenant garde à intégrer assez d'espèces différentes...), des données issues d'espèces variées et ne formant pas une communauté réelle peuvent être intégrées ensemble au sein d'une SSD et donner des résultats satisfaisants.

Aspect considéré	Courbe SSD	HC ₅ /HC ₅₀	Remarque	Exemple
CEC utilisé (NOEC vs EC ₅₀)	+	+++	N'importe quel CEC peut être utilisé. Les NOEC sont le plus souvent requis pour la dérivation des HC ₅ et des PNEC.	L'incertitude associée aux ratios aigus-vers-chronique dépend des espèces et du mode d'action du composé. La position relative sur l'axe des abscisse du SSD varie en fonction du type de CEC utilisé.
Nombre de points de données	++	+++	Manque général de points de données pour les courbes SSD.	L'incertitude associée à l'HC _x diminue quand le nombre de points de donnée est supérieur à quatre.
Sélection du groupe d'espèces	+++	+++	La courbe peut être multimodale si des groupes taxonomiques de sensibilités différentes sont inclus.	Inclure des groupes moins sensibles fait augmenter l'HC ₅ . La variation de sensibilité au sein d'un taxon est plus basse (la courbe SSD est donc plus inclinée) qu'entre taxons.
Type d'habitat	+	+	Principalement des sensibilités similaires, mais les espèces marines ont le plus souvent montré des sensibilités plus élevées que les espèces dulçaquicoles.	Les macroinvertébrés d'habitats statiques ou lotiques n'ont pas montré de différences de sensibilité aux pesticides alors que la sensibilité d'espèces d'habitats d'eau douce ou marine peuvent varier en fonction du stresser.
Situation géographique	+	+	Principalement des sensibilité similaires.	Pas de différences significatives entre arthropodes et de poissons australiens et non-australiens vis-à-vis de la sensibilité à l'endosulfan. Les invertébrés amazoniens se sont montrés significativement moins sensibles au carbendazim que leurs contreparties de milieux tempérés.
Mode d'action du contaminant	+++	+++	L'importance du mode d'action varie en fonction du groupe taxonomique.	La sensibilité des plantes à un mode d'action spécifique d'un herbicide est plus haute que pour les autres groupes taxonomiques.
Type de distribution	+	++	Dépendant du nombre de points de donnée. Des tests de qualité d'ajustement devraient être réalisés.	Pour des données de toxicité aiguë par le cuivre et le zinc sur des espèces de cladocères, les distributions de Weibull, uniforme et beta ont mené à une sous-estimation alors que les distributions log-logistique et log-triangulaire ont mené à une surestimation de la queue basse par rapport à une distribution log-normale.

TABLEAU 1.2 – Tableau récapitulatif, modifié d'après DEL SIGNORE et collab. [2016], présentant les effets de différents choix de modélisation sur les courbes SSD obtenues et les valeurs d'HC₅ et HC₅₀ qui en sont dérivées. Ces observations sont basées sur une synthèse de plusieurs articles réalisée au sein de l'article mentionné. L'influence sur la courbe SSD et les valeurs d'HC₅ et HC₅₀ est indiquées par +++ (influence très importante), ++ (influence importante) et + (influence moins importante).

1.3 Les sources de variabilité des données

Comme cela a été montré dans les sections précédentes, il est compliqué, voire même impossible, de définir une valeur précise permettant de décrire de manière exacte la sensibilité d'une espèce à un contaminant. Ceci est dû au fait que de nombreux facteurs viennent modifier cette sensibilité d'une population à l'autre, d'un individu à l'autre au sein d'une même population et même d'une cellule à l'autre au sein du même organisme si l'on se place dans le cadre d'une étude à de bas niveaux d'organisation biologique. Ces facteurs mènent ainsi à l'apparition d'une variabilité de la réponse des organismes au contaminant d'intérêt et de la mesure qui est faite de cette sensibilité. Les sources de variabilité présentes dans un jeu de données écotoxicologique peuvent être d'origines multiples. Dans ce manuscrit sera qualifié de source de variabilité intraspécifique tout phénomène pouvant faire varier les valeurs finales de toxicité (*i.e.* CEC, HC₅) pour une espèce donnée (la variabilité interspécifique citée plus loin n'en fait donc pas partie). Il serait illusoire de prétendre pouvoir en faire un résumé exhaustif ici et cette présentation ne sera ainsi que parcelaire. Les diverses sources de variabilité existantes peuvent être rassemblées en plusieurs grands groupes selon leur type.

1.3.1 Les sources de variabilité biologiques

Ces sources de variabilité sont de réelles variations de la sensibilité à un contaminant d'un organisme à l'autre. Cette variabilité s'observe entre différentes espèces, ces dernières ayant évolué de manière indépendante. Certaines espèces seront particulièrement sensibles à certains contaminants (par exemple, les plantes seront très sensibles à des herbicides tels que l'isoproturon) alors que d'autres pourront bien plus facilement supporter de hautes concentrations des mêmes composés. Cette variabilité interspécifique est celle qui est étudiée dans le cadre des SSD, puisqu'ils consistent à évaluer la concentration en un contaminant donné n'ayant d'effet que sur une petite partie des espèces d'une communauté.

D'autres sources de variabilité existent au sein d'une même espèce et font donc partie de la variabilité intraspécifique. En effet, du fait des mécanismes de sélection des génotypes résistants ainsi que de la dérive génétique, différentes populations peuvent présenter des sensibilités différentes à un même contaminant [PICADO et collab., 2007; ROUBEAU DUMONT et collab., 2019; TOUMI et collab., 2015]. Cette variabilité intergénotypique peut également s'exprimer à l'échelle individuelle, des différences de sensibilité existant d'un organisme à l'autre au sein de la même population. Cette variabilité intraspécifique à la fois intra et interpopulationnelle (qui existe pour de

nombreux traits biologiques et écologiques des individus et non uniquement pour leur sensibilité à des contaminants) a l'avantage de permettre aux espèces de pouvoir mieux s'adapter, certains individus possédant des caractéristiques leur permettant de survivre et se reproduire malgré des conditions défavorables pour les autres. D'autres facteurs tels que le sexe des organismes, leur masse, leur condition physique ou encore leur stade de développement (prenant en compte à la fois le vieillissement des organismes et leur cycle reproducteur) peuvent également modifier leur sensibilité à un contaminant.

1.3.2 Les sources de variabilité environnementales/expérimentales

Outre ces sources de variabilité internes aux individus, un très grand nombre de paramètres externes peuvent venir modifier la sensibilité des organismes à un contaminant. Ces facteurs agissent dans l'environnement, lorsque les organismes vivent à l'état naturel, mais également en laboratoire et modifient les données de sensibilité mesurées sur ces organismes. Parmi ces sources, on peut trouver par exemple les interactions biotiques, telles que la compétition intra ou interspécifique ou encore la prédation [GUST et collab., 2016; VIAENE et collab., 2015] qui vont modifier les apports et l'allocation énergétique des organismes, donc leur métabolisme et ainsi, leur sensibilité à un contaminant. Des paramètres de l'environnement lui-même peuvent également modifier la sensibilité des organismes à un contaminant. C'est le cas par exemple du pH du milieu [MCGEE et collab., 2020] qui aura notamment un effet sur la spéciation des métaux, de la température du milieu [DELORENZO, 2015] qui aura des effets sur de nombreux aspects biologiques du fait notamment de son lien avec l'efficacité des processus métaboliques ou encore de la saison à laquelle se produit la contamination [LARRAS et collab., 2014], cette saison pouvant modifier un grand nombre de caractéristiques du milieu. Lors d'expérimentations, des facteurs de variabilité supplémentaires peuvent également intervenir tels que les caractéristiques de la période d'acclimatation des organismes précédant leur exposition ou encore le stade de développement des individus au moment de l'exposition. Le choix de l'endpoint mesuré est également important, tous les traits d'un individu ne répondant pas de la même manière à une contamination, les composés ayant le plus souvent une action ciblée sur les organismes (par exemple, les herbicides inhibiteur du photosystème II auront un effet visible sur les endpoints liés à la photosynthèse, ainsi que sur les endpoints traduisant l'état général de la plante tels que la masse sèche du fait du rôle central de la photosynthèse dans le métabolisme des plantes). Dans des cas extrêmes, il est ainsi possible que l'action d'un contaminant ne soit pas visible du tout sur les endpoints mesurés alors que des effets existent sur d'autres endpoints non investigués (ceci est par exemple le cas pour les biomarqueurs

qui présentent une réponse rapide à une contamination alors qu'aucun effet ne peut encore être visible sur des mesures macroscopiques). La méthode employée pour mesurer les endpoints choisis est également importante, des méthodes de mesure différentes pouvant mener à des résultats divergents dans une même situation.

1.3.3 Les sources de variabilité issues de la modélisation des données

L'empilement des couches de variabilité intraspécifique ne s'arrête cependant pas à l'acquisition des données. Les données brutes acquises en tant que résultat d'expérimentations ne sont en effet pas exploitables directement afin d'évaluer la toxicité d'un composé sur l'/les organisme(s) étudié(s) et nécessitent une phase de traitement statistique ou de modélisation. Le choix de la méthode utilisée afin de réaliser ce traitement viendra, lui aussi, modifier les résultats de sensibilité des espèces en fonction de nombreux critères. En plus des points abordés dans la Section 1.2.4, d'autres sources de variabilité peuvent être identifiées telles que le choix de la méthode d'ERA à appliquer ou encore l'estimateur statistique utilisé afin de modéliser les courbes doses-réponses (*e.g.* le maximum de vraisemblance).

Ces différentes sources de variabilité ne sont pas indépendantes et interagissent entre elles jusqu'aux résultats finaux des procédures d'ERA, les résultats ainsi obtenus peuvent être variables et la variabilité mesurée et associée à la mesure finale de toxicité n'est toujours représentative que des facteurs ayant été pris en compte à tous les niveaux du protocole : si le plan expérimental est basé sur des tests normalisés réalisés sur des clones, alors plusieurs sources de variabilité intraspécifique seront écartées de l'analyse (*e.g.* la variabilité intergénomique, les variabilités liées aux conditions environnementales), rendant ainsi les résultats plus reproductibles. Cependant, ces résultats ne seront représentatifs que des paramètres expérimentaux fixés et ils pourraient s'avérer différents, ne serait-ce que pour d'autres populations que celle étudiée pour l'exemple cité précédemment.

Chapitre 2

Prise en compte de la variabilité intraspécifique dans les SSDs et accent sur la variabilité intergénomique

« Without data you're just another person with an opinion. »

William Edwards Deming

Sommaire

2.1 Présentation	44
2.2 Ébauche d'article soumis prochainement	45
2.3 Tentative de généralisation	72

2.1 Présentation

La sensibilité à un contaminant d'une espèce donnée n'est pas fixe. Comme cela a été détaillé dans le chapitre 1, elle varie en effet selon de nombreux critères d'un individu à l'autre, d'une population à l'autre, d'un milieu à l'autre... La mesure de cette sensibilité varie également d'un laboratoire à l'autre, d'un opérateur à l'autre, d'un appareil de mesure à l'autre, d'une méthode de modélisation à l'autre... Les sources de variabilité sont ainsi extrêmement nombreuses. Les facteurs pouvant modifier la sensibilité des organismes au sein d'une même espèce sont regroupés sous le nom de variabilité intraspécifique, tel que détaillé dans la section 1.3. De nombreuses sources de variabilité intraspécifique peuvent ainsi modifier les résultats de bioessais écotoxicologiques et les méthodes d'ERA qui en découlent, telles que les SSD. Rares sont les protocoles expérimentaux prenant en compte de tels paramètres, en particulier en dehors de la littérature blanche. De plus, lorsque les effets de ces facteurs de variabilité sont testés dans la production scientifique, cette évaluation se fait le plus souvent à l'échelle de l'organisme et rarement à des niveaux d'organisation supérieurs : les individus sont testés de manière indépendante et les résultats traités ensuite de manière à répondre à une question du type "Le facteur X présente-t-il un effet sur le paramètre Y mesuré sur des individus de l'espèce Z?". Les conclusions tirées de ces expérimentations sont ainsi rarement généralisables à d'autres espèces et il est encore plus inhabituel que ces études se penchent sur les effets des facteurs étudiés sur des communautés.

Dans ce chapitre, nous avons testé 1) les effets d'une variabilité intraspécifique globale (incluant entre autres : variabilité inter-laboratoires, variabilité inter-génotypique, variabilité des conditions expérimentales...) et 2) les effets d'une variabilité inter-génotypique uniquement, sur des SSD et plus particulièrement sur la distribution des valeurs d'HC₅ en découlant. Ceci a été réalisé pour des macrophytes aquatiques exposées à du cuivre à l'aide des données publiées dans ROUBEAU DUMONT et collab. [2019] pour l'évaluation des effets de la variabilité inter-génotypique auxquelles nous avons adjoint l'intégralité des EC₅₀ basées sur des endpoints liés à la croissance pour des macrophytes (et bryophytes) exposées à du cuivre présentes dans la base de données écotoxicologique de l'USEPA afin de porter le nombre d'espèces à huit et ainsi de pouvoir construire des SSD de meilleure qualité.

Concernant la méthodologie de cette partie, nous avons réalisé, afin de répondre à notre problématique, deux types de simulations différentes, chacune appliquée à plusieurs scénarios :

- Le Scénario Spécifique à chaque espèce (*Species Specific scenario* dans le texte) utilise pour chaque espèce la variabilité qui lui est associée au sein du jeu de données utilisé. Ce scénario

inclut l'intégralité des sources de variabilité incluses dans le jeu de données. Ce scénario n'a été appliqué qu'au sein du premier type de simulations.

- Les Scénarios Génériques (*Generic Scenarios* dans le texte) considèrent que la variabilité intraspécifique est la même pour les différentes espèces. Trois niveaux différents de variabilité ont été utilisés (bas, moyen et élevé), donnant ainsi trois scénarios génériques différents (*i.e. Lowest Generic Scenario, Mean Generic Scenario et Highest Generic Scenario* dans le texte). Ces niveaux de variabilité ont été définis en utilisant uniquement les données expérimentales publiées dans ROUBEAU DUMONT et collab. [2019], de manière à ne refléter que la variabilité inter-génotypique.

Comme indiqué précédemment, deux types de simulations ont été réalisés. Dans les deux cas, ces simulations ont consisté en la réattribution, pour l'EC₅₀ de chaque espèce, d'une déviation par rapport à la moyenne basée sur les variabilités définies par les différents scénarios. Le premier type de simulations se basait sur les espèces réellement contenues dans le jeu de données alors que le second type de simulations utilisait un ensemble d'espèces théoriques générées à partir de la SSD construite à partir de ces espèces réellement présentes dans le jeu de données. L'utilisation d'espèces théoriques pour ce type de simulations explique pourquoi il nous a été impossible d'y appliquer le scénario spécifique : les espèces utilisées n'existant pas, nous n'avions pas à disposition de variabilités spécifiques à leur appliquer. Ces simulations de jeux de sensibilités au cuivre pour diverses espèces ont été réalisées mille fois pour chaque type de couple simulation * scénario de variabilité et pour chacun, une SSD a été réalisée. Ceci a permis de produire pour chaque cas un faisceau de variabilité mettant en évidence de quelle manière la variabilité intraspécifique totale ou la variabilité inter-génotypique affectaient les SSD produites. De plus, sur chaque SSD a été calculée une valeur d'HC₅, ce qui a permis d'évaluer également ces effets sur la distribution de ces valeurs, qui sont celles utilisées *in fine* en ERA afin de générer les PNEC.

2.2 Ébauche d'article soumis prochainement

A partir de la page suivante se trouve l'ébauche d'un article à soumettre dans un journal à comité de lecture. Certains éléments sont ainsi amenés à être modifiés entre la version ici présentée et le manuscrit qui sera soumis.

Modification of Species Sensitivity Distributions by intergenotypic variability - a simulation-based approach.

Vincent BAILLARD^{a,*}, Arnaud ELGER^b, Eva ROUBEAU DUMONT^b,
Laurine MALARDIER^{?a}, Simon DEVIN^a, Elise BILLOIR (ordre à discuter)^a

^aUniversité de Lorraine, CNRS, LIEC, F-57000 Metz, France
^bECOLAB, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, France

Abstract

...

Keywords: hierarchical modelling, environmental risk assessment, isoproturon, herbicide, biotic interaction, multi-stress, grass strips

1. Introduction

2 In ecotoxicology, species sensitivity to contaminants are usually reduced to a
3 single critical effect concentration (CEC) value such as a median effect concen-
4 tration (EC₅₀) or a no observed effect concentration (NOEC) estimated from
5 the results of a monospecific bioassay. However, many factors can influence the
6 way organisms respond to a contaminant such as biotic interactions (*e.g.* preda-
7 tion) or intraspecific variability (which encompasses several variability sources
8 as interlaboratory variability or intergenotypic variability). Those factors are
9 rarely directly taken into account in environmental risk assessment (ERA) pro-
10 cedures, but CECs are usually divided by an assessment factor (AF; Amiard
11 and Amiard-Triquet (2015)) which is supposed to compensate for those uncon-
12 sidered factors. The value of this AF is linked to the environmental relevance of
13 the data and the method used to exploit those data: the more environmentally
14 relevant the data and the methods are, the lowest the used AF is. For exam-
15 ple, in aquatic ERA, AF values range from 1,000 for classical acute CECs from

*Corresponding author

Email address: vincent.baillard@univ-lorraine.fr (Vincent BAILLARD)

16 three different species to 1 for high quality datasets based on real communities
17 included in models taking into account the factors that can modify organisms
18 sensibility to chemical stress (Amiard and Amiard-Triquet, 2015).

19 The effects of a varying genotype on organisms sensibility to contaminants
20 has already been assessed in previous works. Toumi et al. (2015) investigated
21 how *Daphnia magna* response to malathion changed between three strains. Dif-
22 ferent endpoints were measured on the organisms: immobilization, reproduction,
23 body length, embryo toxicity and acetylcholinesterase (AChE) activity. Results
24 from this experiment for acute exposition (*i.e.* for immobilization) showed that
25 *D. magna*'s sensitivity to malathion (expressed in EC₅₀) could change up to
26 a factor of 1.5 between strains and to a factor of 43 when experimental data
27 were pooled with data extracted from the literature. For chronic exposition
28 (*i.e.* for reproduction, body length and embryo toxicity), this factor was up
29 to 18 and, for AChE activity, up to 33 (for experimental data only, compar-
30 ison with literature data was not realised for chronic exposition and AChE).
31 This factor of change was thus different between measured endpoints, tested
32 strains and calculated CECs. The effects of genetic variability on *D. magna*
33 have been extensively studied, for multiple compounds (see for example Picado
34 et al. (2007)) as it is a common model organism in ecotoxicology. Concerning
35 other taxonomic groups, Roubeau Dumont et al. (2019) assessed for example
36 this question on several genotypes of three aquatic macrophyte species (*Lemna*
37 *minor*, *Myriophyllum spicatum* and *Ceratophyllum demersum*) exposed to cop-
38 per. The results showed coefficients of variation of the EC₅₀ between genotypes
39 ranging from 7.1 to 99.8%, depending on the measured endpoint. Significant dif-
40 ferences between genotypes could however not be observed for every measured
41 endpoint and species. These works clearly show that intergenotypic variabil-
42 ity can modify organism response to contaminants. However, these works only
43 assess these effects at the organism level, and there is a lack of information
44 about the consequences of these effects at higher biological organisation levels
45 considered in ERA.

46 Species Sensitivity Distributions (SSD; Belanger et al. (2016), Posthuma

47 et al. (2001)), are precisely used in ERA to estimate the effects of contaminants
48 on the environment at the community level. They consist in the derivation
49 of the distribution of sensitivity values for multiple species. This distribution
50 then allows to estimate the concentration that is not harmful to a high fraction
51 of species (usually 95% and noted Hazardous Concentration for 5% of species,
52 HC_5) or the potentially affected fraction (PAF) of species when the contaminant
53 concentration is known in an ecosystem. However, classical SSDs impose the
54 sensitivity of each species to the contaminant to be summarized by a unique
55 value (usually the geometric mean of critical effect concentrations available for
56 a species such as median effect concentrations, EC_{50}). Consequently, factors
57 modifying sensitivity of species are not taken into account.

58 Some previous works proposed methods to take into account the whole in-
59 traspecific variability of data inside SSDs. For example, Wigger et al. (2020)
60 proposed a modified version of the probabilistic SSD (PSSD; Gottschalk and
61 Nowack (2013)), the PSSD+, that integrates the whole distribution of species
62 sensitivity values as well as coefficients of variation for interlaboratory variabil-
63 ity. This approach is non-parametric and thus no fixed distribution of the data
64 between species is assumed. Another example comes from Kon Kam King et al.
65 (2015). In this this work, SSDs are built using a hierarchical model that includes
66 every single datapoint and not only a summary as the EC_{50} for each species.
67 This approach allows to propagate incertitude from CECs to the final SSD and
68 thus the derived HC_5 . Those two examples however try to integrate the whole
69 data variability in the SSDs and do not focus on the study of single intraspecific
70 variability source effects on built models.

71 In this work, we assessed the effects of the inclusion of intraspecific and
72 specifically intergenotypic variability in SSDs models. Our objectives were 1) to
73 assess whether taking into account those sources of variability had an effect on
74 the models and the derived HC_5 , and if these effects exist, 2) to see if a difference
75 exists between the effects of the whole intraspecific variability and the effects
76 of intergenotypic variability alone, since this latter is only a part of intraspe-
77 cific variability. We used data from bioassays for different species of aquatic

78 macrophytes exposed to copper and previously published in Roubeau Dumont
79 et al. (2019). Different genotypes were tested for each species. We completed
80 this dataset using EC₅₀ data for copper from the USEPA database. Two dif-
81 ferent simulation approaches were used with three to four scenarios of intraspe-
82 cific/intergenotypic variability for each.

83 2. Materials and methods

84 2.1. Toxicity data

85 SSDs are built using CECs that summarize concentration-response relation-
86 ships of the different species exposed to the studied contaminant. The CECs
87 used in this work to build SSDs came from 1) experimental data and 2) litera-
88 ture. We chose to use EC₅₀ values as they are widely calculated in the literature
89 and thus more available than other CECs, except for CEC based on statistical
90 tests like NOEC and LOEC. These CECs were however not chosen because of
91 the severe statistical drawbacks they are associated to, as for example the fact
92 that their values can only be equal to one of the tested concentrations (Fox and
93 Landis, 2016, Jager, 2012).

94 2.1.1. Experimental data

95 *Experimental design.* The experimental dataset used in this work has been pre-
96 viously published in Roubeau Dumont et al. (2019). It consists in a series of
97 ecotoxicological bioassays, in which three aquatic macrophyte species were ex-
98 posed to copper: *Lemna minor* a free-floating species, *Myriophyllum spicatum*
99 a rooted and submerged species and *Ceratophyllum demersum* a species that
100 has no roots but can be both free-floating or fixed to the sediment by ‘rhizoid
101 shoots’. *L. minor* and *M. spicatum* are used in environmental risk assessment,
102 with standardized tests that have been developed (OECD, 2002, 2014a,b). For
103 each species, three to four different genotypes were tested, originating from
104 France and Germany (details on those genotypes as well as organism storage
105 types can be found in Roubeau Dumont et al. (2019)).

106 1g/L Cu²⁺ solutions of copper sulfate (Analysis quality, purity > 99%,
 107 CAS number 7758-99-8, ACROS Organics™) solubilized in ultrapure water and
 108 then diluted in the different media were used for exposure. Time-averaged
 109 Cu concentrations were calculated from effective Cu concentrations measured
 110 (details on these measures can be found in Roubeau Dumont et al. (2019)).

111 Acute toxicity tests were performed on each species. However, to cope with
 112 interspecific differences in growth rates, exposure time needed to be adapted
 113 to the species considered (Table 1). Before exposure, plants were acclimatized
 114 during five days to the experimental conditions. Species specific exposure media
 115 were designed (Roubeau Dumont et al., 2019). Six to eight copper concentra-
 116 tions were used to model concentration-response curves. The range of concen-
 117 tration tested depends on the species sensitivity to copper. At the end of the
 118 exposures, Relative Growth Rates (RGR) were calculated for each organism:
 119 RGR in fresh mass (RGR_{fm}) for all species, RGR in length (RGR_{length}) for *C.*
 120 *demersum* and *M. spicatum* and RGR in frond fresh mass (RGR_{fronds}) for *L.*
 121 *minor*. A summary of experimental design conditions can be found in Table 1
 122 and details in Roubeau Dumont et al. (2019).

Species	Number of genotypes	Measured endpoints	Tested concentrations (in mg/L)	Number of replicates	Exposure time
<i>L. minor</i>	3	RGR _{fm} , RGR _{fronds}	0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.7, 1, 1.25	6	7 days
<i>C. demersum</i>	3	RGR _{fm} , RGR _{length}	0.0, 0.005, 0.1, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5	5	14 days
<i>M. spicatum</i>	4	RGR _{fm} , RGR _{length}	0, 0.1, 0.5, 1, 2, 3	5	12 days

Table 1: Information on experimental designs in relation to species and measured endpoint. RGR_{fm} stands for Relative Growth Rate of fresh mass, RGR_{fronds} stands for Relative Growth Rate of fronds and RGR_{length} stands for Relative Growth Rate in length.

Calculation of EC₅₀. For each species, genotype and endpoint, a concentration-response curve (CRC) was built to describe the relationship between the contaminant concentration and the measured response of the macrophytes. This was done using a four-parameters log-logistic model (Equation 1).

$$y_{i,j} = c + \frac{d - c}{1 + \exp(b(\log(x_i) - \log(e)))} \quad (1)$$

123 where i is the i^{th} contaminant concentration and j is the j^{th} replicate, $y_{i,j}$ is the
124 measured value of the considered endpoint, x_i is the contaminant concentration,
125 c and d are respectively the lowest and the highest asymptotes of the final
126 curve, e is the concentration at which the inflexion point of the curve is located
127 (corresponding to the EC_{50}) and b is a shape parameter which is proportional
128 to the steepness of the model and defines d and c : if $b > 0$, the, c and d are
129 respectively the response level at low and high contaminant concentration, if b
130 < 0 then c and d are respectively the response level at high and low contaminant
131 concentration and if $b = 0$, the model becomes a constant model located at the
132 arithmetic mean between the two parameters c and d .

133 On each of these CRCs, an EC_{50} was calculated. When this value was
134 outside of the range of tested concentrations, it was treated as a missing value.
135 In total, eighteen non-missing EC_{50} values were calculated, meaning that only
136 two could not be. The EC_{50} was chosen as a summary of the organism tolerance
137 against copper for the rest of this work.

138 2.1.2. Literature data

139 These EC_{50} from the three tested species and the measured endpoint were
140 pooled with EC_{50} extracted from the USEPA database, as three species is too
141 few to build a good quality SSD. We fixed the measured endpoint at "Growth
142 group" to have a consistency of measured endpoint between the experimen-
143 tal and literature data, in order to produce higher quality SSDs as advised in
144 Smetanová et al. (2014). Table 2 shows the parameters set in the database to
145 obtain the data. This research returned 39 EC_{50} values for nine different species.
146 However, six datapoints were considered non-adapted to our study and thus re-
147 moved: two values were calculated based on experimental designs with only two
148 tested concentrations, which was considered too few to give good quality EC_{50} ,
149 three values were based on respectively 29 and 32 day exposures, which was
150 considered not to represent acute exposures and a last value was calculated on
151 *Oryza sativa* which was considered to be too far from the other species from a
152 biological point of view as this species is an helophyte and thus not completely

153 immersed in water. After this filtering phase, 33 different EC₅₀ for seven dif-
 154 ferent species were kept (a list of those data and associated metadata can be
 155 found in SI A). When pooled with the EC₅₀ from experimental data, 51 EC₅₀
 156 were available.

Parameter	Applied value
Chemicals	Copper
Effects	Growth group
Endpoints	EC50
Species	Flowers, Trees, Shrubs, Ferns; Moss, Hornworts
Test Conditions	Exposure Media: Water - Fresh Water

Table 2: Parameter values used for the search of data in the USEPA Ecotoxicology database. Please note that the word "Endpoint" does not have the same meaning in the USEPA database and in this paper where "endpoints" refers to the traits measured on the organisms at the end of the experiment and where the summary of species sensitivity is called critical effect concentration.

157 2.2. Species Sensitivity Distributions

158 2.2.1. Reference case - SSD without intraspecific variability

159 The dataset was used to produce an SSD that was then used as a reference.
 160 For each species, the geometric mean of the available EC₅₀ was used as this
 161 method is usually recommended in the regulatory texts and it is the more com-
 162 monly encountered in the literature. As for every other SSDs in this work, a
 163 log-normal distribution was used for the modelling. An HC₅ was then calculated
 164 on this reference SSD and will later be referred as "reference HC₅".

165 2.2.2. Modelling approaches - SSD with intraspecific variability

166 *Four scenarios of intraspecific variability.* Based on the data, we defined four
 167 scenarios of variability for the different species. The first of them traduces the
 168 full intraspecific variability whereas the three others only traduce the intergeno-
 169 typic variability of data.

170 In a "Species Specific scenario" (latter called S1), a different variability was
171 attributed to each species, based on the calculated standard deviation of their
172 log-transformed EC_{50} . This scenario encompasses all sources of variation from
173 the data (*e.g.* inter-genotype, inter-laboratory, inter-endpoint variabilities...),
174 and is thus representative of the way SSDs are applied using data from big
175 databases.

176 The three other scenarios were "generic scenarios" where the same variability
177 was attributed to every species of the dataset. These variabilities are based on
178 the calculation of standard deviations of log-transformed EC_{50} for each species
179 and endpoint couple in the experimental dataset and thus only traduce the
180 inter-genotype variability. Three distinct levels of intergenotypic variability were
181 used to assess how the magnitude of this variability affected the built SSDs and
182 derived HC_5 values. The "low variability generic scenario" (latter called S2a)
183 applies the lowest standard deviation of log-transformed EC_{50} calculated among
184 species and endpoints, the "mean variability generic scenario" (later called S2b)
185 applies the arithmetic mean of standard deviation of log-transformed EC_{50} cal-
186 culated among species and endpoints and the "high variability generic scenario"
187 (later called S2c) applies the highest standard deviation of log-transformed EC_{50}
188 calculated among species and endpoints. These scenarios were applied on two
189 distinct modelling approaches.

190 *First approach - Application of scenarios using real species.* In the first ap-
191 proach, we started from the data used to model the reference SSD (*i.e.* the
192 geometric mean of EC_{50} for each species) and, in addition to the existing in-
193 terspecific variability, we simulated an intraspecific variability for each species.
194 This thus gave access to a new dataset composed of EC_{50} for the same eight
195 species that have been resampled among the variability associated to each sce-
196 nario. The resampled EC_{50} were then implemented in an SSD and an HC_5 value
197 was then calculated. This procedure was applied ten thousand times in order
198 to obtain a distribution of SSD curves and HC_5 values. This approach allowed
199 to have a grasp of the effects of the inclusion of intraspecific/intergenotypic

200 variability with a fixed interspecific variability.

201 *Second approach - Application of scenarios using theoretical species.* In this sec-
202 ond approach, in addition to the application of an intraspecific/intergenotypic
203 variability, the interspecific variability was also modified between simulations.
204 Indeed, instead of beginning from the dataset used to model the reference SSD,
205 we simulated a new set of species, by randomly drawing EC_{50} in the reference
206 SSD, corresponding to the sensitivity to copper of theoretical species. The ef-
207 fects of species number on the HC_5 was adressed by picking either 8, 15 or 25
208 theoretical species. 8 was the number of species available in the dataset but is
209 too low to build SSDs according to most regulatory texts (10 are for example
210 mandatory in European regulation European Chemical Bureau (2003)). We
211 thus decided to select two higher number of species to generate: 15 since New-
212 man et al. (2000) showed that the variance associated to an HC_5 was minimized
213 for a number of species included between 15 and 55 and 25 that is included
214 in this interval. Each simulation was then based on these sets of theoretical
215 species for which specific variability was not available. Therefore, only generic
216 scenarios (*i.e.* scenarios S2a, S2b and S2c traducing intergenotypic variability)
217 were applied for this approach. Once the new set of species generated, the
218 rest of the procedure was similar to the first approach. This second approach
219 allowed to have a grasp of the resulting interactions between interspecific and
220 intergenotypic variabilities on SSD models and derived HC_5 values.

221 Data treatment and modelling were done using the R software (R Core
222 Team, 2019). CRCs were modelled using the drc package (Ritz et al., 2015)
223 and SSDs were estimated using the fitdistrplus package (Delignette-Muller and
224 Dutang, 2015). Graphic representations were drawn using the ggplot2 package
225 (Wickham, 2016).

226 3. Results

227 3.1. Toxicity data

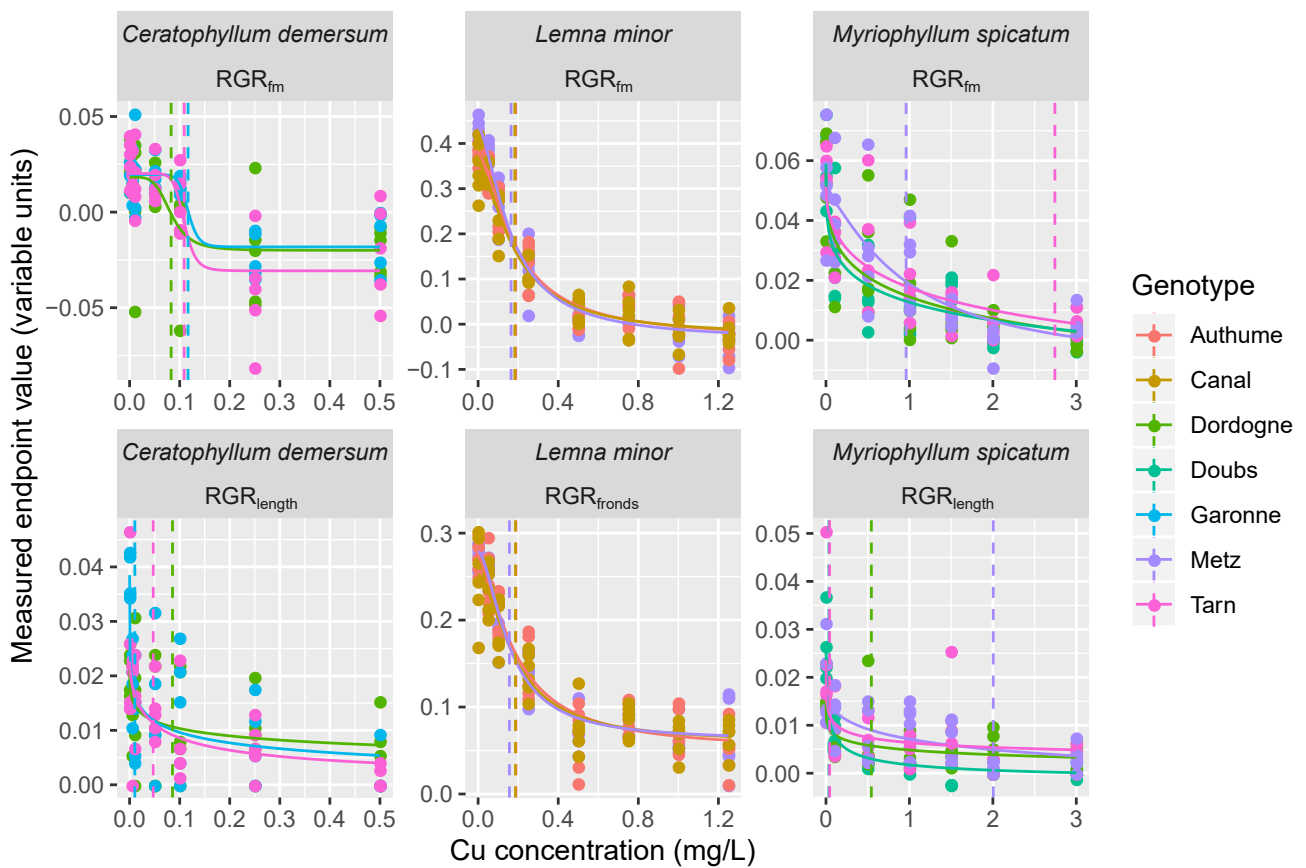
228 3.1.1. EC_{50} calculation for experimental toxicity data

229 Figure 1 shows the CRCs that were produced using the experimental data,
230 as well as the non-missing EC_{50} values derived from each of them. Those curves
231 described the data well and fits were thus considered being of good quality.
232 Differences of EC_{50} values between genotypes for a given species and endpoint
233 couple are variable. Genotype can thus have either a low influence on species
234 sensitivity to copper as for RGR_{fm} for *L. minor* or be of high importance as for
235 RGR_{length} for *M. spicatum*.

236 3.1.2. Complete dataset and scenarios of intraspecific variability

237 The calculated EC_{50} and the one extracted from the literature were added
238 together to form the full dataset. A representation of the EC_{50} for the eight
239 species can be found in Figure 2. Based on the EC_{50} data, the reference in-
240 traspecific variabilities for the four different scenarios were defined (Table 3).
241 This Table also shows the lowest, mean and highest standard deviation of log-
242 transformed EC_{50} of each species in the whole dataset (and not only on the
243 experimental data as for the values of the scenarios), in order to compare it to
244 intergenotypic variability. It evidences that the variability used for the scenario
245 S2c (*i.e.* the highest intergenotypic variability) is equal to the variability of the
246 whole dataset, meaning that the intergenotypic variability can be high enough
247 to encompass every source of intraspecific variability (Table 3). The same can
248 be observed for the scenario S2b (*i.e.* the mean intergenotypic variability), with
249 intergenotypic variability and whole dataset variability in the same order of
250 magnitude. However, the scenario S2a (*i.e.* the lowest intergenotypic variabil-
251 ity) is an order of magnitude lower at the intergenotypic level compared to the
252 whole dataset. For *E. canadensis* and *L. riparium*, only one EC_{50} was available
253 in the USEPA database. For the specific scenario, no intraspecific variability
254 was applied on those species.

Figure 1: CRCs and derived EC_{50} for the different species, measured endpoint and studied genotypes. Points correspond to the experimental data, solid lines to the modelled CRCs and dashed vertical lines to the calculated EC_{50} values. Colors discriminate the different tested genotypes and species and measured endpoints are discriminated by the different subgraphs: each line stands for a given species and the endpoints are then displayed on different subgraphs on those lines. RGR stands for Relative Growth Rates and RGR_{fm} is thus the one for fresh mass.



Scenario	Applied variability (calculated on experimental dataset)		Variability for total dataset
	First approach	Second approach	
Species specific scenario (S1)	SD of log(EC ₅₀) for each species	X	X
Low variability generic scenario (S2a)	0.081	0.081	0.882
Mean variability generic scenario (S2b)	0.961	0.961	1.21
High variability generic scenario (S2c)	1.89	1.89	1.89

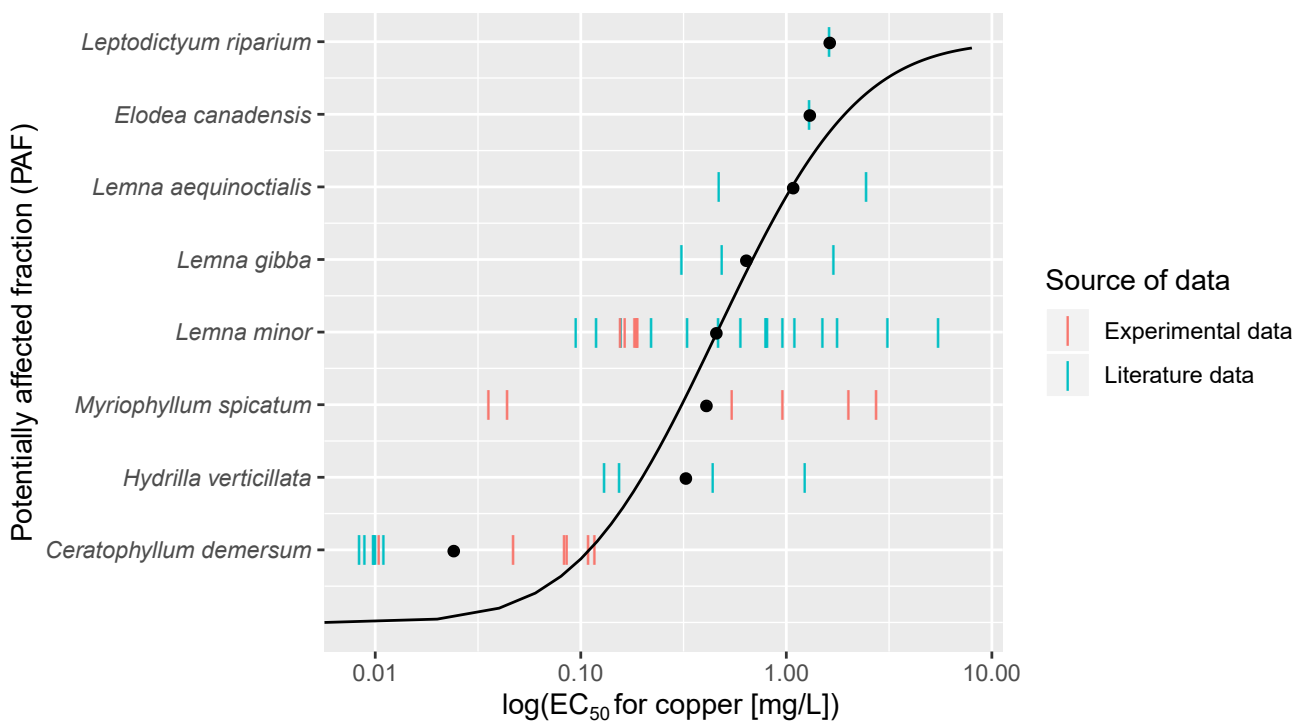
Table 3: Reference variability values for the four scenarios used in the simulations. The variability values (standard deviation of log-transformed EC₅₀ of each species) for the whole dataset are also provided in the last column for comparison. "X" signs indicates that the case is irrelevant: scenario S1 was not applied for the second approach and there was no equivalent to scenario S1 calculated for the whole dataset. Values for the S2 scenarios are the same for the two approaches.

255 3.2. Species Sensitivity Distributions

256 3.2.1. Reference case - SSD without intraspecific variability

257 The reference SSD was built using the geometric mean of EC₅₀ for each
258 species (Figure 2). The reference HC₅ derived from this SSD had a value of
259 0.0597 mg/L and the lower bound of its 95% confidence interval estimated using
260 bootstrap was 0.0194.

Figure 2: Presentation of the dataset and the reference SSD. The "|" signs represent the EC₅₀. Their colors show if the datapoints were calculated using the experimental data (in red) or extracted from the USEPA database (in blue). The black points represent the empirical cumulative distribution function of EC₅₀ geometric mean for each species and are the data used to produce the reference SSD which is represented by the solid black line. The y-axis indicates the name of the species. The x-axis, which shows the value of the EC₅₀ is in log scale.



261 3.2.2. First approach - Application of scenarios using real species

262 The SSD curves obtained using the first approach seemed consistent with
 263 the reference SSD since the reference SSD was comprised in the beam of simu-
 264 lated SSDs for the four scenarios (Figure 3). Regarding the differences between
 265 scenarios, we can see both on the simulated SSDs (Figure 3) and the distri-
 266 butions of calculated HC₅ (Figure 4) that scenario S1 gave results similar to

267 scenario S2b, meaning that a mean generic variability had the same effects than
268 a species specific variability. Variability of SSDs and HC_5 was also proportional
269 to the importance of variability for the generic scenarios, the S2a scenario giv-
270 ing less variable SSDs and HC_5 than the one given using the S2c scenario. SSD
271 shape was also different between scenarios. This can be especially visible in
272 HC_5 distributions (Figure 4) as a drift of the curves to the left as the variability
273 of generic scenario increases. This drift was quantified relatively to two vari-
274 ables, the reference HC_5 (which was compared to the mode of of the simulated
275 HC_5 distribution since it was the value simulated the most often) and the lower
276 bound of its 95% CI (which was compared to the 2.5 percentile of simulated
277 HC_5 distributions; Table 4). Modes of simulated HC_5 distributions were always
278 lower than the reference HC_5 . This difference between the two values increased
279 with the variability of the applied scenario and if this gap was negligible for the
280 S2a scenario (with a factor of 1.01), it was way greater for S2c (with a factor
281 of 10.43). However, for the lower bound of HC_5 's 95% CI, if the tendency was
282 the same concerning the effects of the importance of the applied scenario, the
283 2.5 percentile of simulated HC_5 distributions was higher than the lower bound
284 of the 95% CI of HC_5 when using the scenarios S2a and S2b.

Figure 3: SSDs produced using the first simulation method. The resampling of species' HC_5 are represented by black dots and the resulting SSDs for each scenario are drawn into red lines that are stacked to show the variability ranges. The blue dots represent the original dataset and the black line the reference mean SSD modelled from it. The horizontal grey lines show the 5% affected species. Each sub graph represents one given scenario. Only one thousand simulations are displayed for each scenario for file handling purpose.

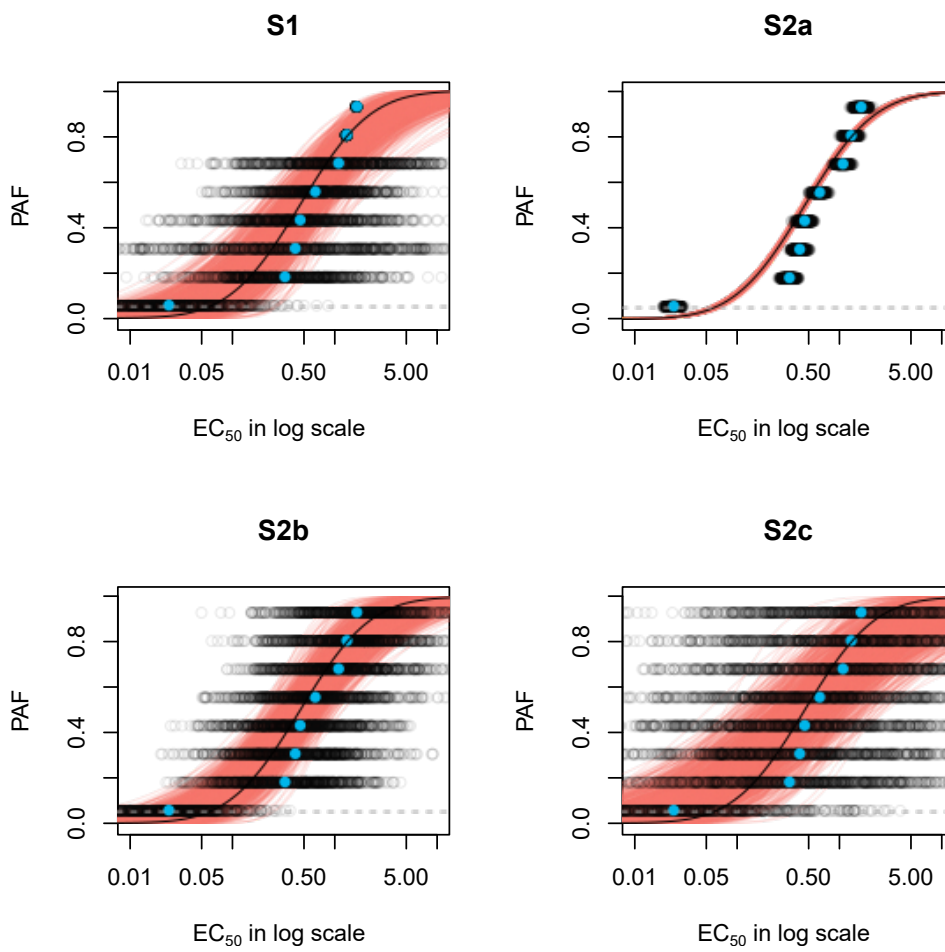
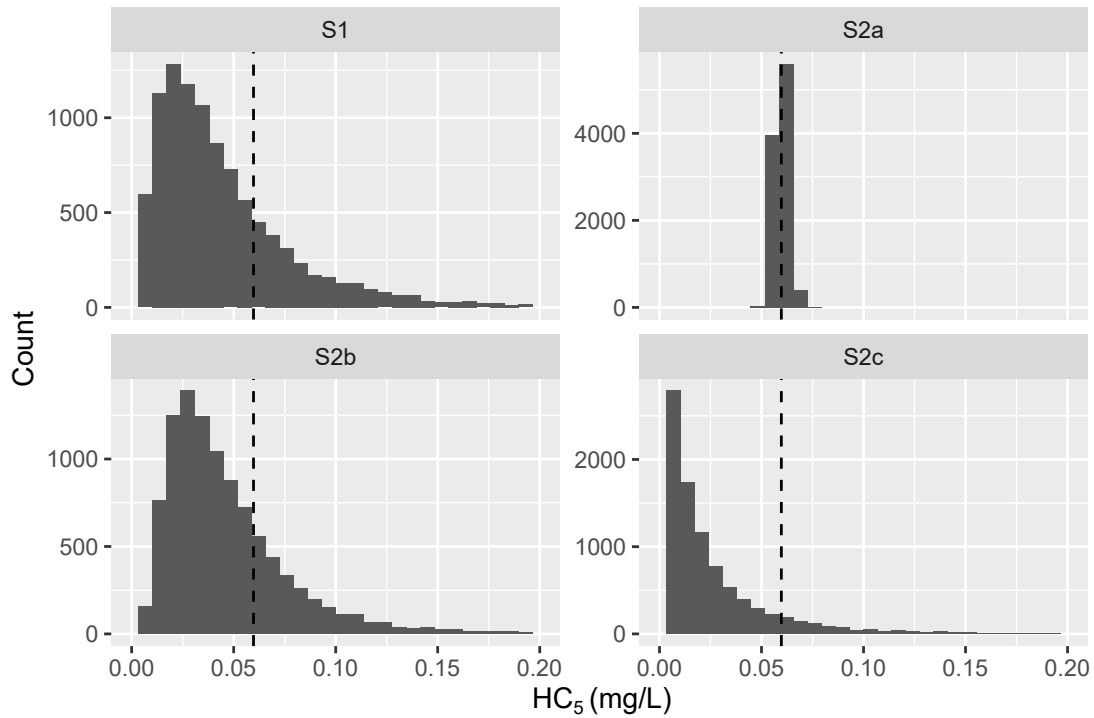


Figure 4: Histograms of HC_5 values derived from the ten thousand built SSDs using the first simulation method for the four tested scenarios (see Figure 3 for the SSDs themselves) on the different subfigures. The vertical dashed black lines show the reference HC_5 .



285 *3.2.3. Second approach - Application of scenarios using theoretical species*

286 For the second approach, whatever the applied variability scenario, similar
 287 response patterns were observed for the simulations obtained with 8, 15 and
 288 25 theoretical species concerning the SSD beams (Figure 5) and the observed
 289 densities of HC_5 (a slight raise of the mode of these distributions can however
 290 be observed when the number of species increases, Figure 6, Table 4). However,
 291 raising the number of species lead to a reduction of the variability around this
 292 mode.

293 As in the first modelling approach, reducing the applied intergenotypic vari-
 294 ability led to a reduction of the variation range of the SSDs. This variability

295 reduction was however less visible than for the first approach on SSD curves
 296 (Figure 5). The changes between scenarios is however more visible on the de-
 297 rived HC₅ (Figure 6, Table 4). The same trend than in the first approach could
 298 be seen concerning the mode and the 2.5 percentile of those distributions: tak-
 299 ing into account intergenotypic variability lead to lower HC₅ and the higher was
 300 this applied variability, the lower was the estimated HC₅.

Value measured	Scenario	First approach	Second approach		
			8 species	15 species	25 species
Mode of HC ₅	S1	0.0230 (2.59)	X	X	X
	S2a	0.0593 (1.01)	0.0489 (1.22)	0.0516 (1.16)	0.0557 (1.07)
	S2b	0.0272 (2.20)	0.0249 (2.40)	0.0271 (2.21)	0.0304 (1.97)
	S2c	0.0057 (10.43)	0.0056 (10.70)	0.0065 (9.12)	0.0079 (7.56)
2.5 percentile of HC ₅	S1	0.0074 (2.63)	X	X	X
	S2a	0.0593 (0.33)	0.0302 (0.64)	0.0299 (0.65)	0.0299 (0.65)
	S2b	0.0272 (0.71)	0.0143 (1.35)	0.0145 (1.34)	0.0147 (1.32)
	S2c	0.0057 (3.39)	0.0031 (6.24)	0.0032 (6.14)	0.0031 (6.29)

Table 4: Mode and 2.5 percentile of the HC₅ distributions for the different approaches and scenarios and their comparison to the reference HC₅ in the form of the ratio between the reference HC₅ (that had a value of 0.0597 mg/L) and the mode of the HC₅ distributions and the ratio between the lower bound of 95% CI of HC₅ (that had a value of 0.0194 mg/L) and the 2.5 percentile of the HC₅ distributions (in brackets).

Figure 5: SSDs produced using the second simulation method. The simulated HC_5 values are represented by black dots and the resulting SSDs for each scenario are drawn into red lines that are stacked to show the variability ranges. The blue dots represent the original dataset and the black line the reference mean SSD derived from it. The horizontal grey lines show the 5% affected species. Each sub graph represents one of the three generic scenario crossed with one of the tested number of generated species. Only one thousand simulations are displayed for each sub graph for file handling purpose.

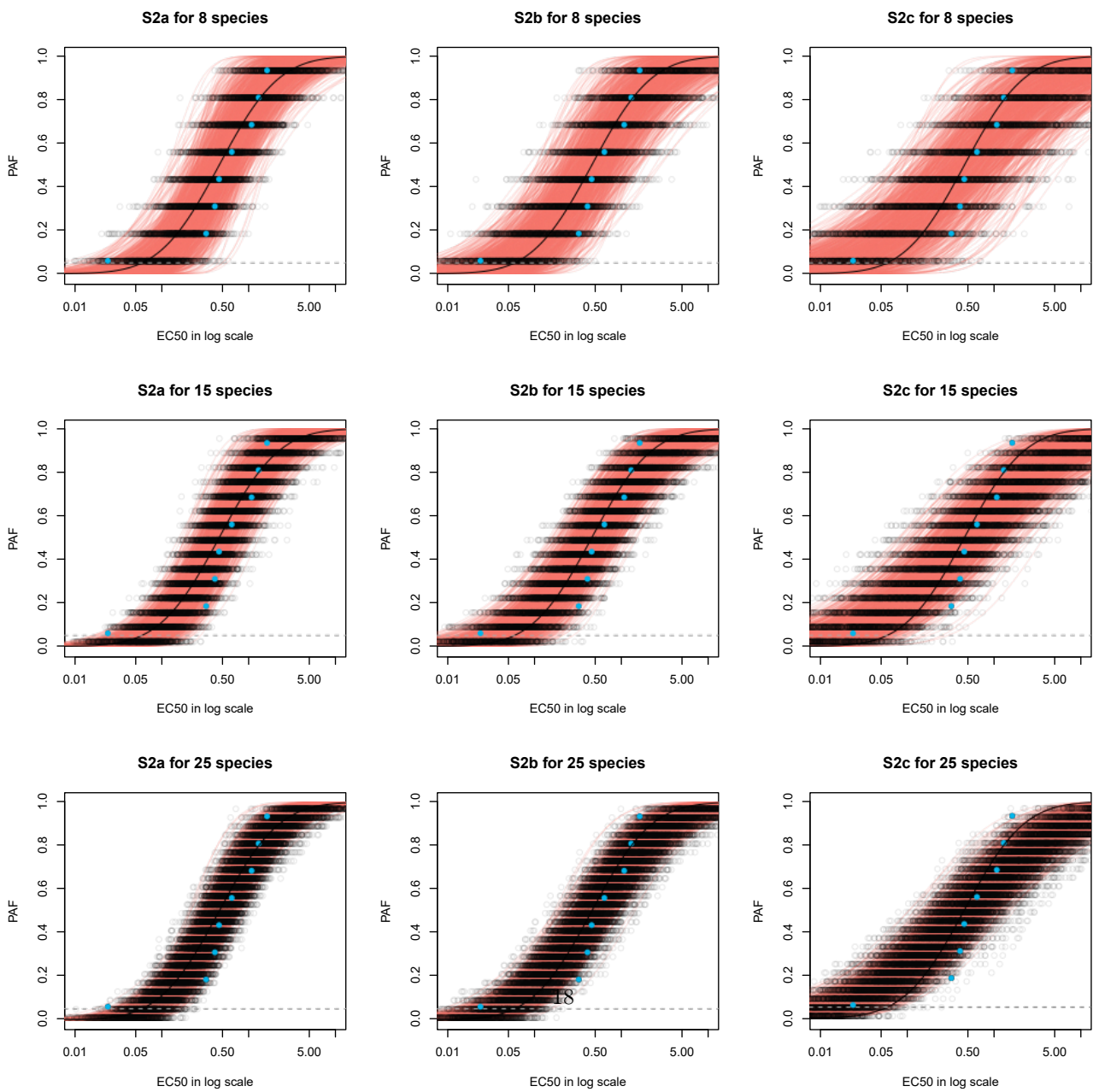
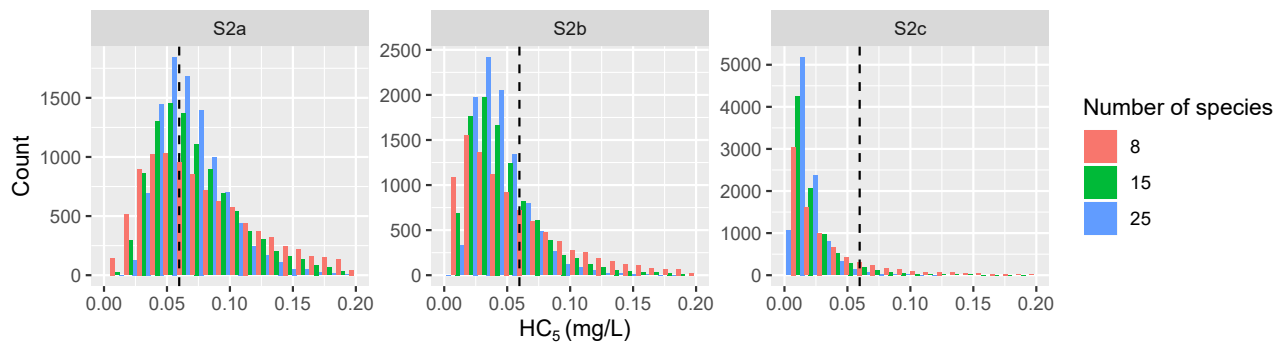


Figure 6: Histograms of HC_5 values derived from built SSDs using the second simulation method for the three tested scenarios on the different subfigures as well as different numbers of simulated species on different colors. The vertical dashed black lines show the reference HC_5 .



301 4. Discussion

302 If the effects of intergenotypic variability on organism response to chemi-
303 cal stress are well described in the literature, there is a lack of knowledge on
304 this point at the community level. In this work, we assessed this question for
305 aquatic macrophytes using raw concentration-response data from Roubeau Du-
306 mont et al. (2019) and EC₅₀ data from the USEPA database for copper expo-
307 sures. These data were included in SSD models to see how intraspecific and
308 specifically intergenotypic variability modified the SSDs and HC₅ derived from
309 them. Different intraspecific/intergenotypic variability scenarios were tested to
310 see how a varying variability could impact the SSDs. As expected, an increase
311 in intergenotypic variability was associated to an increased uncertainty in the
312 estimated HC₅. More surprisingly, this scenario also lead to lower HC₅ values
313 than in mean or lowest variability scenarios.

314 The shift of HC₅ toward lower values could be explained by the modelling of
315 a log-normal distribution, that highly relies on its tails. Applying a variability
316 on one of its two tails may lead to a less steep curve, more flat tails and thus
317 lower and more uncertain HC₅ values. The opposite could however be true de-
318 pending on the results of the samplings. The increase of HC₅ variability can
319 be explained by the fact that increasing intraspecific variability (or part of it as
320 intergenotypic variability) leads to different and more variable SSD curves and
321 thus HC₅ values. The high variability associated to HC₅ values for the species
322 specific scenario (S1) for the first approach can be explained by the repartition
323 of variability among species. This variability is of the same order of magnitude
324 for the six most sensitive species. However, for the two less sensitive species,
325 only one value for each were available in the USEPA database and thus no vari-
326 ability were applied. This means that for the specific scenario, the right tail of
327 the distribution is heavily constrained among simulations because of these two
328 points. However, as the log-normal distribution is symmetrical, this constraint
329 influenced the left tail too. The left tail was also heavily constrained by the
330 important gap between the two most sensitive species. Those two constraint

331 drawing the distribution in two opposite directions (the constraint to the right
332 tail leading to a steep distribution and the one to the left tail leading to a
333 more flat one, see Figure 3), a high variety of modelled SSDs and thus HC_5
334 emerged from the simulations. This high uncertainty around HC_5 also explains
335 the differences observed in Table 4 between the comparison of mode and the
336 2.5 percentile of HC_5 distributions against their reference counterparts. Since
337 increasing the intergenotypic variability lead to lower modes of HC_5 distribu-
338 tions and higher uncertainty around them, this resulted to lower 2.5 percentile
339 of HC_5 distributions. However, because of the high constraint on the left tail of
340 the reference SSD, the reference HC_5 was associated to a high uncertainty, lead-
341 ing to a low lower bound of the 95% CI of HC_5 , lower than the 2.5 percentile
342 of HC_5 distribution for the scenarios S2a and S2b for the first approach and
343 S2a for the second approach, but not for the S1 scenario in the first approach.
344 This phenomenon advocates for the importance of the inclusion of species with
345 low sensibility to the contaminant in SSDs: in this case, this inclusion would
346 have helped with the fit of a symmetrical SSD, which is the most commonly
347 used shape for SSDs in ERA (*e.g.* with the log-normal and the log-logistic
348 distributions).

349 The constraints on the tails and other drawbacks of the used dataset as the
350 low number of species, the discrepancies in number of EC_{50} for the different
351 species or the use of EC_{50} calculated for different endpoints (even if they were
352 all related to organism growth) could be criticized. However, the method used to
353 produce this dataset (or at least the part extracted from the USEPA database)
354 is consistent with the ones applied in the ERA processes (Posthuma et al.,
355 2001). The entirety of datapoints considered relevant to the study and of good
356 quality were kept and the built SSDs thus represent the distribution of the whole
357 available information in the base for aquatic macrophytes and mosses exposed
358 to copper and where EC_{50} were calculated and made available.

359 This work showed that, contrary to an assumption linked to the way SSDs
360 are usually built (Forbes and Calow, 2002), intraspecific variability and more
361 specifically intergenotypic variability have an effect on produced SSDs. Tak-

362 ing into account this variability tended to produce lower HC_5 values, meaning
363 that more protective results, and thus environmental risk assessment decisions,
364 could be obtained this way. The maximum observed shift between the refer-
365 ence HC_5 value and the mode of the HC_5 distribution obtained from simulation
366 was above a factor 10 (see Table 4). This value is above the usual applied AF
367 that range between 1 and 5 for SSDs depending on the reliability of the study
368 Amiard and Amiard-Triquet (2015). The value of 5 was overtaken every time
369 the S2c scenario were employed, considering the mode of the 2.5 percentile of
370 HC_5 distributions. The maximum AF value is thus too low to take into account
371 for high intergenotypic variability alone in this work. Considering a mean in-
372 tergenotypic variability (scenario S2b), this factor was comprised between 1.97
373 and 2.40, meaning that this variability alone covers close to half of the maximum
374 protectiveness the AF brings to the SSD results. Moreover, as seen in the Table
375 3, the total intraspecific variability is not much higher than the intergenotypic
376 variability when considering the mean or the highest standard deviation of the
377 log-transformed EC_{50} . This means that the effects of the whole intraspecific
378 variability may not be equal to the sum of the effects of the variabilities it
379 is composed of (*i.e.* intergenotypic variability, interendpoint variability, inter-
380 laboratory variability...). Other studies showed that phenomena other than
381 intraspecific variability could alone not always be entirely compensated by the
382 maximum AF value as interspecific competition (Baillard et al., 2020). This
383 maximum AF value of 5 could thus not be high enough to be really protective
384 for the environment and fully compensate the approximations of classical bioas-
385 says used in ERA methods. This reasoning can also be applied the other way
386 around since if we consider the S1 and S2b scenarios being the closest to the
387 reality, an SSD that does not consider intraspecific or intergenotypic variability
388 should not lead to results associated to an AF lower than 3 as the effect of
389 those variabilites was comprised between 1.32 and 2.63 (with the exception of a
390 0.71 value, Table 4) and the AF is designed to compensate for every source of
391 environmental irrelevance.

392 5. Conclusion

393 In this work, we assessed the effects of intraspecific variability and more
394 specifically intergenotypic variability on aquatic macrophyte sensibility to cop-
395 per at the community level using SSD models. The results showed that taking
396 into account these two intraspecific variabilities in simulations tended to lower
397 the derived HC₅ values. Furthermore, these HC₅ values were influenced by
398 the importance of the intraspecific variability applied: a higher intraspecific
399 variability led to lower derived HC₅. The shift in HC₅ values were plus more
400 important than the maximum usually applied AF values, meaning that in some
401 situations, those AF could not be sufficient enough to compensate for every
402 variability sources not taken into account in SSDs.

403 Associated content

404 Acknowledgements

405 References

- 406 Amiard, J.-C. and Amiard-Triquet, C. (2015). Conventional Risk Assessment
407 of Environmental Contaminants. In *Aquatic Ecotoxicology*, pages 25–49. El-
408 sevier.
- 409 Baillard, V., Sulmon, C., Bittetiere, A.-K., Mony, C., Couée, I., Gouesbet,
410 G., Delignette-Muller, M. L., Devin, S., and Billoir, E. (2020). Effect of
411 interspecific competition on species sensitivity distribution models: Analysis
412 of plant responses to chemical stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*,
413 200:110722.
- 414 Belanger, S., Barron, M., Craig, P., Dyer, S., Galay-Burgos, M., Hamer, M.,
415 Marshall, S., Posthuma, L., Raimondo, S., and Whitehouse, P. (2016). Fu-
416 ture needs and recommendations in the development of species sensitivity

- 417 distributions: Estimating toxicity thresholds for aquatic ecological communi-
418 ties and assessing impacts of chemical exposures: Advancing Species Sensi-
419 tivity Distributions in Ecotoxicology. *Integrated Environmental Assessment*
420 *and Management*, 13(4):664–674.
- 421 Delignette-Muller, M. L. and Dutang, C. (2015). fitdistrplus: An R Package for
422 Fitting Distributions. *Journal of Statistical Software*, 64(4):1–34.
- 423 European Chemical Bureau (2003). Technical guidance document on risk as-
424 sessment part II.
- 425 Forbes, V. E. and Calow, P. (2002). Species Sensitivity Distributions Revisited:
426 A Critical Appraisal. *Human and Ecological Risk Assessment: An Interna-*
427 *tional Journal*, 8(3):473–492.
- 428 Fox, D. R. and Landis, W. G. (2016). Don’t be fooled-a no-observed-effect
429 concentration is no substitute for a poor concentration-response experiment:
430 NOEC and a poor concentration-response experiment. 35(9):2141–2148.
- 431 Gottschalk, F. and Nowack, B. (2013). A probabilistic method for species sen-
432 sitivity distributions taking into account the inherent uncertainty and vari-
433 ability of effects to estimate environmental risk. *Integrated Environmental*
434 *Assessment and Management*, 9(1):79–86.
- 435 Jager, T. (2012). Bad habits die hard: The NOEC’s persistence reflects poorly
436 on ecotoxicology. 31(2):228–229.
- 437 Kon Kam King, G., Larras, F., Charles, S., and Delignette-Muller, M. L.
438 (2015). Hierarchical modelling of species sensitivity distribution: develop-
439 ment and application to the case of diatoms exposed to several herbicides.
440 *arXiv:1501.05230 [stat]*.
- 441 Newman, M. C., Ownby, D. R., Mezin, L. C., Powell, D. C., Christensen, T. R.,
442 Lerberg, S. B., and Anderson, B.-A. (2000). Applying species-sensitivity
443 distributions in ecological risk assessment: assumptions of distribution type

444 and sufficient numbers of species. *Environmental toxicology and chemistry*,
445 19(2):508–515.

446 OECD (2002). Oecd guidelines for the testing of chemicals: Lemna sp. growth
447 inhibition test, guideline 221.

448 OECD (2014a). Oecd tg 238 guidelines for the testing of chemicals sediment-free
449 myriophyllum spicatum toxicity test.

450 OECD (2014b). Oecd tg 239 guidelines for the testing of chemicals water-
451 sediment myriophyllum spicatum toxicity test introduction.

452 Picado, A., Chankova, S., Fernandes, A., Simões, F., Leverett, D., Johnson, I.,
453 Hernan, R., Pires, A. M., and Matos, J. (2007). Genetic variability in Daph-
454 nia magna and ecotoxicological evaluation. *Ecotoxicology and Environmental*
455 *Safety*, 67(3):406–410.

456 Posthuma, L., Suter II, G. W., and Traas, T. P. (2001). *Species sensitivity*
457 *distributions in ecotoxicology*. CRC press.

458 R Core Team (2019). *R: A Language and Environment for Statistical Comput-*
459 *ing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

460 Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., and Gerhard, D. (2015). Dose-Response
461 Analysis Using R. *PLOS ONE*, 10(12):e0146021.

462 Roubeau Dumont, E., Larue, C., Lorber, S., Gryta, H., Billoir, E., Gross, E. M.,
463 and Elger, A. (2019). Does intraspecific variability matter in ecological risk
464 assessment? Investigation of genotypic variations in three macrophyte species
465 exposed to copper. *Aquatic Toxicology*, 211:29–37.

466 Smetanová, S., Bláha, L., Liess, M., Schäfer, R., and Beketov, M. (2014). Do
467 predictions from Species Sensitivity Distributions match with field data? *En-*
468 *vironmental Pollution*, 189:126–133.

469 Toumi, H., Boumaiza, M., Millet, M., Radetski, C. M., Camara, B. I., Felten, V.,
470 and Ferard, J.-F. (2015). Investigation of differences in sensitivity between

- 471 3 strains of *Daphnia magna* (crustacean Cladocera) exposed to malathion
472 (organophosphorous pesticide). *Journal of Environmental Science and Health,*
473 *Part B*, 50(1):34–44.
- 474 Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-
475 Verlag New York.
- 476 Wigger, H., Kawecki, D., Nowack, B., and Adam, V. (2020). Systematic Con-
477 sideration of Parameter Uncertainty and Variability in Probabilistic Species
478 Sensitivity Distributions. *Integrated Environmental Assessment and Manage-*
479 *ment*, 16(2):211–222.

2.3 Tentative de généralisation

Disclaimer : Cette section n'a absolument pas pour but de critiquer les auteurs de la publication citée que nous profitons de saluer et remercier par la présente. Cet article est utilisé comme exemple ici car les données brutes nous ont aimablement été fournies et que ce cas nous semble représentatif d'une tendance parfois observable dans la production scientifique.

Les travaux présentés dans ce chapitre ont fait l'objet de tests préliminaires multiples réalisés par Laurine Malardier, à l'époque stagiaire en Master 1. Cependant, seule la moitié des travaux alors effectués ont été conservés ici. Ces travaux préliminaires incluaient en effet un second volet testant les mêmes hypothèses sur un jeu de données publié [ESTEVES et collab., 2017], un contact avec les auteurs ayant permis d'avoir accès aux données brutes issues des expérimentations réalisées. Ce jeu de données contient les résultats de bioessais écotoxicologiques sur quatorze espèces de diatomées exposées à quatre herbicides (atrazine, terbutryn, diuron et isoproturon). La variabilité intraspécifique de la sensibilité aux herbicides testés a été évaluée pour deux espèces, *Nitzschia palea* et *Achnanthydium* spp. via le test de différentes souches pour chacune. Ce design expérimental aurait permis de produire le même type d'évaluation que celle présentée plus haut, à savoir l'évaluation des effets de la variabilité intraspécifique sur les résultats de SSD, les variabilités intra et interspécifiques ayant été évaluées dans le jeu de données. Réaliser la même approche sur un autre jeu de données comme celui-ci aurait ainsi permis d'évaluer la robustesse et la reproductibilité de nos résultats.

Si ces évaluations ont effectivement été effectuées lors des travaux préliminaires susmentionnés, ils n'ont pas été conservés dans les travaux finaux pour les raisons suivantes. La publication d'ESTEVES et collab. [2017] contient un tableau récapitulant les valeurs d'EC₅₀ calculées à partir des données pour chaque espèce de diatomées et chaque souche lorsque plusieurs ont été testées ainsi que l'erreur standard associée à chaque EC₅₀. Un protocole de calcul de ces EC₅₀ est donné dans la publication, contenant notamment le nom du package R utilisé (en l'occurrence, "drc" [RITZ et collab., 2015]) et les modèles utilisés afin de décrire les relations concentration-réponse, à savoir un modèle log-logistique à quatre paramètres identique à celui utilisé pour nos travaux sur les macrophytes et un modèle de Cedergreen-Ritz-Streibig lorsqu'un effet d'hormèse était présent suite à une inspection visuelle des données. Cet article mentionne également que le modèle obtenu par cette procédure pour l'une des relations concentration-réponse n'était pas satisfaisant lorsque comparé aux données observées. Dans ce cas, l'EC₅₀ a été "mesurée manuellement", c'est à dire que la valeur maximale testée pour l'herbicide a été définie comme EC₅₀.

Malgré la présence de ces informations, il nous a cependant été impossible de retrouver les résultats contenus dans le tableau des EC₅₀ de la publication à partir des données brutes fournies. Pour commencer, la publication n'indique pas lequel des deux modèles a été utilisé pour modéliser chaque relation concentration-réponse. Avec un total de 39 taxons testés, chacun contre quatre herbicides, ce sont 156 relations qu'il aurait fallu examiner à l'oeil. Nous avons choisi une autre approche et avons modélisé chaque relation concentration-réponse avec les deux modèles possibles, calculé les EC₅₀ correspondants et comparé ces valeurs obtenues à celles du tableau publié. Les cas pour lesquels nous sommes ainsi parvenus à retrouver la valeur exacte donnée dans le tableau de la publication se sont révélés rares. Les EC₅₀ calculées se sont parfois avérées proches de celles données dans le tableau (avec parfois une différence présente à la seconde ou troisième décimale), mais se sont d'autres fois montrées très éloignées. De plus, pour certaines valeurs, des données manquantes étaient présentes pour les écarts moyens associés aux valeurs d'EC₅₀ sans qu'une explication soit fournie. Suite à ces observations, il a été décidé de se concentrer sur le jeu de données sur les macrophytes présenté plus tôt dans cette section.

Plusieurs explications pourraient permettre d'expliquer ces différences. Premièrement, le jeu de données brutes qui nous a été fourni pourrait ne pas avoir été celui ayant été publié. Les analyses ont en effet été effectuées par quelqu'un ne faisant plus partie de l'équipe avec laquelle nous avons eu contact et nous n'avons pas pu avoir confirmation qu'il s'agissait effectivement du bon fichier final. Nous pensons de plus que des coquilles pourraient exister dans le tableau de la publication. Certaines valeurs présentes semblent en effet assez peu fiables comparées aux autres comme par exemple la valeur 0.0427 ± 1.7799 dont l'écart-moyen semble peu compatible avec la valeur d'EC₅₀ associée ou encore la valeur 0.0001 ± 0.0002 qui semble très éloignée des autres valeurs présentes dans le tableau et paraît irréaliste dans sa pertinence quand comparée aux concentrations en contaminant testées. Ces potentielles coquilles pourraient être apparues lors de la rédaction du tableau par les auteurs ou lors du processus éditorial ayant conduit à la publication de l'article.

Cet exemple n'est pas vraiment un cas isolé et illustre une pratique parfois observable dans les publications en écotoxicologie, à savoir le manque général de précision de la section "*Methods*" correspondant au traitement des données. Certains articles se contentent par exemple d'indiquer que des EC₅₀ ont été calculées sans préciser de quelle manière ou sans indiquer quel modèle ou encore outil a été utilisé pour ce faire, même si ces pratiques tendent à disparaître. Les méthodes de production des écarts-moyens sont très rarement explicités et cela est parfois couplé à une représentation malhabile des données (avec par exemple des intervalles formés par les erreurs

moyennes incluant des valeurs négatives dans le cas de mesures pouvant être exclusivement positives). Ces pratiques ne sont cependant probablement pas conscientes et ne sont surtout pas inhérentes au monde de l'écotoxicologie, des exemples similaires pouvant être relevés dans tous les pans de la production scientifique.

Ces considérations mises à part, les résultats obtenus lors de ces travaux préliminaires sur les diatomées se sont avérés très intéressants une fois mis en relation avec les travaux présentés ci-avant dans le chapitre 2 puisque les effets observés de la variabilité intraspécifique sur les SSD et les HC₅ finales étaient comparables à ceux observés pour les macrophytes.

Chapitre 3

Effets de la compétition interspécifique sur les SSD

« *Finding your bug is a process of confirming the many things that you believe are true – until you find one which is not true.* »

Norm Matloff

Sommaire

3.1 Présentation	76
3.2 Approche classique	76
3.2.1 Présentation	76
3.2.2 Article publié dans <i>Ecotoxicology and Environmental Safety</i>	77
3.2.3 Ce qui n'a pas été conservé dans l'article	111
3.2.3.1 Autres méthodes de sélection des groupes d'espèces, endpoints et modalité de compétition présentant une réponse à l'isoproturon	111
3.2.3.2 Autres modèles permettant de décrire la concentration concentration-réponse	112
3.2.3.3 Autre méthode de construction des SSD	115
3.3 Approche hiérarchique	118
3.3.1 Présentation	118
3.3.2 Bases théoriques de l'approche bayésienne	118
3.3.2.1 Paradigmes fréquentiste et bayésien	118
3.3.2.2 Théorème de Bayes	119
3.3.2.3 Méthodes de Monte-Carlo par chaînes de Markov	120
3.3.2.4 Algorithme de Metropolis-Hastings	121
3.3.2.5 Algorithme de Gibbs	121
3.3.2.6 Modèle et DAG	122
3.3.2.7 Pourquoi l'inférence bayésienne?	122
3.3.3 Article publié dans <i>Science of the Total Environment</i>	123

3.1 Présentation

L'objectif de cette partie était d'étudier les effets d'un facteur précis de variabilité pouvant être pris en compte dans les bioessais en écotoxicologie, la compétition interspécifique. Ces effets ont été évalués à l'échelle de l'organisme ainsi qu'à l'échelle de la communauté grâce à un jeu de données issu de bioessais en concentration-réponse pour six espèces de plantes herbacées (*Arrhenatherum elatius*, *Dactylis glomerata*, *Lolium multiflorum*, *Poa pratensis*, *Poa trivialis* et *Trisetum flavescens*) exposées à de l'isoproturon et soumises à deux situations de compétition, avec et sans organismes compétiteurs issus d'une septième espèce (*Bromus erectus*). Douze endpoints différents ont été estimés sur les individus testés afin d'étudier la différence de réaction à l'isoproturon des organismes sur plusieurs points de santé des individus. Le protocole expérimental précis peut être trouvé dans l'article [BAILLARD et collab. \[2020\]](#) dont le texte complet se situe en Section 3.2.2. Ces données ont été traitées de deux manières différentes au sein de deux approches indépendantes appelées respectivement "classique" et "hiérarchique". Il est cependant à noter que ces données ont été obtenues avant le début de ces travaux de thèse, ceux-ci ne portant ainsi que sur le traitement et la modélisation desdites données.

3.2 Approche classique

3.2.1 Présentation

L'approche classique porte ce nom car elle visait à se rapprocher au plus près de la manière dont ces données auraient pu être traitées au sein d'une approche d'ERA. Les données ont en effet en premier lieu été filtrées afin de ne conserver que les combinaisons d'espèce, endpoint et modalité de compétition (144 groupes au total) pour lesquels une variation de l'endpoint mesuré pouvait être observée en fonction de la concentration en isoproturon. Les sous jeux de données (*i.e.* correspondant à chacun des 144 groupes) ont ensuite été modélisés sous la forme de CRC traduisant la réponse des organismes à l'exposition en isoproturon. Ces CRC ont été résumées par le calcul de quatre différentes CEC pour chacune (EC_{10} , EC_{50} , BMD_{1sd} , BMD_{2sd}). Ces CEC ont enfin été intégrées au sein de courbes SSD suivant quatre modalités différentes de gestion des données multiples pour chaque espèce, la sensibilité de chacune d'entre elles au contaminant ne devant être résumée que par une seule valeur (voir article complet en Section 3.2.2 pour le détail). Il a ainsi été possible d'estimer l'effet final de la compétition interspécifique sur les SSD produits en comparant les courbes produites avec des données pour des organismes non soumis à un stress

compétitif et des organismes soumis à un stress compétitif. Cette étude a également permis de montrer de quelle manière les résultats observés étaient modifiés par les choix de modélisation réalisés (type de CEC à utiliser et méthode de gestion des CEC multiples pour une même espèce).

3.2.2 Article publié dans *Ecotoxicology and Environmental Safety*

A partir de la page suivante se trouve la "version auteur" de l'article **BAILLARD et collab. [2020]** publié dans le journal *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Le *Supplementary Information* de cet article peut être trouvé en Annexe [A.1](#).

Effect of interspecific competition on species sensitivity distribution models: analysis of plant responses to chemical stress

Vincent BAILLARD^{a,*}, Cécile SULMON^b, Anne-Kristel BITTEBIERE^c,
Cendrine MONY^b, Ivan COUEE^b, Gwenola GOUESBET^b, Marie Laure
DELIGNETTE-MULLER^d, Simon DEVIN^a, Elise BILLOIR^a

^a *Université de Lorraine, CNRS, LIEC, F-57000 Metz, France*

^b *Univ Rennes, CNRS, ECOBIO [(Ecosystèmes, biodiversité, évolution)] - UMR 6553,
F-35000 Rennes, France*

^c *Université de Lyon 1, CNRS, UMR 5023 LEHNA, 43 Boulevard du 11 novembre 1918,
Villeurbanne Cedex, 69622, France*

^d *Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, VetAgro Sup, UMR 5558, Laboratoire de
Biométrie et Biologie Evolutive, 69622 Villeurbanne, France*

Keywords: Species Sensitivity Distribution, environmental risk assessment, isoproturon, herbicide, biotic interaction, multi-stress

1 **ABSTRACT**

2 Species Sensitivity Distributions (SSD) are widely used in environmental risk
3 assessment to predict the concentration of a contaminant that is hazardous for
4 5% of species (HC₅). They are based on monospecific bioassays conducted in
5 the laboratory and thus do not directly take into account ecological interactions.
6 This point, among others, is accounted for in environmental risk assessment
7 through an assessment factor (AF) that is applied to compensate for the lack of
8 environmental representativity. In this study, we aimed to assess the effects of
9 interspecific competition on the responses towards isoproturon of plant species
10 representative of a vegetated filter strip community, and to assess its impact on
11 the derived SSD and HC₅ values. To do so, we realized bioassays confronting six
12 herbaceous species to a gradient of isoproturon exposure in presence and absence
13 of a competitor. Several modelling approaches were applied to see how they
14 affected the results, using different critical effect concentrations and investigating
15 different ways to handle multiple endpoints in SSD. At the species level, there
16 was a strong trend toward organisms being more sensitive to isoproturon in

*Corresponding author

Email address: vincent.baillard@univ-lorraine.fr (Vincent BAILLARD)

17 presence of a competitor than in its absence. At the community level, this trend
18 was also observed in the SSDs and HC₅ values were always lower in presence of
19 a competitor (1.12 to 11.13 times lower, depending on the modelling approach).
20 Our discussion questions the relevance of SSD and AF as currently applied in
21 environmental risk assessment.

22 1. Introduction

23 Long-term anthropogenic activities disrupt the environment. Due to the
24 complexity of the interactions between living organisms, the accurate evaluation
25 of the effects of these disturbances is delicate. Environmental Risk Assessment
26 (ERA) is used to quantify the risk posed by contaminants and other environ-
27 mental perturbations to living organisms. It mainly consists in the derivation
28 of Predicted Environmental Concentration (PEC) and their comparison to Pre-
29 dicted No Effect Concentration (PNEC) to assess the risk of chemicals on the
30 environment (Amiard and Amiard-Triquet [2015]). Assessment factors (AF) are
31 applied to secure the procedure. Such AF take into account the lack of real-
32 ism of some conditions of classical ecotoxicological experiments and thus aim
33 to extrapolate to realistic environmental conditions by including biotic interac-
34 tions, intraspecific variability or intra and interlaboratory variability (Amiard
35 and Amiard-Triquet [2015]). The different ERA methods are divided in 4 tiers
36 (Aagaard et al. [2013]), the higher tiers using more ecologically relevant data.
37 Results from methods of higher tiers (*i.e.* more environmentally relevant meth-
38 ods) are divided by lower AF than those obtained by lower tier methods.

39 The Species Sensitivity Distribution (SSD; Kooijman [1987], Posthuma et al.
40 [2001]) is a tier 2 ERA method made to produce PNEC at the community level
41 for a given contaminant using data obtained from monospecific tier 1 bioassays.
42 The SSD is a distribution of CECs (Critical Effect Concentrations such as Ef-
43 fective Concentrations (EC) or Benchmark Doses (BMD)) obtained for different
44 species for a given contaminant. The species under study have to be chosen to

45 be consistent with the mode of action of the studied contaminant and represen-
46 tative of the considered environment (Van den Brink et al. [2006]). The SSD
47 can lead to the derivation of the Hazardous Concentration for five percent of
48 the species (HC₅). This value, after application of an AF (ranging from 1 to 5
49 for SSDs; Amiard and Amiard-Triquet [2015]), is commonly used in SSD-based
50 ERA (for example in the United States of America: Stephan et al. [1985] and
51 the European Union: European Chemical Bureau [2003]). The SSD method is
52 however based on several assumptions listed in Forbes and Calow [2002] that
53 still need to be tested.

54 In particular, very few attempts have been realized to test the effects of
55 biotic interactions on organisms response against contaminants. In the field, or-
56 ganisms are however affected by different types of biotic interactions that can be
57 intra or interspecific. Those interactions can have positive (comensalism, sym-
58 biosis or facilitation for example) or negative (competition for example) effects
59 on the organism fitness. Biotic interactions can therefore lead to modifications
60 of the effects of contaminants the organisms are exposed to. For example, Foit
61 et al. [2012] used a dose-response design to test the effects of intra and inter-
62 specific competition on *Daphnia magna* and *Culex pipiens molestus* response
63 to fenvalerate. They found that competition tended to increase the toxic effect
64 of fenvalerate on the two tested organisms and modified community dynam-
65 ics, meaning that toxic exposure might disturb natural community for a longer
66 period than predicted by monospecific bioassays alone. Gust et al. [2016] inves-
67 tigated the effects of intraspecific competition on *Daphnia magna*'s tolerance to
68 copper and lead using a dose-response design. They concluded that intraspe-
69 cific competition tended to increase *Daphnia magna* mortality caused by Cu
70 and Pb. Viaene et al. [2015] modeled the effects of intraspecific competition,
71 interspecific competition by *B. calyciflorus* and predation by *Chaoborus* sp. (at
72 low and high densities plus control for each type of biotic interaction) on the
73 response of *Daphnia magna* against pyrene. They found that predation had the
74 highest negative effect on daphnia density under chemical stress and that com-
75 petition and predation tended to have antagonistic effects on daphnia tolerance

76 to pyrene. One of the hypothesis for this unexpected effect was that pyrene
77 would have modified the community composition, leading to reduced negative
78 biotic interactions. These studies all used macroinvertebrate species and mostly
79 *Daphnia magna*, and their conclusions need to be extended to other taxonomic
80 groups. For plants, which represent a key compartment of the ecosystems, very
81 few studies have been conducted to test interaction effects between biotic inter-
82 actions, such as competition, and chemical stress responses. Such a question is
83 however essential for sessile organisms like plants, since they need to be toler-
84 ant to all local negative environmental conditions to survive and maintain their
85 population. Results mainly highlighted the existence of interactions between
86 chemical stress responses and competitive interactions between plant species
87 (Boutin et al. [2019], Damgaard et al. [2014]), reinforcing the need to take into
88 account such biotic interactions in ERA procedures.

89 To our knowledge the effects of biotic interactions on SSD results were in-
90 vestigated in only one study by De Laender et al. [2008]. In this study, the
91 effects of ecological interactions on SSD results were assessed by a mechanistic
92 dynamic ecosystem model involving two phytoplankton, three zooplankton and
93 one fish compartments and interspecific interactions between them (predation,
94 competition...). A toxic effect submodel, embedded in the ecosystem model, de-
95 scribed the effects of the toxicants on the parameters of the ecosystem model
96 (potentially affected parameters were mortality rate for zooplankton and fish
97 and photosynthesis rate for phytoplankton). One thousand theoretical contami-
98 nants were used with randomized 10% effect concentration (EC_{10}) values drawn
99 from a log-normal distribution (SSD without taking ecological interactions into
100 account). Those EC_{10} values were used in the mechanistic dynamic ecosys-
101 tem model, thus simulating the subsequent modifications of the ecosystem fate.
102 New EC_{10} values derived from those simulations were calculated to obtain SSD
103 taking ecological interactions into account. For about 25% of those 1000 con-
104 taminants (254) taking into account biotic interactions led to a change in mean
105 (190), standard deviation (94) or both (30) of the SSD compared to the one
106 derived from EC_{10} produced without taking into account those interactions.

107 Moreover, results showed that this trend was higher for herbicides, implying,
108 that the derived HC₅ would have great chances to be different. However, this
109 work needs to be confirmed by data-based studies and to be extended to other
110 types of communities.

111 Large amount of pesticides are used worldwide to treat a wide diversity of
112 human-made systems. This is the case of croplands to ensure high agricultural
113 productivity, but also of vegetated sport fields and green spaces, to control
114 specific plant composition (Alavanja [2009]). Pesticides have effects on the tar-
115 geted organisms within the treated areas but also on non-targeted organisms
116 outside those areas (Crone et al. [2009]). Indeed, due to drift, leaching, and
117 runoff, those contaminants are found in terrestrial (Geiger et al. [2010]) but
118 also largely in aquatic ecosystems (Anderson et al. [2015], Annett et al. [2014],
119 McMahan et al. [2012]). Isoproturon, for example, is a substituted urea photo-
120 synthesis inhibitor, which is often used as a pre- and post-emergence herbicide in
121 cereal crops. Before its banning in the EU in 2017 because of potential ground-
122 water contamination and risks to aquatic life (European Commission [2016]),
123 isoproturon showed a median concentration of 0.02 mg/kg of soil in investigated
124 European agricultural soils (Silva et al. [2019]). The degradation and fate of
125 isoproturon has also been studied. Johnson et al. [1994] showed that 7 days
126 after isoproturon treatment, concentrations were about 9 mg/kg of soil, after 78
127 days this concentration was about 1 mg/kg of soil and after 155 days this con-
128 centration was above 0.5 mg/kg of soil. More generally, isoproturon was also
129 found to contaminate rivers from one year to another (Dragon et al. [2019]),
130 and to persist in the soil for at least 3 years after application allowing it to be
131 mobilised by increasing rainwater (Johnson et al. [2001]). It is thus clear that
132 a wide diversity of communities, within or outside pesticide-treated areas, are
133 exposed to numerous pesticides, with concentrations ranging from residual to
134 acute levels. But these communities, associating several species, are also the
135 site of numerous biotic interactions, such as competition. This is particularly
136 the case for plant communities, which, as sessile organisms, may thus be sub-
137 mitted simultaneously to both pesticide exposure and potentially strong biotic

138 interactions. Plant communities are therefore a relevant community model to
139 test the assumption: "Interactions between species do not influence the sen-
140 sitivity distribution" highlighted by Forbes and Calow [2002] about the SSD
141 method. Considering the studies listed above, we expected that 1) interspecific
142 competition would have a negative effect on organism responses to toxicants in
143 our study and that 2) the protective concentration for 95% of species would be
144 lowered by interspecific competition. To test these assumptions, a dataset of
145 monospecific bioassays results on 6 herbaceous species exposed to isoproturon
146 in presence and absence of competition was produced. We then built SSDs
147 with and without competition and compared them. For this purpose, we tried
148 to characterize the effects of interspecific competition on SSD results using a
149 variety of CECs as well as endpoints and ways to handle them.

150 2. Materials and methods

151 2.1. Dataset

152 2.1.1. Tested species and competitor species

153 Six herbaceous grass species were chosen as representative of a model vege-
154 tated filter strip community. They were selected to represent the natural plant
155 diversity existing in terms of isoproturon tolerance and of competitive abil-
156 ity: *Dactylis glomerata*, *Lolium multiflorum*, *Arrhenatherum elatius*, *Trisetum*
157 *flavescens*, *Poa pratensis*, *Poa trivialis*. *Bromus erectus* was chosen as a com-
158 petitor species to ensure a competitor pressure as constant as possible along
159 the experiment duration. All the seeds were obtained from the Phytosem seed
160 company (Gap, Hautes-Alpes, France).

161 2.1.2. Experimental design

162 The pesticide used for exposure was isoproturon, a phenyl-urea photosystem
163 II inhibitor. Despite its recent banning in EU, isoproturon environmental per-
164 sistence, use in some no-EU countries, and common mode of action, similar to
165 numerous worldwide used herbicides, still make this molecule a relevant pesti-
166 cide model to study (Alberto et al. [2018], Eker [2019], Johnson et al. [2001]).

167 Ecotoxicological bioassays were realized for the six tested species and the two
168 competition modalities (absence or presence of the competitor). Experiments
169 were realized in microcosms under controlled conditions (20°C ; 16 hours day
170 of light at 120 μ mol photons/m²/s). Three-liter-round microcosms (20 cm di-
171 ameter, 12.9cm height) containing inert sterilized vermiculite as substrate were
172 vegetalised by transferring seedlings at 2-leaves phenological stage previously
173 grown from seeds in the absence of chemical stress. For each microcosm, one
174 seedling of the tested species was placed at the center of the enclosure, and
175 for the competition treatment, 37 seedlings of *Bromus erectus* were planted
176 according to a standardized hexagonal pattern corresponding to 3 circles of,
177 respectively, 6, 12, and 19 seedlings at equal distance (Birch et al. [2007]). Mi-
178 crocosm contamination with isoproturon began after a 4-days acclimatization.
179 Plant exposure to isoproturon was carried out by substrate watering in order to
180 induce root chemical exposure. Continuous chemical stress was performed by
181 watering the device with 150 mL of contaminated nutritive solution [Hoagland
182 basal salt mix (No2, Caisson Laboratories, Smithfield, UT, USA) at 0.82 g/L,
183 pH6] twice a week during the 25 days experiment. Five isoproturon (Cluzeau
184 Indo Labo, Sainte Foy la Grande, France) concentrations (0.25, 0.5, 1, 1.5 and
185 1.75 μ M, corresponding to, respectively, 51.5, 103, 206, 309, and 360 μ g/L) plus
186 a control were used. For each concentration (6 concentrations including the
187 control) and each competition modality (absence or presence of competitor),
188 eight replicates were realized, leading to 96 microcosms per tested species.

189 2.1.3. Studied endpoints and metrics

190 At the end of the experiment, eleven endpoints were measured on the tested
191 species, and an additional metric of dry mass (DM) ratio was calculated. These
192 endpoints were chosen in order to detect the effects of the different treatments
193 (herbicide exposure, competition) applied to the tested species in light of the
194 literature. In addition to global traits (DM traits, shoot height, root length),
195 some traits were preferentially chosen for their responses to herbicide (meximum
196 efficiency of photosystem II determined from Fv/Fm, pigment contents), and to

197 competition (root/shoot DM ratio, Specific Leaf Area (SLA), Leaf Dry Mat-
198 ter Content (LDMC), and ligula height corresponding to stem height). Fv/Fm
199 chlorophyll fluorescence and pigment contents were measured as previously de-
200 scribed in Serra et al. [2013]. SLA and LDMC were quantified as described
201 in Cornelissen et al. [2003]. *Bromus* shoot dry biomass was also weighted, for
202 each microcosm, at the end of the experiment. Analysis of these DM data
203 showed that mean *Bromus* shoot DM was similar between species and isopro-
204 turon treatments, thus allowing to compare all treatment modalities carried out
205 in the experiment.

206 2.2. Data analysis

207 Critical Effect Concentration values are the elementary components neces-
208 sary to build SSD. Those CECs were obtained following a stepwise procedure: 1)
209 transformation of data for some endpoints, 2) selection of responsive endpoints
210 for a given species, 3) fitting of concentration-response curves, 4) derivation of
211 CEC values from the fits. The whole modelling process was implemented under
212 the R environment (version 3.5.2; R Core Team [2019]).

213 2.2.1. Data transformations

214 Concentration-response curves fitting using non-linear regression assumes a
215 Gaussian error model. Accordingly, the first step was to apply a transforma-
216 tion on response for some endpoints as an attempt to improve homoscedastic-
217 ity and residuals normality. For each endpoint, we built two ANOVA models
218 where measured values were explained by species, competition modality and iso-
219 proturon concentration combinations so that the remaining variability is only
220 inter-replicate variability: one model was built with raw data and the other
221 after transformation of the data.

222 We then visually inspected the residuals of the models to see if the trans-
223 formation improved homoscedasticity and residuals normality and in that case,
224 we kept it. Different transformations were tested, depending on the considered
225 endpoint. For the Fv/Fm chlorophyll fluorescence endpoint, which is a propor-

226 tion, we applied a logit transformation ($\log(p/(1-p))$) to change its scale, after
227 having previously changed the 0 values (3 out of 471 Fv/Fm measurements) to
228 0,01 (corresponding to about one fourth of the lowest non-zero value of 0,0395).
229 For every other endpoint, a log transformation was tested.

230 2.2.2. Selection of responsive endpoints

231 Some of the measured endpoints did not present any variation against the
232 isoproturon treatment. Concentration-response modelling was meaningless in
233 such cases and led to numerical issues. A selection step was therefore applied
234 to keep "responsive" endpoints for each species i.e. those that have exhibited
235 variations according to isoproturon concentration. With six species, eleven end-
236 points and two competition modalities, we had 132 subdatasets. It would have
237 been complicated to inspect visually every subdataset to find the responsive
238 ones. We thus decided to test for their responsivity numerically using the same
239 procedure as in Larras et al. [2018]. We used a linear trend test to assess the
240 significance of a regression line linking the endpoint values to the isoproturon
241 concentrations. A Benjamini-Hochberg correction was applied on the p-values
242 to reduce false positive selection, due to the high number of realized tests. A
243 0.05 default threshold was used as false discovery rate. This procedure led to
244 select different endpoints for each species. However, for a given species, an end-
245 point was selected only if it was responsive with and without competition to
246 enable a comparison of SSDs in both situations.

247 2.2.3. Concentration-Response Curves modelling

248 A concentration-response relationship was fitted on data for each selected
249 endpoint, species and competition modality combination. Non-linear regressions
250 were realized with the drc R package (version 3.0-1; Ritz et al. [2015]) using a
251 log-probit model (see equation 1).

$$y_{ij} = c + (d - c) * \phi(b * (\log(x_i) - \log(e))) \quad (1)$$

252 where i refers to the i^{th} isotreturon concentration and j refers to the j^{th} repli-
253 cate, x_i is the isotreturon concentration, y_{ij} is the response level of the endpoint,
254 ϕ is the cumulative probability density of the normal law, e is the concentra-
255 tion at which the maximum slope occurs (equal to the EC_{50} ; > 0) b is a shape
256 parameter. if $b < 0$, c is the response level at high concentrations and d is the
257 response level at low concentrations. if $b > 0$, c is the response level at low
258 concentrations and d is the response level at high concentrations. If $b = 0$, the
259 whole model becomes a constant model set at the arithmetical mean between c
260 and d .

261 2.2.4. Critical Effect Concentration derivation

262 For each dose-response curve, two types of CEC were calculated. First, the
263 Effective Concentration which leads to $x\%$ of maximum effect (i.e. between the
264 parameters c and d) (EC_x), was calculated. It is the most commonly used CEC
265 in ecotoxicology as it begins to be widely accepted that NOEC (No Observed
266 Effect Concentration) and LOEC (Low Observed Effect Concentration) suffer
267 from some important weaknesses (Jager [2012]). Although any x value could
268 be used, we have here studied EC_{50} , as it is the most widely used value in
269 ecotoxicological studies and it is a direct parameter of the log-probit model we
270 used, and EC_{10} , as this value is often used as a no-effect concentration proxy in
271 risk assessment (Iwasaki et al. [2015]).

272 Secondly, we calculated the Benchmark Doses (BMD_{Zsd}) as an alternative to
273 EC_x . This CEC, described in the EFSA guidance (EFSA Scientific Committee
274 et al. [2017]), has the advantage to take into account data variability. Indeed,
275 the BMD_{Zsd} is the concentration at which the Benchmark Response (BMR_{Zsd}) is
276 reached, the latter being equal to a change of z times the model residual standard
277 deviation from the control mean. The z of BMD_{Zsd} is therefore theoretically
278 speaking close to the x of EC_x as it defines the level considered to have a critical
279 effect. The EFSA guidance proposes to use a z value of 1 (EFSA Scientific
280 Committee et al. [2017]), but we also calculated BMD_{2sd} . This latter would
281 correspond to a change up to one of the bounds of the 95% confidence interval

282 around the predicted value at the control (Larras et al. [2018]).

283 2.2.5. SSD modelling

284 SSDs were built *via* three different scenarios that are commonly used in
285 scientific publications and regulatory texts. A fourth approach, adapted to our
286 multiple endpoint dataset but not used in regulatory texts has also been tested.
287 1) In a first scenario, the geometric mean of the obtained CECs for the different
288 endpoints has been used for each species. This approach has the advantage to
289 use all the information available for the different endpoints. This is also the
290 most commonly used approach in SSDs in the literature (Xu et al. [2015]). 2)
291 In a second scenario, we used the lowest CEC value obtained for each species.
292 This method is very protective, but it is only using a single value, thus making
293 it sensitive to potential outliers. 3) In a third scenario, only the total dry mass
294 endpoint was considered for each species. This was a responsive endpoint for all
295 of the species under study and is usually measured in ecotoxicological studies
296 on herbaceous grass species (Del Signore et al. [2016]). 4) The fourth approach
297 did not directly use CEC values. We first built sensitivity distributions of the
298 different endpoints for each species (Arts et al. [2008], Hanson and Solomon
299 [2002]) and called them "Endpoint Sensitivity Distribution" (ESD) by analogy
300 to SSDs. We then calculated the fifth percentile of these distributions for each
301 species as a protective concentration for 95% of the endpoints and used these
302 values to build the SSDs themselves. This ESD-using approach was considered
303 to be a good compromise between the two first approaches (*i.e.* the geometric
304 mean approach and the lowest value approach) as it takes into account all of
305 the available datapoints (like the geometric mean approach) but gives a more
306 protective result (like the lowest value approach) without being too sensitive to
307 outliers.

308 SSDs have been modeled with log-logistic distributions. The fits were done
309 using the `fitdistcens` function from the `fitdistrplus` R package (version 1.0-14;
310 Delignette-Muller and Dutang [2015]) to integrate censored data and HC_5 values
311 were derived.

312 **3. Results**

313 *3.1. Data transformation*

314 After applying the procedure to chose which data to transform, the logit
 315 transformation was applied to Fv/Fm chlorophyll fluorescence and the log trans-
 316 formation to every other endpoints except chlorophyll and carotenoid contents.

317 *3.2. Selection of responsive endpoints*

318 Table 1 presents the results of the plant species screening and endpoint re-
 319 sponsiveness. Five to nine endpoints were selected depending on the species.
 320 Some endpoints were selected for all of the species. It is the case for Fv/Fm
 321 chlorophyll fluorescence and the dry masses of root, shoot and total. In con-
 322 trast, some endpoints were not responsive to isoproturon exposure, such as
 323 LDMC and pigment contents (Table 1). We noticed that some endpoints for
 324 some species were not selected because of the very high variability between
 325 replicates (for chlorophyll and carotenoid contents for example). In total, 42
 326 couples of (species, endpoint) were selected, leading to the construction of 84
 327 concentration-response curves (with and without competitor).

Species	<i>P. trivialis</i>	<i>P. pratensis</i>	<i>T. flavescens</i>	<i>A. elatius</i>	<i>L. multiflorum</i>	<i>D. glomerata</i>
Ligula height	X	X				X
Max shoot height	X	X				X
Root length	X	X		X		X
LDMC			X			
SLA		X	X		X	X
Fv/Fm	X	X	X	X	X	X
Chlorophyll		X				
Carotenoid						
Root DM	X	X	X	X	X	X
Shoot DM	X	X	X	X	X	X
Total DM	X	X	X	X	X	X
Root DM/shoot DM	X		X			

Total selected	8	9	7	5	5	8
-----------------------	---	---	---	---	---	---

Table 1: Responsive endpoints for the different tested species. An "X" indicates that the endpoint is considered responsive for the given species. DM stands for dry mass.

328 *3.3. Concentration-response curves modelling*

329 Figure 1 shows an example of curve fitting for *P. pratensis* for the differ-
330 ent selected endpoints. An example of fit for another species can be found in
331 SI (A). No numerical errors were encountered with this fitting procedure and
332 the models have been fitted correctly in every case. The different fits have
333 been visually checked and were consistent with the data. For every endpoint,
334 the concentration-response curve is decreasing with increasing isotroturon con-
335 centrations, the only exception being SLA whose value is increasing with the
336 isotroturon concentration.

337 *3.4. Critical Effect Concentration derivation*

338 Figure 1 also shows an example of CEC calculation for *P. pratensis*. The
339 values of the different CECs calculated for the selected endpoints for each species
340 can be found in SI (B). For BMD_{2sd} , a value could not always be calculated
341 as the BMR_{Zsd} was sometimes beyond the asymptote for high concentrations,
342 meaning that the amplitude of the response was in that case lower than 2 (for
343 BMD_{2sd}) times the model's residual standard deviation. This happened 12 times
344 on 84 BMD_{2sd} calculations and never happened for BMD_{1sd} calculations even if
345 it was conceptually possible. As the EC_x effect level is a percentage of maximum
346 effect (between the two asymptotes), it was successfully calculated in every case.
347 There were however cases where the calculated EC_x or BMD_{Zsd} were above the
348 maximum concentrations. We considered those values as censored values in the
349 interval $[\text{maximum tested dose}; +\infty[$. This happened 3 times among the 84
350 calculated EC_{10} , 20 times among the 84 calculated EC_{50} and 10 times among
351 the 84 calculated BMD_{2sd} . This did not happen for BMD_{1sd} . Figure 2 shows the
352 values of BMD_{1sd} calculated for the different species and endpoints (an example

353 for another CEC given in SI (C)). In most cases, the calculated CEC values were
354 lower in presence of a competitor, thus showing that interspecific competition
355 had a negative impact on organisms tolerance on most of the studied species
356 and endpoints.

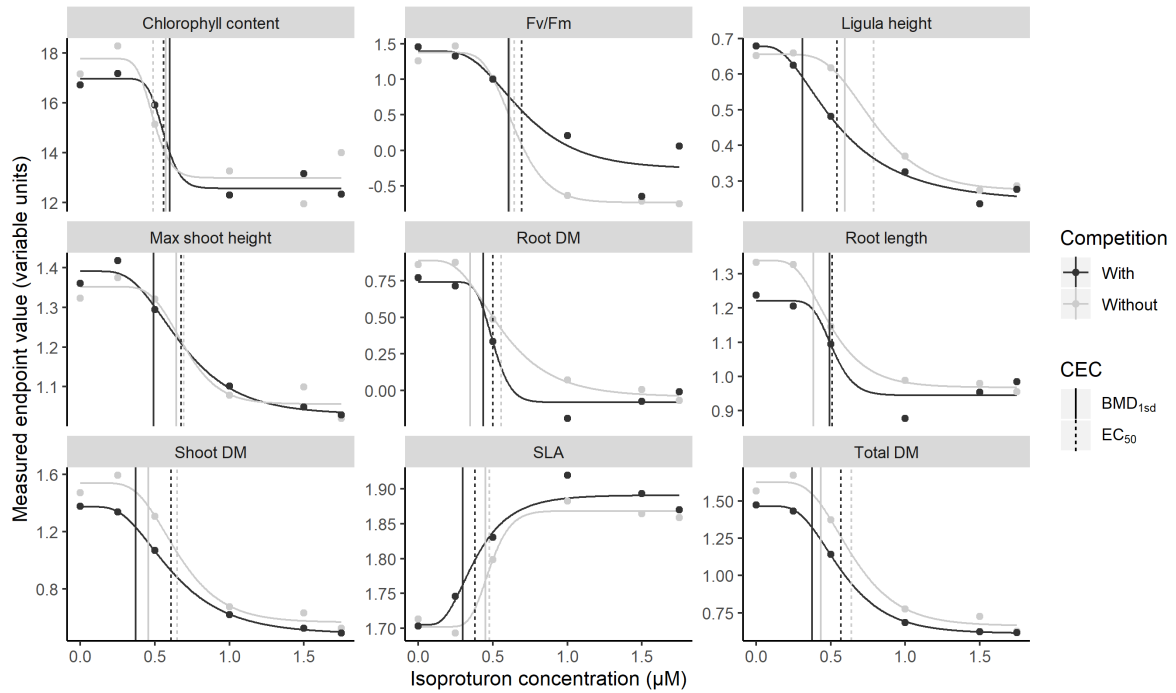
357 We calculated for each BMD_{Zsd} value the corresponding percentage of re-
358 sponse (i.e. the x in EC_x corresponding to each BMD_{Zsd} value). BMD_{1sd}
359 corresponded in average to $EC_{29.7}$ values (interquartile range of x equivalent
360 for BMD_{1sd} : [16.5, 38.3]) whereas BMD_{2sd} corresponded in average to $EC_{49.0}$
361 values (interquartile range of x equivalent for BMD_{2sd} : [32.4, 64.3]).

362 Figure 3 summarizes the CEC values calculated for the different CEC types,
363 species and endpoints and displays the value with competition against the value
364 without competition. All CEC being pooled, about 10% of points are between
365 the two dashed lines, thus showing that, in this case, competition had here mi-
366 nor or no effect (less than a 5% variation in one way or another). Many more
367 points are below the dashed lines (70%) than above (20%), thus showing that
368 interspecific competition had mostly a negative effect on organism tolerance to
369 chemical stress in our experiment. This is consistent with the hypothesis stated
370 in introduction. This trend toward negative effect can be seen for every calcu-
371 lated CECs and every species and endpoints tested even if it is not systematic.
372 This trend toward negative effect however seems less visible for EC_{50} (44%)
373 than for other CECs (69% for EC_{10} , 73% for BMD_{1sd} and 74% for BMD_{2sd}).

374 3.5. ESD and SSD modelling

375 An example of the fitted ESD for the different species for BMD_{1sd} is shown
376 in Figure 4. An example of figure for another CEC can be found in SI (D).
377 Figure 5 shows examples of SSDs calculated from BMD_{1sd} and using the different
378 methods for handling multiple endpoints (minimum, mean, total dry mass and
379 "ESD"). An example of SSD obtained for another CEC is shown in SI (E). Table
380 2 summarizes the shifts between HC_5 values with and without competition
381 through the ratios between HC_5 values without competition and HC_5 values
382 with competition. We can see in this table that every shift ratio was above one,

Figure 1: Examples of concentration-response fits for *P. pratensis*. The points represent the mean of data for each concentration and the curves the fitted models. Data without competition and with competition are highlighted in grey and black respectively. The dashed vertical lines represent the EC₅₀ levels and the plain vertical lines the BMD_{1sd} levels. EC₁₀ and BMD_{2sd} are not displayed here for reasons of clarity. DM stands for dry mass.



383 thus showing that the interspecific competition tended to lower plant tolerance
 384 at the community level. We can also see that the competition effect can lower
 385 the HC₅ up to 11-fold, which strongly surpasses the Assessment Factor of 5
 386 typically used in SSD-based ERA. This however happened only once and for
 387 the least robust method.

	EC₁₀	EC₅₀	BMD_{1sd}	BMD_{2sd}
Min value	0.112/0.011 (11.13)	0.285/0.231 (1.23)	0.212/0.101 (2.11)	0.261/0.218 (1.19)
Mean value	0.197/0.090 (2.19)	0.435/0.388 (1.12)	0.291/0.196 (1.48)	0.494/0.371 (1.33)
Dry mass	0.125/0.077 (1.63)	0.180/0.130 (1.38)	0.219/0.113 (1.94)	0.215/0.187 (1.15)
ESD 5th percentile	0.084/0.022 (3.84)	0.156/0.121 (1.29)	0.159/0.096 (1.66)	0.167/0.126 (1.33)

Table 2: Summary of HC₅ values (in μM) for the different CEC and multiple endpoints handling methods. The value before the slash is the HC₅ without competition, the value after the slash the HC₅ with competition and the value between brackets the ratio between the two HC₅.

Figure 2: BMD_{1sd} values for the different species and endpoints. A black "X" indicates that the endpoint was not selected for the considered species and that no CEC values was calculated. The grey marks are the CEC values without competition and the black ones are the values with competition. The lines linking those two marks for a given species and endpoint combination are solid lines when competition had a negative effect on organisms tolerance (CEC with competition lower than CEC without competition) and are dashed lines when competition had a positive effect on organisms tolerance (CEC with competition higher than CEC without competition), thus leading to rather facilitation for the species. DM stands for dry mass.

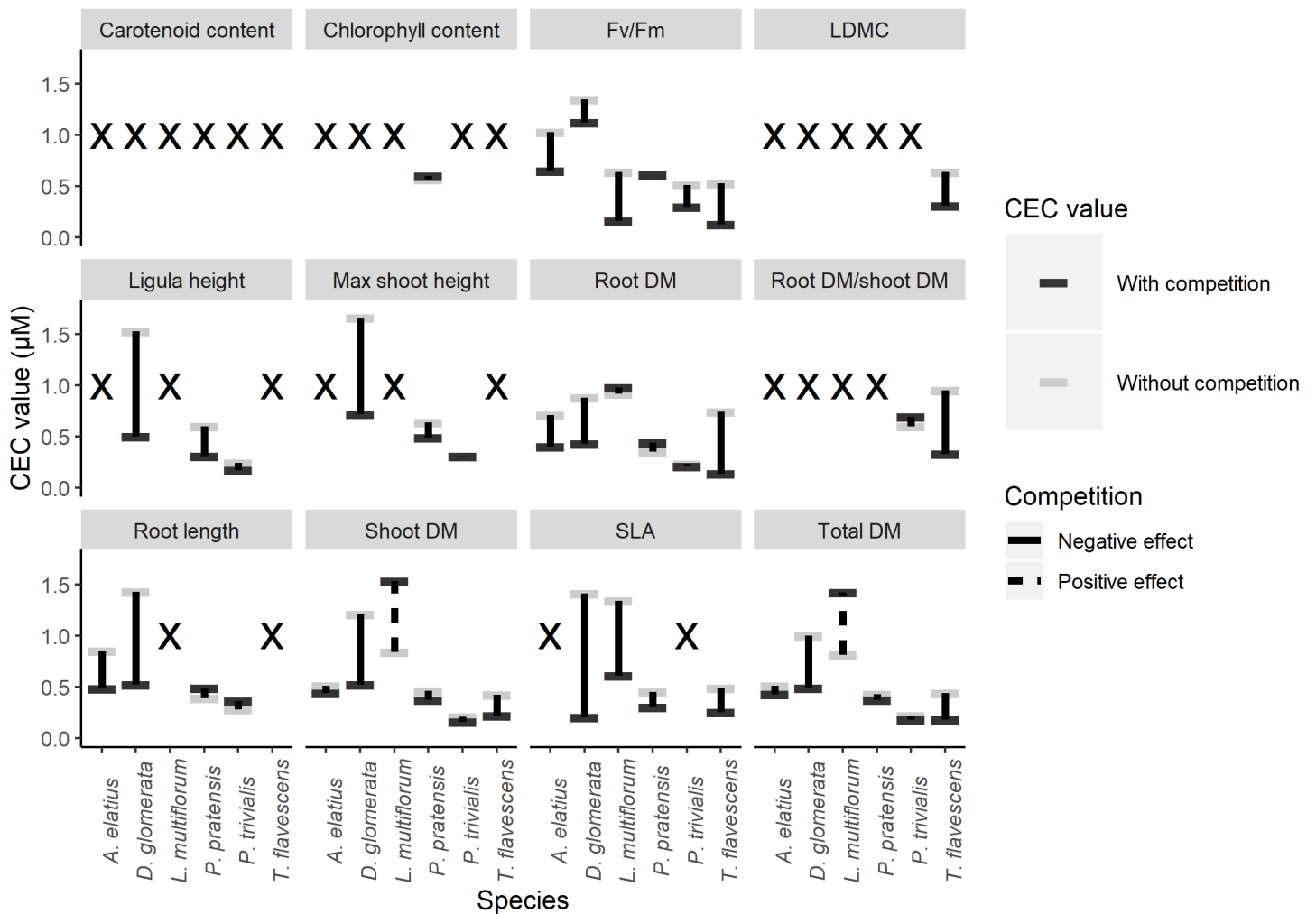


Figure 3: Comparison of calculated CEC values in presence of a competitor (y-axis) against the CEC values in absence of a competitor (x-axis) for the four types of calculated CECs. The different species and the different endpoints are respectively described by different point shapes and by their shade of grey. The black solid line represents the first bisector and the two black dashed lines give a 5 percent variation above and below the first bisector. We considered that the points situated between those two dashed lines showed no variation with regard to the competition modality. DM stands for dry mass.

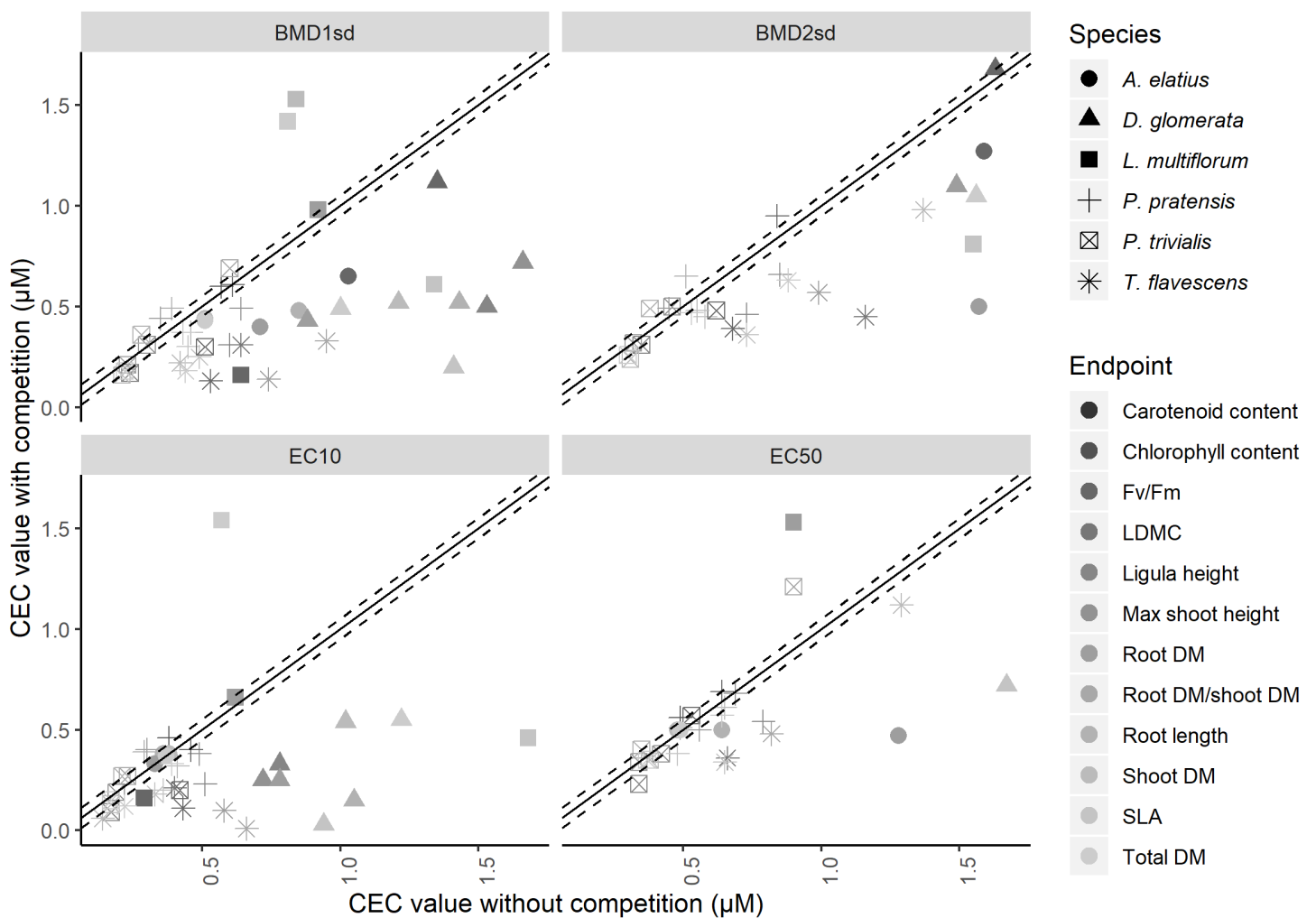


Figure 4: Example of Endpoint Sensitivity Distribution fits for BMD_{1sd} and the six tested species. The stairs represents the empirical cumulative distribution function of the data used to model the ESDs and the curves gives the ESDs themselves. In grey are the data without competition and in black the data with competition. The vertical dashed lines represent the fifth percentile.

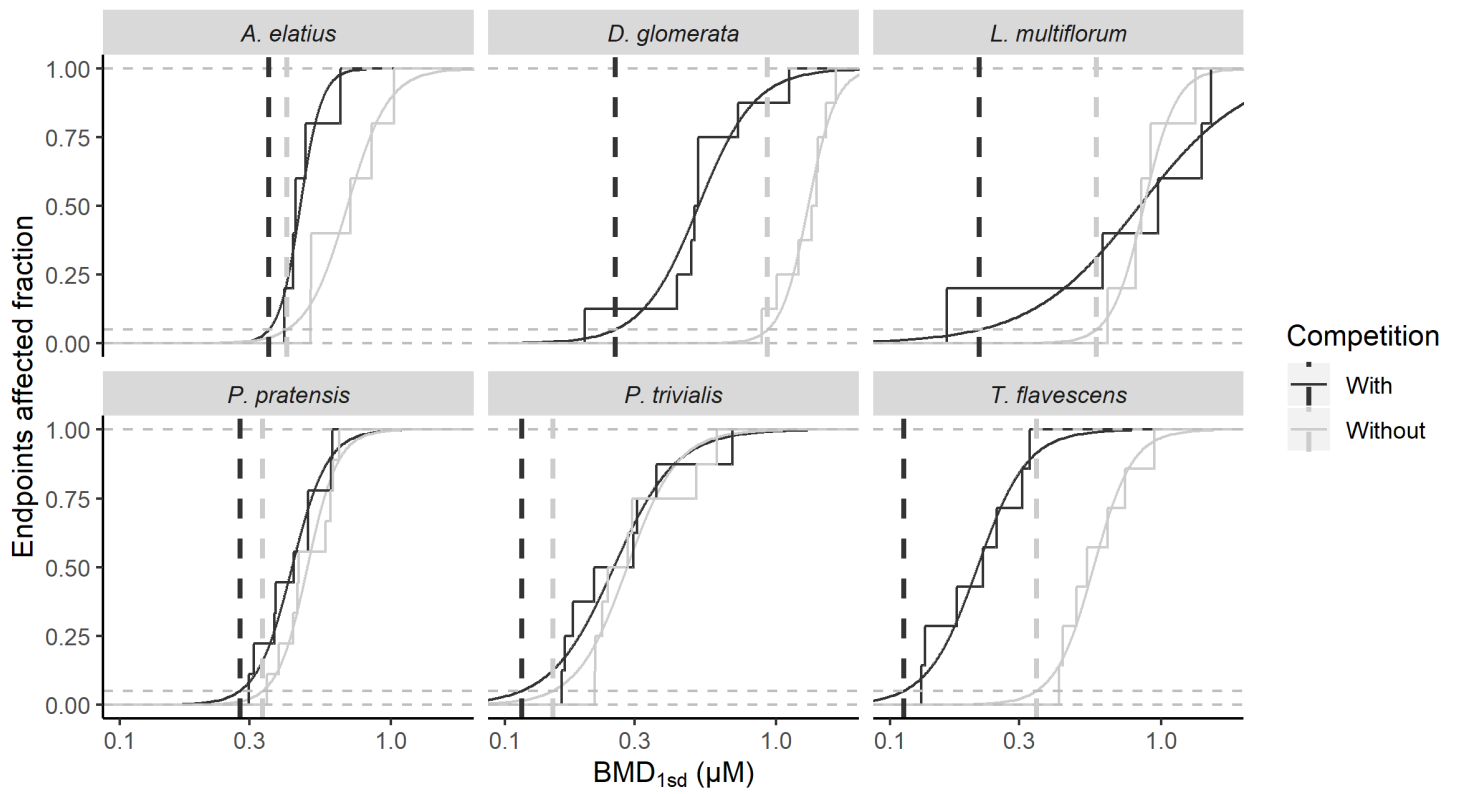
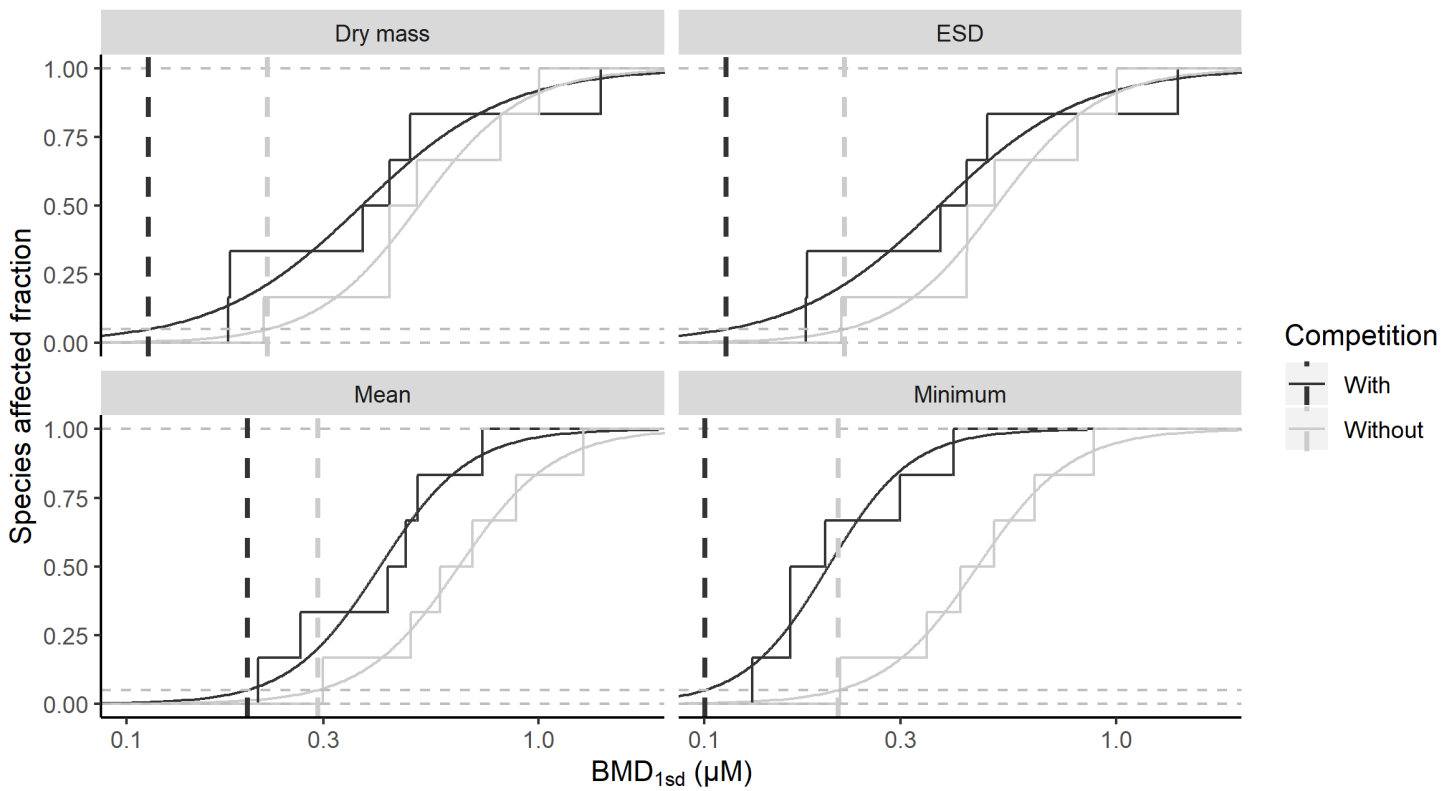


Figure 5: Example of Species Sensitivity Distribution fits produced with BMD_{1sd} . The stairs represents the empirical cumulative distribution function of the data used to model the SSDs and the curves give the SSDs themselves. In grey are the data without competition and in black the data with competition. The vertical dashed lines represent the HC_5 levels. Each graphic displays a way to handle multiple endpoints: "Dry mass" is the SSD produced using the total dry mass for each species, "ESD" is the SSD produced using the 5th percentile from Endpoint Sensitivity Distribution of each species, "Mean" is the SSD produced using the mean value for each species and "Minimum" is the SSD produced using the minimum value for each species.



388 4. Discussion

389 4.1. Ecotoxicological relevance of bioassays

390 Usual ecotoxicological designs for plants only monitor very few endpoints
391 as root length (ISO/TC 190/SC 4 Caractérisation biologique [2012]) or mass
392 and seedling emergence (OCDE [2006]) and consider they are either represen-
393 tative of the organism health (total dry mass for example) or they are primary
394 maker in response to contamination compared to the other possible endpoints
395 and are thus involved in the plant health (Krewski et al. [2011]). Among the
396 eleven (or twelve if including the DM ratio, cf Table 1) endpoints measured, dry
397 mass endpoints were found responsive to chemical stress for every species, thus
398 reflecting plant health in accordance with the literature. In this study, CECs
399 related to dry masses were often the lowest among the different endpoints for
400 each species (Figure 2), advocating for their use in environmental risk assess-
401 ment. The Fv/Fm photosystem II efficiency endpoint was also responsive to
402 herbicide exposure. This endpoint, with regards to the mode of action of iso-
403 proturon which specifically inhibits photosystem II reaction center (Grouselle
404 et al. [1995]), is thus a relevant early endpoint to monitor such specific con-
405 taminations in plants. In our study, pigment content endpoints exhibited low
406 responsiveness compared to previous works using photosystem II inhibitor her-
407 bicides (Ramel et al. [2009], Sulmon et al. [2004]). LDMC was also found weakly
408 responsive to chemical exposure, confirming that this parameter was not rele-
409 vant for plant ecotoxicity tests. Finally, the responsiveness of Root/Shoot DM
410 ratio, SLA, and of length endpoints was found to be species specific underlying
411 the involvement of species specific pattern of organ allocation in response to
412 stress (Eziz et al. [2017], Xiong et al. [2018]).

413 A similar pattern of responses was observed for some of the endpoints. These
414 different groups of endpoints could be discriminated based on their responsive-
415 ness in the different species as well as the ranking of species in terms of tolerance.
416 A first group contained the ligula height, the maximum shoot height and the
417 root length. They were indeed selected for the same species: *D. glomerata*, *P.*

418 *pratensis*, *P. trivialis* (root length was also selected for *A. elatius*) (Table 1).
419 These endpoints also shared the same tolerance ranking for concerned species:
420 *D. glomerata* > *P. pratensis* > *P. trivialis* (Figure 2). A second group gath-
421 ered the dry masses (root, shoot and total) and concerned all species (Table
422 1). Again, a common tolerance ranking was observed: *L. multiflorum* > *D.*
423 *glomerata* > *A. elatius* > *P. pratensis* > *P. trivialis*. The tolerance values of *T.*
424 *flavescens* was however more variable between those different endpoints. Shoot
425 and total dry masses were also the only endpoints where a clear positive effect
426 of competition on tolerance was visible on Figure 2 for *L. multiflorum*.

427 Our experimental design allowed to test the effects of competition on the
428 responses of tested species to chemical stress. As *Bromus erectus* was pre-
429 identified as the most tolerant to isoproturon and the most competitive species,
430 it was used as competitor to ensure a constant competition pressure. The com-
431 petition tested was thus interspecific competition. One could possibly argue
432 that the competition effects identified could not be differentiated from intraspe-
433 cific competition. Indeed, an interesting experimental design would have been
434 to also test intraspecific competition by exposing the tested species in presence
435 of other individuals of the same species. However, aside from the fact that it
436 would have considerably overburdened the experimental design, it would then
437 have been impossible to interpret correctly the results as the different species
438 display different competitive abilities and isoproturon tolerances. At high iso-
439 proturon concentrations, species with low tolerance would have been highly
440 affected, thus resulting in a reduced competition pressure.

441 4.2. Relevance of SSD approaches in the context of ERA

442 The number of species used in this study is under the classical SSD standards.
443 However, 6 species are enough regarding regulatory guidance of some countries
444 such as Australia and New Zealand (Australian and New Zealand Environment
445 and Conservation Council and Agriculture and Resource Management Council
446 of Australia and New Zealand [2000]; minimum 5 species). Forbes and Calow
447 [2002] have also proposed that the quality of data is at least as important as its

448 quantity and the fact that the six species studied here come from a consistent
449 community and that several endpoints have been measured for each may be
450 arguments in favor of the quality of our dataset. Finally, the built SSDs are not
451 intended to have a direct regulatory use but to address the effect of interspecific
452 competition on SSD. Even with only six species, our study was able to provide
453 some insight about this question.

454 Our study used a great number of endpoints. Such approach provides new
455 insights to assess the importance of measured endpoints in ERA through our
456 innovative proposal for handling multiple endpoints. Indeed, by mixing several
457 endpoints at once in our SSD building, we challenged their relevance and their
458 relative individual sensitivity. It seems important to note that the effect of using
459 different endpoints and ways to combine them into SSDs have not been studied
460 yet (Del Signore et al. [2016]). Our results showed that HC_5 calculated with
461 the ESD 5th percentile was the lowest for 7 of the 8 CEC types and competition
462 modalities (Table 2). Its constructions should also ensure that it is robust
463 towards potential outliers. Regulatory guidances usually propose to use the
464 minimum values or the geometric mean of the different values for each species
465 to build SSDs, the latter being the most commonly used in practice. In light
466 of our work, the 5th percentile from ESD method we investigated here could
467 be proposed as a decent alternative. This method is however not applicable
468 if the number of endpoints is low (≤ 5). Such a method would also allow to
469 construct more realistic SSD, adjustable to target communities, and suitable to
470 the diversity of contaminants and related mixtures found in ecosystems. Indeed,
471 using a larger set of endpoints enables to include general, species specific, and
472 also contaminant specific endpoints, regarding both community diversity and
473 contaminant mode of action.

474 Another issue is the question of the "non-responsive" endpoints. We made
475 the choice to exclude them from the analysis, considering that they would not
476 present a response to the isoproturon concentration, even above the maximum
477 concentration of our experimental design. Excluding those data from our dataset
478 could lead to possible biases. Indeed, this exclusion implies that they are not

479 relevant for our study whereas they may be only sparsely or not at all sensitive,
480 thus meaning we may underestimate the total tolerance of tested species and
481 related community.

482 An interesting continuation of this work would be to set up this experimen-
483 tation again using other pesticides, especially not banned ones as isoproturon
484 is. This would be of great help to assess if our conclusions on isoproturon could
485 be extended to other compounds or if the responses we observed were specific,
486 notably concerning the selection of "responsive" endpoints. It would also sup-
487 port the potential need to measure more endpoints to assess the plant health
488 and give new insights on the ESD method we propose.

489 Interspecific competition had a negative effect on organism responses to
490 chemical stress, as shown by the different CEC values calculated. It can also
491 be seen in Table 2 that this negative effect was propagated from single CEC
492 values to HC_5 produced from SSDs. The effect of interspecific competition we
493 evidenced is robust, since HC_5 values always exhibited the same trend, even
494 if its intensity depended on the CEC that was used and on the multiple end-
495 points handling method. Those results are consistent with the fact that, in
496 SSDs, biotic interactions should have important effects on organism responses
497 to herbicides and other pesticides targeting low trophic levels (De Laender et al.
498 [2008]). Competition effect is not taken into account in the first two tiers of ERA
499 as the first consists in using the lowest CEC of classical bioassays and the sec-
500 ond in incorporating those bioassay results in predictive models. It is however
501 included in the other tiers as those tiers are not based on monospecific bioas-
502 says. The third ERA tier uses results from experiments in mesocosms where
503 different species coexist. Those species are therefore interacting with each other
504 and biotic interactions are occurring. The fourth ERA tier uses data from real
505 ecosystems and is therefore considered as the most environmentally relevant by
506 integrating real interactions and sources of variability. Those two tiers how-
507 ever consider data from specific environments and conclusions can be difficult
508 to expand to other situations.

509 **5. Conclusion**

510 This study showed that competitive interactions affected, both at the species
511 level (bioassays results) and the community level (SSD results), the responses of
512 plants to isoproturon. Such results thus highlight the relevance of accounting for
513 biotic interactions to construct SSD models in a context of community dynamics
514 prediction and of ERA. SSDs could thus be used more efficiently to design and
515 predict the evolution of key plant communities, such as vegetated filter strips.
516 They are indeed natural or sown plant communities whose function is to protect
517 aquatic ecosystems by preventing pesticide leaching from crops to surrounding
518 rivers. Installation of these grass strips between croplands and rivers is now
519 regulatory (European Council [1991]). In this context, SSD models could be a
520 relevant tool to predict plant community dynamics under conditions of recurrent
521 pesticide exposures, in order to design and maintain functional buffer grass
522 strips. More data are however necessary to assess these points and research
523 must be carried on those topics.

524 **Associated content**

525 Supporting information. SI A: Example of concentration-response fits for
526 *L. multiflorum*; SI B: Table of all the CEC values calculated; SI C: Graphical
527 summary of EC_{50} values; SI D: ESD produced with EC_{50} values; SI E: SSD
528 produced with EC_{50} values.

529 Figures equivalent to Fig 1 but for other species and figures equivalent to
530 Fig 2, 4 and 5 but for other CEC are available upon request to the authors.

531 **Acknowledgements**

532 This work has been funded by the “Ecosphère continentale et côtière” (EC2CO)
533 interdisciplinary program from the Centre National de la Recherche Scientifique
534 (CNRS, France). Vincent BAILLARD received financial support for salary from
535 French Research ministry.

536 We are grateful to Valerie Gouesbet (Ecobio Research Unit, Experimental
537 Ecology platform), to Lucie Wronka and Malo Bourget for help with experimen-
538 tations, and to Sandra Rigaud (Ecobio Research Unit) for administrative and
539 accounting work. We thank Jean-Pierre Caudal (Ecobio Research Unit, Exper-
540 imental Ecology platform) and the Experimental Ecology platform of Ecobio
541 research unit for providing all the infrastructure needed to carry out the exper-
542 iments.

543 We would like to thank the two anonymous reviewers whose suggestions and
544 comments helped improve this manuscript.

545 **References**

546 Aagaard, A., Brock, T. C. M., Capri, E., Duquesne, S., Filipic, M., Adriaanse,
547 P. I., and Boesten, J. (2013). Guidance on tiered risk assessment for plant pro-
548 tection products for aquatic organisms in edge-of-field surface waters. *EFSA*
549 *Journal*, page 268.

550 Alavanja, M. C. (2009). Pesticides Use and Exposure Extensive Worldwide.
551 *Reviews on environmental health*, 24(4):303–309.

552 Alberto, D., Couée, I., Pateyron, S., Sulmon, C., and Gouesbet, G. (2018).
553 Low doses of triazine xenobiotics mobilize ABA and cytokinin regulations in
554 a stress- and low-energy-dependent manner. *Plant Science*, 274:8–22.

555 Amiard, J.-C. and Amiard-Triquet, C. (2015). Conventional Risk Assessment
556 of Environmental Contaminants. In *Aquatic Ecotoxicology*, pages 25–49. El-
557 sevier.

558 Anderson, J., Dubetz, C., and Palace, V. (2015). Neonicotinoids in the Canadian
559 aquatic environment: A literature review on current use products with a focus
560 on fate, exposure, and biological effects. *Science of The Total Environment*,
561 505:409–422.

- 562 Annett, R., Habibi, H. R., and Hontela, A. (2014). Impact of glyphosate
563 and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment: Impact of
564 glyphosate-based herbicides. *Journal of Applied Toxicology*, 34(5):458–479.
- 565 Arts, G. H., Belgers, J. D. M., Hoekzema, C. H., and Thissen, J. T. (2008).
566 Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory
567 toxicity tests. *Environmental Pollution*, 153(1):199–206.
- 568 Australian and New Zealand Environment and Conservation Council and Agri-
569 culture and Resource Management Council of Australia and New Zealand
570 (2000). *Australian and New Zealand guidelines for fresh and marine water
571 quality 2000*. Australian and New Zealand Environment and Conservation
572 Council and Agriculture and Resource Management Council of Australia and
573 New Zealand, Canberra.
- 574 Birch, C. P., Oom, S. P., and Beecham, J. A. (2007). Rectangular and hexagonal
575 grids used for observation, experiment and simulation in ecology. *Ecological
576 Modelling*, 206(3-4):347–359.
- 577 Boutin, C., Montroy, K., Mathiassen, S. K., Carpenter, D. J., Strandberg,
578 B., and Damgaard, C. (2019). Effects of Sublethal Doses of Herbicides
579 on the Competitive Interactions Between 2 Nontarget Plants, *Centaurea
580 cyanus* L. and *Silene noctiflora* L. *Environmental Toxicology and Chemistry*,
581 38(9):2053–2064.
- 582 Cornelissen, J. H. C., Lavorel, S., Garnier, E., Díaz, S., Buchmann, N., Gurvich,
583 D. E., Reich, P. B., Steege, H. t., Morgan, H. D., Heijden, M. G. A. v. d.,
584 Pausas, J. G., and Poorter, H. (2003). A handbook of protocols for standard-
585 ised and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Australian
586 Journal of Botany*, 51(4):335.
- 587 Crone, E. E., Marler, M., and Pearson, D. E. (2009). Non-
588 target effects of broadleaf herbicide on a native perennial forb:
589 a demographic framework for assessing and minimizing im-
590 pacts. *Journal of Applied Ecology*, 46(3):673–682. _eprint:

- 591 <https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365->
592 2664.2009.01635.x.
- 593 Damgaard, C., Strandberg, B., Mathiassen, S. K., and Kudsk, P. (2014). The
594 effect of glyphosate on the growth and competitive effect of perennial grass
595 species in semi-natural grasslands. *Journal of Environmental Science and*
596 *Health, Part B*, 49(12):897–908.
- 597 De Laender, F., De Schamphelaere, K. A., Vanrolleghem, P. A., and Janssen,
598 C. R. (2008). Do we have to incorporate ecological interactions in the sensi-
599 tivity assessment of ecosystems? An examination of a theoretical assumption
600 underlying species sensitivity distribution models. *Environment International*,
601 34(3):390–396.
- 602 Del Signore, A., Hendriks, A. J., Lenders, H. R., Leuven, R. S., and Breure, A.
603 (2016). Development and application of the SSD approach in scientific case
604 studies for ecological risk assessment: Development and application of the
605 SSD. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(9):2149–2161.
- 606 Delignette-Muller, M. L. and Dutang, C. (2015). fitdistrplus: An R Package for
607 Fitting Distributions. *Journal of Statistical Software*, 64(4):1–34.
- 608 Dragon, K., Drozdzyński, D., Gorski, J., and Kruc, R. (2019). The migration
609 of pesticide residues in groundwater at a bank filtration site (Krajkowo well
610 field, Poland). *Environmental Earth Sciences*, 78(20):593.
- 611 EFSA Scientific Committee, Hardy, A., Benford, D., Halldorsson, T., Jeger,
612 M. J., Knutsen, K. H., More, S., Mortensen, A., Naegeli, H., Noteborn, H.,
613 Ockleford, C., Ricci, A., Rychen, G., Silano, V., Solecki, R., Turck, D., Aerts,
614 M., Bodin, L., Davis, A., Edler, L., Gundert-Remy, U., Sand, S., Slob, W.,
615 Bottex, B., Abrahantes, J. C., Marques, D. C., Kass, G., and Schlatter, J. R.
616 (2017). Update: use of the benchmark dose approach in risk assessment.
617 *EFSA Journal*, 15(1).

- 618 Eker, S. (2019). Determination of The Inhibitory Effect of Isoproturon on Unac-
619 climated Microbial Culture. *International Journal of Environmental Research*
620 *and Technology*, 2(1):13–16. Number: 1.
- 621 European Chemical Bureau (2003). Technical Guidance Document on Risk
622 Assessment Part II. *Institute for Health and Consumer Protection, Italy,*
623 *Ispra.*
- 624 European Commission (2016). *COMMISSION IMPLEMENTING REGULA-*
625 *TION (EU) 2016/ 872 - of 1 June 2016 - concerning the non-renewal of*
626 *approval of the active substance isoproturon, in accordance with Regulation*
627 *(EC) No 1107 / 2009 of the European Parliament and of the Council con-*
628 *cerning the placing of plant protection products on the market, and amending*
629 *Commission Implementing Regulation (EU) No 540 / 2011.* Official Journal
630 of the European Union.
- 631 European Council (1991). *EUR-Lex - 31991L0676 - EN.* European Union
632 Official Journal.
- 633 Eziz, A., Yan, Z., Tian, D., Han, W., Tang, Z., and Fang, J. (2017). Drought
634 effect on plant biomass allocation: A meta-analysis. *Ecology and Evolution*,
635 7(24):11002–11010.
- 636 Foit, K., Kaske, O., and Liess, M. (2012). Competition increases toxicant sen-
637 sitivity and delays the recovery of two interacting populations. *Aquatic Tox-*
638 *icology*, 106-107:25–31.
- 639 Forbes, V. E. and Calow, P. (2002). Species Sensitivity Distributions Revisited:
640 A Critical Appraisal. *Human and Ecological Risk Assessment: An Interna-*
641 *tional Journal*, 8(3):473–492.
- 642 Geiger, F., Bengtsson, J., Berendse, F., Weisser, W. W., Emmerson, M.,
643 Morales, M. B., Ceryngier, P., Liira, J., Tschardtke, T., Winqvist, C., Eg-
644 gers, S., Bommarco, R., Pärt, T., Bretagnolle, V., Plantegenest, M., Clement,
645 L. W., Dennis, C., Palmer, C., Oñate, J. J., Guerrero, I., Hawro, V., Aavik,

- 646 T., Thies, C., Flohre, A., Hänke, S., Fischer, C., Goedhart, P. W., and In-
647 chausti, P. (2010). Persistent negative effects of pesticides on biodiversity
648 and biological control potential on European farmland. *Basic and Applied*
649 *Ecology*, 11(2):97–105.
- 650 Grouselle, M., Grollier, T., Feurtet-Mazel, A., Ribeyre, F., and Boudou, A.
651 (1995). Herbicide isoproturon-specific binding in the freshwater macrophyte
652 *Elodea densa*—a single-cell fluorescence study. *Ecotoxicology and Environmen-*
653 *tal Safety*, 32(3):254–259.
- 654 Gust, K. A., Kennedy, A. J., Melby, N. L., Wilbanks, M. S., Laird, J., Meeks, B.,
655 Muller, E. B., Nisbet, R. M., and Perkins, E. J. (2016). *Daphnia magna*'s sense
656 of competition: intra-specific interactions (ISI) alter life history strategies and
657 increase metals toxicity. *Ecotoxicology*, 25(6):1126–1135.
- 658 Hanson, M. L. and Solomon, K. R. (2002). New Technique for Estimating
659 Thresholds of Toxicity in Ecological Risk Assessment. *Environmental Science*
660 *& Technology*, 36(15):3257–3264.
- 661 ISO/TC 190/SC 4 Caractérisation biologique (2012). Qualité du sol — Déter-
662 mination des effets des polluants sur la flore du sol — Partie 1: Méthode de
663 mesurage de l'inhibition de la croissance des racines. Standard, International
664 Organization for Standardization, Geneva, CH.
- 665 Iwasaki, Y., Kotani, K., Kashiwada, S., and Masunaga, S. (2015). Does the
666 Choice of NOEC or EC10 Affect the Hazardous Concentration for 5% of the
667 Species? *Environmental Science & Technology*, 49(15):9326–9330.
- 668 Jager, T. (2012). Bad habits die hard: The NOEC's persistence reflects poorly
669 on ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(2):228–229.
- 670 Johnson, A. C., Besien, T. J., Bhardwaj, C. L., Dixon, A., Gooddy, D. C.,
671 Haria, A. H., and White, C. (2001). Penetration of herbicides to groundwater
672 in an unconfined chalk aquifer following normal soil applications. *Journal of*
673 *Contaminant Hydrology*, 53(1):101–117.

- 674 Johnson, A. C., Haria, A. H., Bhardwaj, C. L., Völkner, C., Batchelor, C. H.,
675 and Walker, A. (1994). Water movement and isotopuron behaviour in a
676 drained heavy clay soil: 2. Persistence and transport. *Journal of Hydrology*,
677 163(3):217–231.
- 678 Kooijman, S. (1987). A safety factor for LC50 values allowing for differences in
679 sensitivity among species. *Water Research*, 21(3):269–276.
- 680 Krewski, D., Westphal, M., Al-Zoughool, M., Croteau, M. C., and Andersen,
681 M. E. (2011). New Directions in Toxicity Testing. *Annual Review of Public*
682 *Health*, 32(1):161–178.
- 683 Larras, F., Billoir, E., Baillard, V., Siberchicot, A., Scholz, S., Wubet,
684 T., Tarkka, M., Schmitt-Jansen, M., and Delignette-Muller, M.-L. (2018).
685 DRomics: A Turnkey Tool to Support the Use of the Dose–Response Frame-
686 work for Omics Data in Ecological Risk Assessment. *Environmental Science*
687 *& Technology*, 52(24):14461–14468.
- 688 McMahon, T. A., Halstead, N. T., Johnson, S., Raffel, T. R., Romansic, J. M.,
689 Crumrine, P. W., and Rohr, J. R. (2012). Fungicide-induced declines of fresh-
690 water biodiversity modify ecosystem functions and services. *Ecology Letters*,
691 15(7):714–722.
- 692 OCDE (2006). *Test No. 208: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and*
693 *Seedling Growth Test*. OECD iLibrary.
- 694 Posthuma, L., Suter II, G. W., and Traas, T. P. (2001). *Species sensitivity*
695 *distributions in ecotoxicology*. CRC press.
- 696 R Core Team (2019). *R: A Language and Environment for Statistical Comput-*
697 *ing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- 698 Ramel, F., Sulmon, C., Gouesbet, G., and Couée, I. (2009). Natural varia-
699 tion reveals relationships between pre-stress carbohydrate nutritional status
700 and subsequent responses to xenobiotic and oxidative stress in *Arabidopsis*
701 *thaliana*. *Annals of Botany*, 104(7):1323–1337.

- 702 Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., and Gerhard, D. (2015). Dose-Response
703 Analysis Using R. *PLOS ONE*, 10(12):e0146021.
- 704 Serra, A.-A., Nuttens, A., Larvor, V., Renault, D., Couée, I., Sulmon, C., and
705 Gouesbet, G. (2013). Low environmentally relevant levels of bioactive xeno-
706 biotics and associated degradation products cause cryptic perturbations of
707 metabolism and molecular stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal*
708 *of Experimental Botany*, 64(10):2753–2766.
- 709 Silva, V., Mol, H. G., Zomer, P., Tienstra, M., Ritsema, C. J., and Geissen, V.
710 (2019). Pesticide residues in European agricultural soils – A hidden reality
711 unfolded. *Science of The Total Environment*, 653:1532–1545.
- 712 Stephan, C. E., Mount, D. I., Hansen, D. J., Gentile, J. H., Chapman, G. A.,
713 and Brungs, W. A. (1985). *Guidelines for deriving numerical national water*
714 *quality criteria for the protection of aquatic organisms and their uses*. US
715 Environmental Protection Agency Duluth, MN.
- 716 Sulmon, C., Gouesbet, G., Couée, I., and Amrani, A. E. (2004). Sugar-induced
717 tolerance to atrazine in *Arabidopsis* seedlings: interacting effects of atrazine
718 and soluble sugars on psbA mRNA and D1 protein levels. *Plant Science*,
719 167(4):913–923.
- 720 Van den Brink, P. J., Blake, N., Brock, T. C. M., and Maltby, L. (2006). Pre-
721 dictive Value of Species Sensitivity Distributions for Effects of Herbicides in
722 Freshwater Ecosystems. *Human and Ecological Risk Assessment: An Inter-*
723 *national Journal*, 12(4):645–674.
- 724 Viaene, K. P. J., De Laender, F., Rico, A., Van den Brink, P. J., Di Guardo,
725 A., Morselli, M., and Janssen, C. R. (2015). Species interactions and chem-
726 ical stress: Combined effects of intraspecific and interspecific interactions
727 and pyrene on *Daphnia magna* population dynamics: Combined effect of
728 species interactions and pyrene. *Environmental Toxicology and Chemistry*,
729 34(8):1751–1759.

- 730 Xiong, G., Zhang, A., Fan, D., Ge, J., Yang, D., Xie, Z., and Zhang, W. (2018).
731 Functional coordination between leaf traits and biomass allocation and growth
732 of four herbaceous species in a newly established reservoir riparian ecosystem
733 in China. *Ecology and Evolution*, 8(23):11372–11384.
- 734 Xu, F.-L., Li, Y.-L., Wang, Y., He, W., Kong, X.-Z., Qin, N., Liu, W.-X.,
735 Wu, W.-J., and Jorgensen, S. E. (2015). Key issues for the development and
736 application of the species sensitivity distribution (SSD) model for ecological
737 risk assessment. *Ecological Indicators*, 54:227–237.

3.2.3 Ce qui n'a pas été conservé dans l'article

Cet article est le fruit de nombreux tests et questionnements dont un certain nombre a été écarté en cours de route car considéré *a posteriori* non-essentiel pour son propos. Cette approche a en effet été réalisée lors du développement initial de l'outil DRomics [LARRAS et collab., 2018] permettant de décrire les diverses relations concentration-réponse contenues dans un jeu de données omiques. Les questions soulevées lors du développement de cet outil ont ainsi également été abordées dans ce projet, telles que la méthode de sélection des sous jeux de données présentant une réponse, le type de modèles à utiliser pour décrire les relations concentration-réponse des données et l'utilisation d'une cinquième méthode de construction des SSD.

3.2.3.1 Autres méthodes de sélection des groupes d'espèces, endpoints et modalité de compétition présentant une réponse à l'isoproturon

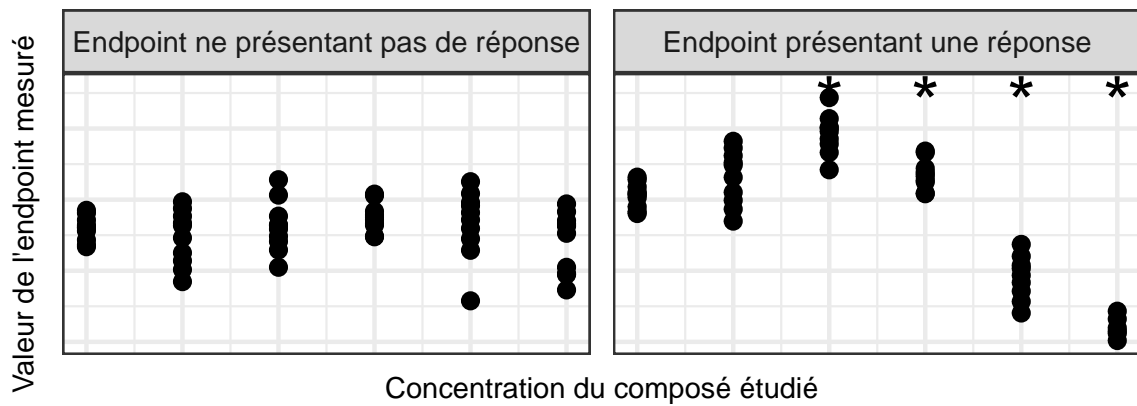
Au sein de l'outil DRomics, trois approches ont été utilisées (et intégrées au final à l'outil) afin de sélectionner les sous jeux de données présentant une réponse à l'isoproturon : via l'utilisation d'une ANOVA ("méthode qualitative"), via l'utilisation d'un test de tendance linéaire ("méthode quantitative") et via l'utilisation d'un test de tendance quadratique ("méthode quadratique"). Ces méthodes de sélection sont illustrée par la Figure 3.1. Dans l'étude pilote de DRomics [LARRAS et collab., 2018], qui investiguait la réponse transcriptomique de *Scenedesmus vacuolatus* au tri-closan, l'utilisation d'un test quadratique s'est avéré la méthode permettant de détecter le plus de réponses significatives pour un taux de fausse découverte fixé à 5%. En effet, cette méthode permet de détecter non seulement les réponses monotones le long du gradient d'exposition, mais également les réponses biphasiques, fréquemment observées en transcriptomique. Les trois approches de sélection ont également été appliquées dans le cadre de l'approche classique réalisée ici et l'approche utilisant le test de tendance quadratique présentait également le plus haut taux de sélection de sous jeux de données présentant une réponse. Cependant, les résultats étaient très proches en terme de nombre de couples sélectionnés parmi les 72 couples pour les trois méthodes (41 pour l'approche basée sur l'ANOVA, 42 pour l'approche basée sur le test de tendance linéaire et 43 pour l'approche basée sur le test de tendance quadratique) et il a donc été décidé de ne conserver qu'une seule de ces trois méthodes. Celle utilisant l'ANOVA nous paraissait dispensable à cause de plusieurs inconvénients liés à l'utilisation de ce test statistique et notamment au fait de la nécessité de disposer d'un grand nombre de réplicats à chaque concentration, ce qui n'a pas toujours été le cas, de nombreux points étant manquants à de hautes concentrations pour

A. elatius, certains individus n'ayant pas toléré les trop hautes concentrations en isoproturon. La méthode utilisant le test de tendance quadratique a également été écartée. En effet, elle peut être très utile afin de mettre en évidence l'existence de relations non monotones (ce qui peut être le résultat de phénomènes d'hormèse définis par [KENDIG et collab. \[2010\]](#) comme étant "une inversion de réponse entre les faibles et hautes doses d'un composé chimique, d'une molécule biologique, d'un stresser physique ou d'un autre inhibiteur de réponse") mais l'utilisation du modèle log-logistique à quatre paramètres dans la suite de l'approche, modèle donnant une courbe monotone, ne justifiait pas de prendre en compte ce type de tendances. La méthode utilisant le test de tendance linéaire est donc celle ayant été conservée au sein de l'approche classique.

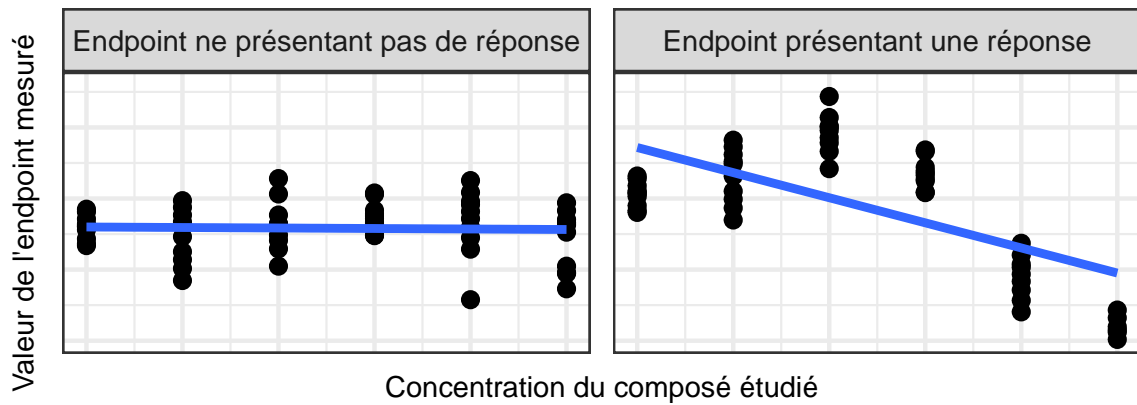
Une seconde question sur la sélection des sous jeux de réponse présentant une réponse concernait le fait de conserver le même résultat, "réponse" ou "pas de réponse", pour les deux modalités de compétition de chaque couple espèce*endpoint. En effet, biologiquement parlant, il aurait pu être judicieux de ne pas appliquer cette contrainte et de permettre ainsi la sélection du couple pour une modalité de compétition, mais pas pour l'autre. Cela aurait par exemple permis de traduire des situations pour lesquelles l'endpoint d'une espèce n'aurait pas été affecté par l'isoproturon en temps normal, mais où l'ajout d'un nouveau stress, ici le stress compétitif, aurait demandé une dépense énergétique trop importante pour permettre de maintenir les systèmes de résistance aux deux stress, menant dans ce cas à une réponse à l'isoproturon. Ceci aurait cependant mené à d'autres problèmes. En effet, les SSD construits n'auraient alors plus systématiquement présenté les mêmes couples espèce*endpoint avec et sans compétition. Il aurait alors été compliqué de réaliser une comparaison directe des deux modèles et donc d'étudier les effets de la compétition sur les SSD et les valeurs d'HC₅ dérivées. La relâche de cette contrainte a été testée dans notre jeu de données et cette situation ne s'est présentée que pour cinq couples sur les 72 présents. Le faible nombre de ces cas nous a au final convaincu de maintenir cette contrainte afin de faciliter ensuite l'analyse. Ceci reste toutefois un point très intéressant qui mériterait à l'avenir d'être testé.

3.2.3.2 Autres modèles permettant de décrire la concentration concentration-réponse

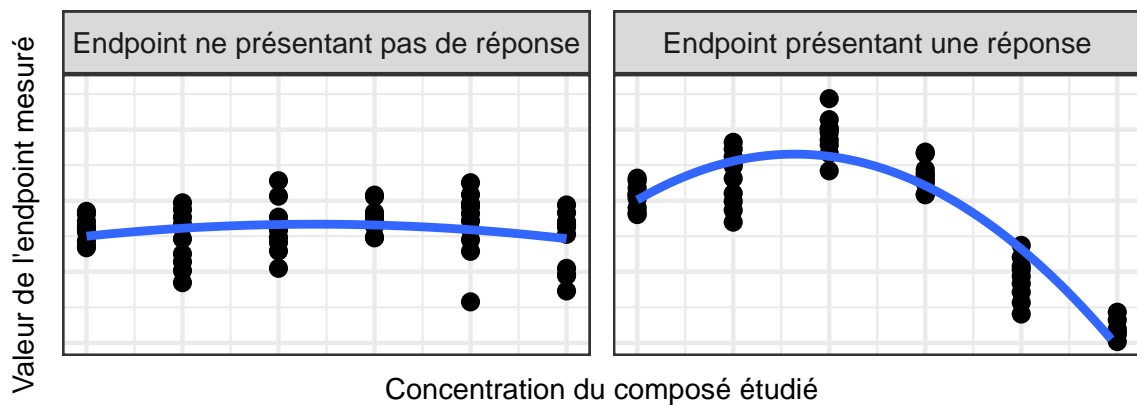
Comme mentionné dans la section précédente et dans l'article lui-même, un modèle log-logistique à quatre paramètres a été utilisé afin de modéliser les CRC de ce jeu de données. Les premières versions du script intégraient cependant une procédure d'ajustement de cinq modèles différents (linéaire, exponentiel, log-logistique, gaussien-probit et log-gaussien-probit) permettant de décrire de nombreuses situations qu'il aurait été possible de rencontrer dans le jeu de



(a) Schéma explicatif de la méthode de sélection qualitative basée sur l'ANOVA. Les étoiles au-dessus des points de données indiquent que le test d'ANOVA a renvoyé une valeur de p-value inférieure au seuil de significativité fixé. Il est à noter que, l'ANOVA ne permettant pas de donner seule des informations sur la localisation des groupes présentant des différences par rapport aux autres, la position des étoiles de significativité est purement illustrative afin de montrer une différence avec le niveau de réponse au contrôle et ne correspond pas à la réalité du test employé.



(b) Schéma explicatif de la méthode de sélection quantitative basée sur un test de tendance linéaire. Les modèles linéaires appliqués sur les jeux de données pour les deux situations sont représentés par des lignes bleues.



(c) Schéma explicatif de la méthode de sélection quantitative basée sur un test de tendance quadratique. Les modèles quadratiques appliqués sur les jeux de données pour les deux situations sont représentés par des lignes bleues.

FIGURE 3.1 – Schémas des différents processus de sélections des couples espèce*endpoint présentant une réponse par rapport à la concentration en isoproturon envisagés et testés dans le cadre de l'approche classique. Les mesures de l'endpoint considéré sont représentées en ordonnée et les concentrations en isoproturon en abscisse (les ordres de grandeur utilisés n'ont aucun lien avec ceux utilisés et mesurés dans le jeu de données réel). Pour chaque sous-figure, chaque sous-graphique de gauche représente une situation où la valeur mesurée de l'endpoint ne varie pas en fonction de la concentration en isoproturon et chaque sous-graphique de droite une situation où cette mesure varie et où le couple espèce*endpoint devrait donc être sélectionné.

données. Le meilleur modèle était ensuite sélectionné sur la base des valeurs d'AIC de chacun, ce qui permettait d'obtenir des modèles plus adaptés à chaque type de relation concentration-réponse observé. Deux de ces modèles, les modèles gaussien-probit et log-gaussien probit, permettaient de plus de modéliser des relations non-monotones et ainsi de prendre en compte les quelques phénomènes d'hormèse pouvant être observés dans le jeu de données. Cependant, ces situations étaient assez rares au sein du jeu de données et d'autres questions étaient soulevées par la prise en compte de formes de modèles différents. Notre objectif était en effet de comparer des SSD produits dans deux situations différentes, avec et sans compétition, ce qui aurait impliqué de fixer le modèle utilisé dans ces deux situations pour le même couple espèce*endpoint. L'inclusion de CEC calculées à partir de modèles différents aurait de plus posé un problème lors de la comparaison des diverses méthodes de prise en compte des valeurs multiples disponibles pour une même espèce. Faire la moyenne géométrique de valeurs de CEC calculées à partir de modèles différents aurait-il eu un sens? De plus, le calcul de "vraies" EC_x nécessite une CRC présentant deux asymptotes, à gauche et à droite, ce qui n'est le cas ni du modèle linéaire ni du modèle exponentiel. D'autre part, les modèles non-monotones induisaient d'autres questions liées au calcul des CEC. En effet, si la CRC modélisée était décroissante dans son ensemble mais avec un pic croissant au départ de la courbe lié à l'hormèse et que ce pic dépassait les 10% d'effet, à quelle position fallait-il considérer une IC_{10} ? La Figure 3.2 présente les différents cas de figure possibles. Cinq valeurs différentes seraient calculables pour cette IC_{10} , chacune correspondant au croisement du modèle avec l'une des deux bandes de couleur représentant des variations de $\pm 10\%$ autour du contrôle et de la valeur maximum modélisée pour l'endpoint donné. Seulement trois de ces IC_{10} potentielles seraient cependant intéressantes conceptuellement parlant (lignes verticales rouges sur la figure 3.2). L' IC_{10} pourrait ainsi être définie comme étant la valeur de concentration pour laquelle le modèle sort pour la première fois de l'intervalle de 10% de variation autour du contrôle, c'est à dire la première fois que l'endpoint s'écarte de la valeur considérée comme non affectée par l'endpoint. La seconde possibilité serait de considérer que la phase d'hormèse peut être considérée comme une nouvelle valeur pour laquelle l'endpoint n'est pas affecté par le contaminant (voir cependant la section 4.2.3 relativisant cette hypothèse) et l' IC_{10} serait ainsi la concentration pour laquelle la modélisation de la valeur de l'endpoint ressortirait de l'intervalle de 10% de variation autour de cette valeur maximale. Enfin, une troisième possibilité serait d'envisager que l'hormèse peut ne pas être considérée comme étant un effet négatif sur l'organisme et donc de calculer l' IC_{10} comme étant la valeur de concentration pour laquelle le modèle sort définitivement de la zone de 10% de variation autour du contrôle (cette valeur d' IC_{10} serait cependant très proche de celle

calculée si le phénomène d'hormèse n'avait pas été utilisé, par exemple en modélisation la relation concentration-réponse à l'aide d'un modèle sigmoïdal). Deux autres IC_{10} seraient calculables (lignes grises pointillées sur la figure 3.2) mais il serait difficile de justifier leur utilisation.

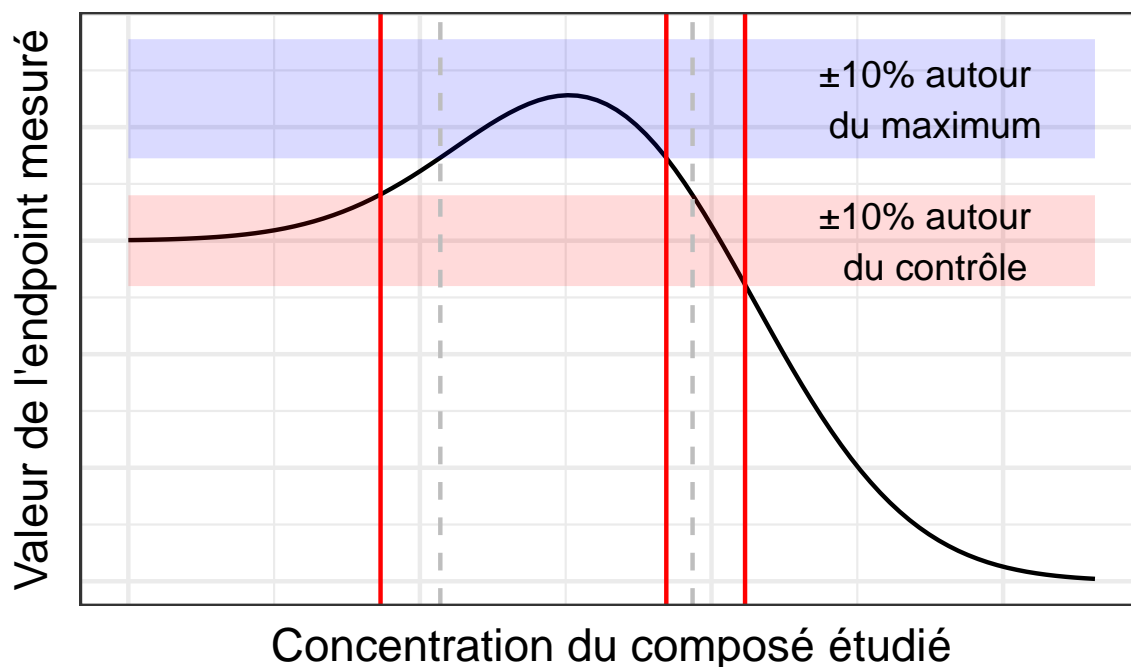


FIGURE 3.2 – Graphique présentant les trois EC_{10} qu'il est possible de calculer à partir d'une CRC prenant en compte un phénomène d'hormèse plus important que 10% d'effet. Le modèle utilisé est un modèle gaussien-probit à 5 paramètres et est représenté par la ligne pleine noire. Les bandes horizontales rouge et bleue représentent une variation de $\pm 10\%$ autour du contrôle et de la valeur maximum modélisée pour l'endpoint donné. Les lignes verticales représentent les IC_{10} calculables dans cette situation, les lignes rouges représentant celles présentant un réel intérêt et les lignes grises pointillées les IC_{10} théoriquement calculables mais dont l'utilisation serait plus difficile à justifier.

3.2.3.3 Autre méthode de construction des SSD

Une cinquième méthode de gestion de CEC produites à partir de données mesurées sur plusieurs endpoints pour une même espèce a été, un temps, envisagée. Cette cinquième méthode avait pour but de contourner le problème de la gestion de ces données multiples en intégrant toutes les CEC calculées à la "SSD" produite, comme si chaque couple espèce*endpoint était une espèce à part entière. Les modèles ainsi obtenus n'auraient de fait plus été des SSD, mais des "distributions de sensibilité des couples espèce*endpoint". Le poids de chaque espèce au sein du modèle aurait ainsi été pondéré par le nombre d'endpoints sélectionné pour chacune. Cela aurait entraîné une sur-représentativité des espèces pour lesquelles un grand nombre d'endpoints était affecté, au détriment des espèces présentant une sensibilité focalisée sur de moins nombreux endpoints, traduisant ainsi la pleine palette des effets observables sur la communauté. Ceci aurait

permis de voir les effets concrets de la compétition interspécifique sur les "différentes sensibilités" de chaque espèce à l'isoproturon et non sur des résumés statistiques pour chaque espèce. Cette approche est toutefois fortement dépendante du choix des endpoints mesurés lors de l'étude. Sur les douze endpoint utilisés, quatre traduisent en effet uniquement des effets sur la masse sèche de parties des organismes et sont liés aux trois endpoints traduisant les longueurs et hauteurs de ces parties des organismes. Trois autres endpoints traduisent des effets sur les capacités photosynthétiques des organismes. Ces groupes d'endpoints étant liés aux mêmes fonctions, leurs valeurs se retrouvent ainsi au moins partiellement corrélées. La Figure 3.3 montre les corrélations existant dans le jeu de données entre les différents endpoints. Il est clair que les endpoints liés à la masse sèche et à la longueur et hauteur des racines et parties aériennes des plantes sont fortement corrélés, avec des coefficients de corrélation allant jusqu'à 0,997. Ceci aurait entraîné un biais de représentativité dans cette cinquième approche, biais moins visible pour les autres approches où il s'est retrouvé dilué dans le résumé statistique utilisé pour chaque espèce. Outre la corrélation entre endpoints, cette approche aurait également pu mener à d'autres problèmes. En effet, comme cela a déjà été explicité dans les chapitres 1 et 2, il est important de ne pas avoir de surreprésentation des espèces sensibles au sein d'une SSD. Ceci s'applique également aux couples espèce*endpoint de ce cas et aux pseudo-SSD en découlant puisque les mêmes risques de multimodalités de la distribution des données à modéliser existe dans ce cas. Si l'on pose ainsi l'hypothèse que ce sont les espèces les plus sensibles qui auraient présenté une réponse sur le plus grand nombre d'endpoints, du fait des compromis énergétiques impliqués dans les phénomènes de résistance à un contaminant, alors ces cas de surreprésentativité des CEC basses auraient été présents et les pseudo-SSD construits de mauvaise qualité (ce qui a été observé lors des tests préliminaires intégrant cette méthode de gestion des CEC multiples pour chaque espèce).

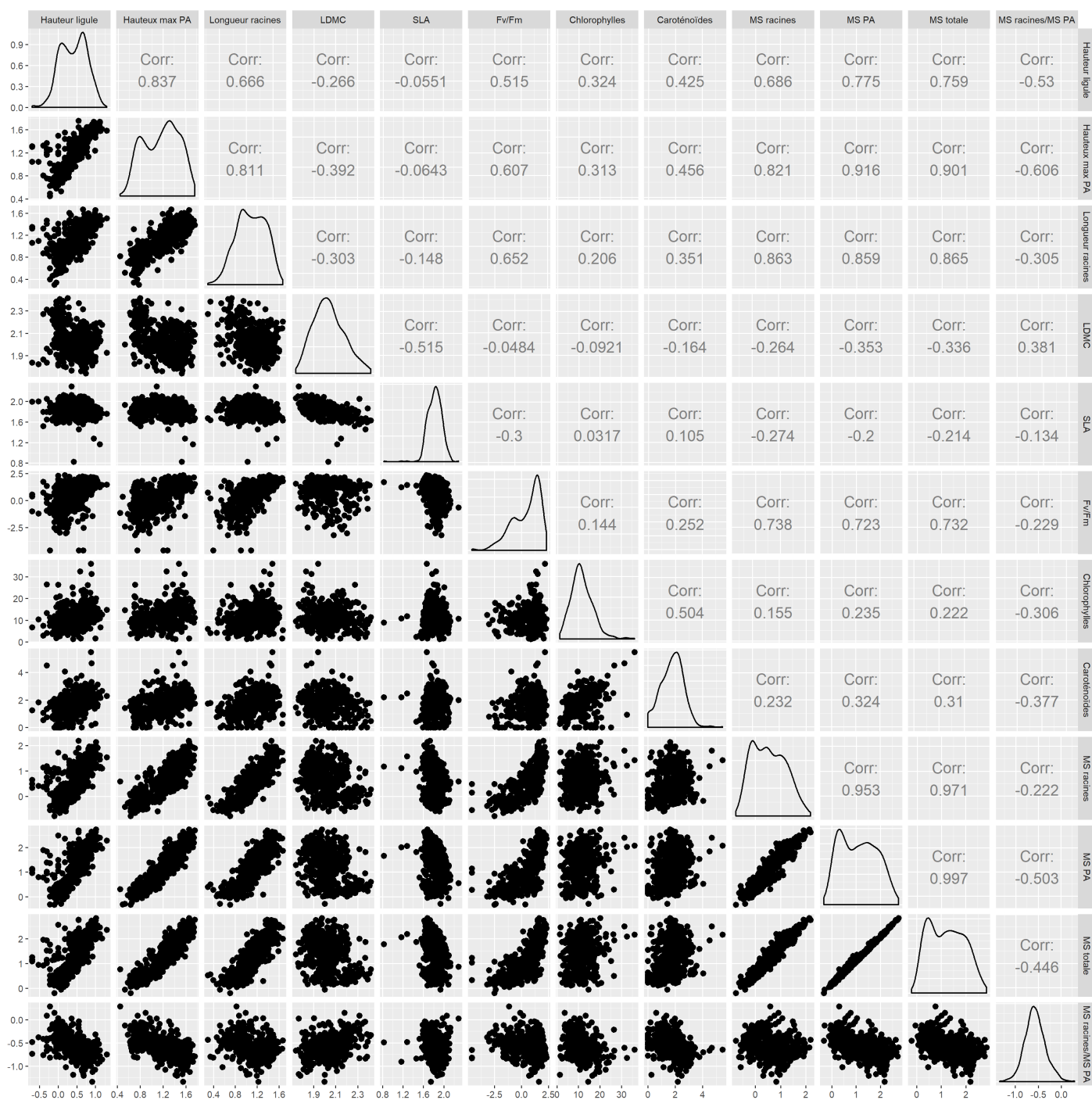


FIGURE 3.3 – Graphique présentant la corrélation entre les différents endpoints mesurés dans le jeu de données testant l’effet de la compétition interspécifique sur la sensibilité des plantes herbacées. Les sous graphiques de la zone sous-diagonale montrent les graphiques de corrélation entre endpoints. Les sous graphiques de la zone sur-diagonale contiennent les valeurs de coefficient de corrélation de Pearson entre deux endpoints. Les sous graphiques de la diagonale principale montrent la distribution lissée des données pour chaque endpoint.

3.3 Approche hiérarchique

3.3.1 Présentation

L'approche hiérarchique avait pour but, au contraire de l'approche classique, de modéliser au sein d'un même modèle l'intégralité du jeu de données, ceci afin d'en optimiser l'usage, l'analyse et l'interprétation et de propager l'incertitude issue des données expérimentales. Inclure toutes les données au sein d'un unique modèle n'a cependant pas été possible à cause des différences d'échelle entre les valeurs mesurées pour les différents endpoints et neuf modèles différents ont ainsi été construits, un par endpoint (trois endpoints, les quantités de chlorophylle et de caroténoïdes ainsi que le ratio masse sèche des racines/masse sèche des parties aériennes ont été écartés de cette analyse du fait du faible nombre de "réponses" observées pour les différentes espèces). Chaque modèle a permis d'estimer les paramètres permettant de tracer douze CRC (pour les six espèces et deux modalités de compétition) et d'estimer de quelle manière la compétition affectait chacun des paramètres de ces courbes. L'effet de la compétition sur un de ces paramètres pouvait ainsi être nul, être générique parmi les différentes espèces ou être spécifique à chaque espèce.

3.3.2 Bases théoriques de l'approche bayésienne

Dans l'article présenté dans cette section, les modèles ont été construits en utilisant des méthodes d'inférence bayésienne. Le paradigme bayésien est différent de celui appliqué en statistiques fréquentistes, tant d'un point de vue méthodologique que philosophique. Dans cette section (basée sur [BILLOIR \[2008\]](#)) seront notés :

- θ les paramètres du modèles, les quantités latentes (qui ne sont ni des données, ni des paramètres) et les données manquantes
- Y les données obtenues lors de l'expérimentation et les covariables

3.3.2.1 Paradigmes fréquentiste et bayésien

Les méthodes fréquentistes, qui sont les plus couramment employées dans le monde scientifique, sont basées sur la fréquence d'apparition d'un phénomène, ce qui implique d'avoir à disposition un grand nombre de données. Dans le cadre d'ajustement de modèles, le paradigme fréquentiste pose de plus l'hypothèse que chaque paramètre d'un modèle possède une valeur "exacte", ponctuelle mais inconnue. Il en découle que les probabilités (appelées vraisemblances) optimisées dans les approches fréquentistes correspondent à la probabilité d'observer les données rassemblées en considérant que le paramètre a une valeur fixée. Par exemple, dans le cadre

d'un test d'hypothèse, la p-value calculée ne sera pas égale à la probabilité que l'hypothèse H_0 soit vraie vu les données observées (soit, $\mathcal{P}(\theta | Y)$; comme elle l'est souvent interprétée de manière erronée dans la littérature), mais à la probabilité d'observer les données obtenues si H_0 est vraie (soit $\mathcal{P}(Y | \theta)$, probabilité également appelée vraisemblance et moins intuitive à interpréter directement).

3.3.2.2 Théorème de Bayes

L'inférence bayésienne est un moyen d'accéder à la probabilité $\mathcal{P}(\theta | Y)$ qui est celle nous intéressant réellement lors d'une expérimentation. Ceci se fait grâce à l'utilisation du théorème de Bayes, ce qui donne son nom à cette approche :

$$\mathcal{P}(\theta | Y) = \frac{\mathcal{P}(\theta)\mathcal{P}(Y | \theta)}{\mathcal{P}(Y)} \quad (3.1)$$

Dans cette équation, $\mathcal{P}(\theta)$ est la distribution de probabilité de θ prise indépendamment des données qui peut être interprétée comme la distribution de probabilité supposée de θ avant d'avoir vu les données, appelée distribution *a priori* de θ . $\mathcal{P}(Y)$ est la distribution non conditionnelle des données. Les données étant constantes, $\mathcal{P}(Y)$ est ainsi une constante. Le théorème de Bayes peut ainsi être écrit de manière simplifiée de la manière suivante :

$$\mathcal{P}(\theta | Y) \propto \mathcal{P}(\theta)\mathcal{P}(Y | \theta) \quad (3.2)$$

$\mathcal{P}(\theta)$ étant appelé distribution *a priori*, $\mathcal{P}(\theta | Y)$ est appelé distribution *a posteriori* et est proportionnel au produit de la distribution *a priori* et de la vraisemblance. Dans les faits, le concept est ainsi de pouvoir estimer la distribution du paramètre d'intérêt à partir de la connaissance *a priori* que l'on en a et d'un jeu de données observé. Par exemple, si l'on essaie d'estimer la probabilité d'obtenir pile sur une pièce à partir des résultats de dix lancers de cette même pièce ayant donné sept fois pile, une approche fréquentiste mènera au résultat que la pièce a 70% de chances de tomber sur pile (avec un large intervalle de confiance). L'approche bayésienne cependant, si l'on considère dès le départ que la pièce est probablement équilibré et que cela est traduit sous la forme d'un *prior*, donnera une distribution *a posteriori* tendant vers le résultat de 50%, les données n'étant pas suffisante pour invalider cet *a priori*. Cependant, si la pièce n'est pas équilibré mais a effectivement 70% de chances de tomber sur pile et que l'on augmente la taille du jeu de données à l'aide de nouveaux lancers de cette pièce, la distribution *a posteriori* fournie par l'approche

bayésienne s'éloignera petit à petit de la valeur de 50% pour s'approcher de la valeur de 70% au fur et à mesure que de l'information supplémentaire (*i.e.* des résultats de nouveaux lancers) est ajoutée au modèle. Au niveau de l'approche fréquentiste, l'intervalle de confiance se resserrera autour de la valeur 70% au fur et à mesure de l'ajout de ces nouveaux lancers. Les résultats des deux approches ont ainsi tendance à se rejoindre dans le cas de grands effectifs, mais l'inférence bayésienne peut aider à réaliser de meilleures estimations dans le cas de faibles effectifs sous réserve d'avoir à disposition des informations solides afin de définir les *priors*, obtenues par exemple à l'aide d'expérimentations préliminaires. L'inférence bayésienne est par exemple utilisée afin de détecter les spams encombrants nos boîtes mails : les *priors* sont fixés grâce à la connaissance apportée par de nombreux mails précédents ayant été classifiés comme spam ou non.

Certaines distributions *a priori* se combinent admirablement à la fonction de vraisemblance dans le théorème de Bayes et permettent ainsi d'obtenir facilement une distribution *a posteriori*. Ces cas idylliques font ainsi intervenir des distributions naturelles conjuguées. Ces cas ne seront pas traités ici car ils n'ont pas été utilisés dans notre étude. Lorsque ces distributions naturelles conjuguées ne sont pas utilisables (par exemple, dans le cas de modèles trop complexes), on peut déterminer les distributions *a posteriori* à l'aide de simulations.

3.3.2.3 Méthodes de Monte-Carlo par chaînes de Markov

Ces simulations sont réalisées grâce à des méthodes de [Monte-Carlo par chaînes de Markov – ou Markov Chain Monte Carlo– \(MCMC\)](#) qui permettent d'obtenir des tirages issus d'une variable aléatoire dont la loi de probabilité est connue à une constante près, permettant ainsi d'estimer la distribution *a posteriori* de θ . L'ensemble des N tirages (nombre d'itérations choisi au préalable) réalisé peut être qualifié de chaîne de Markov car la valeur de chaque tirage n'est dépendante que de la valeur du tirage précédent. Les tirages finiront normalement, itération par itération, par converger vers la distribution $\mathcal{P}(\theta | Y)$. Il est ainsi important de retirer les premières itérations de la chaîne afin de ne conserver que les tirages ayant convergés (phase de *burn-in*). Différents algorithmes existent afin de réaliser ces simulations. Nous avons utilisé dans cette étude l'algorithme de Gibbs [CASELLA et GEORGE, 1992; GELFAND et SMITH, 1990; GEMAN et GEMAN, 1984] qui est lui-même un cas particulier de l'algorithme de Metropolis-Hastings [CHIB et GREENBERG, 1995; HASTINGS, 1970; METROPOLIS et collab., 1953].

3.3.2.4 Algorithme de Metropolis-Hastings

L'échantillonneur de Metropolis génère, pour chaque itération (notée $u = 1, \dots, U$), un point candidat θ^* à partir du point courant θ^{u-1} en utilisant une distribution conditionnelle permettant de calculer $\mathcal{P}_u(\theta^* | \theta^{u-1})$ et $\mathcal{P}_u(\theta^{u-1} | \theta^*)$. Sans rentrer dans le détail de l'équation (voir [BILLOIR \[2008\]](#)), le point candidat θ^* est associé à une probabilité α^* d'être accepté. Dans les faits, une valeur aléatoire nommée α_{min} est tirée dans une loi uniforme entre 0 et 1 : si $\alpha_{min} \leq \alpha^*$, alors θ^u prend la valeur de θ^* et dans le cas contraire, θ^u prend la valeur de θ^{u-1} . L'algorithme finit ainsi, au fur et à mesure des itérations, par converger vers la distribution *a posteriori* de θ avec l'avantage de favoriser les valeurs de θ les plus probables sachant les données, tout en parcourant l'ensemble de l'espace des paramètres grâce à sa composante aléatoire. Cependant, il peut s'avérer compliqué de trouver une distribution conditionnelle de proposition permettant de générer des points candidats assurant une convergence convenable de l'algorithme lorsque θ est de grande dimension. Ce problème est corrigé par l'algorithme de Gibbs, permettant ainsi quelques années plus tard de rendre l'inférence bayésienne plus abordable.

3.3.2.5 Algorithme de Gibbs

Cas particulier de l'algorithme de Metropolis-Hastings, l'algorithme de Gibbs présente la particularité de toujours accepter les points candidats θ^* successifs. De plus, la distribution conditionnelle de proposition est définie à partir de la structure hiérarchique du modèle bayésien, c'est à dire que les valeurs sont tirées selon les distribution marginales de chaque paramètre, conditionnellement aux valeurs courantes des autres paramètres. Ces distributions calculables à partir de la spécification du modèle (voir sous-section [3.3.2.6](#)) sont appelées distributions conditionnelles complètes. Dans le cas où θ est de dimension k , c'est à dire que k paramètres sont à estimer, l'algorithme est ainsi le suivant à chaque itération u :

- tirage de θ_1^u selon $\mathcal{P}_u(\theta_1 | \theta_2^{u-1}, \dots, \theta_k^{u-1}, Y)$
- tirage de θ_2^u selon $\mathcal{P}_u(\theta_2 | \theta_1^u, \theta_3^{u-1}, \dots, \theta_k^{u-1}, Y)$
- ...
- tirage de θ_k^u selon $\mathcal{P}_u(\theta_k | \theta_1^u, \dots, \theta_{k-1}^u, Y)$

$\theta^1, \theta^2, \dots$ sont ainsi les états successifs de θ dans la chaîne de Markov et, une fois la convergence atteinte, l'échantillon de θ obtenu suit la distribution *a posteriori* de θ . Différents logiciels permettent de mettre en place un échantillonnage via l'algorithme de Gibbs. Nous avons utilisé dans

cette étude le logiciel JAGS (Just Another Gibbs Sampler; [PLUMMER \[2003\]](#)) et le package R associé RJAGS [[PLUMMER, 2018](#)].

3.3.2.6 Modèle et DAG

Il est ainsi nécessaire de spécifier le modèle selon lequel les différents paramètres de θ et les données Y sont liés. Ces relations peuvent être décrites grâce à un [Grphe Orienté Acyclique –ou Directed Acyclic Graph– \(DAG\)](#) permettant de représenter toutes les quantités par des noeuds. La nature acyclique du [DAG](#) fait qu'étant donné ses noeuds parents, chaque noeud est indépendant de tous les autres noeuds représentés dans le graphe, à l'exception de ses descendants. Un [DAG](#) peut présenter trois types de noeuds différents, 1) les données (représentées par des rectangles), 2) les covariables (représentées par un double rectangle, mais non utilisé dans notre étude) et 3) les paramètres et variables latentes (représentés par des ellipses). Ces noeuds sont liés entre eux par deux types de liens, 1) les dépendances stochastiques (c'est à dire qu'un tirage aléatoire dans une loi intervient; représentées par des flèches pleines) et 2) les fonctions déterministes (c'est à dire qu'une relation directe, telle qu'une opération mathématique, est impliquée; représentées par des traits pleins). Le [DAG](#) réalisé dans notre étude ainsi qu'un tableau explicatif des différents noeuds et des relations existant entre eux est présent en au sein des *Supplementary information* de l'article soumis et trouvable en Annexe [A.2](#).

3.3.2.7 Pourquoi l'inférence bayésienne?

L'inférence bayésienne a été utilisée dans cette étude pour plusieurs raisons. La première et plus importante est que l'inférence bayésienne permet de mettre en place de manière simplifiée des ajustements de modèles hiérarchiques complexes. Nos modèles auraient également pu être ajustés en utilisant une approche fréquentiste, mais cela aurait été bien plus long et complexe à mettre en place. L'inférence bayésienne présente également l'avantage de donner des résultats sous la forme d'une distribution de la valeur de chacun des différents paramètres estimés, facilitant ainsi leur interprétation.

De plus, n'ayant pas utilisé de *priors* informatifs traduisant une connaissance préalable de la valeur probable des différents paramètres, mais ayant utilisé des valeurs de *priors* directement estimées à partir du plan d'expérience (*e.g.* la gamme de concentrations testées) et des ordres de grandeur des variables, la critique la plus courante à l'encontre du bayésianisme, à savoir son manque d'objectivité du fait de la connaissance *a priori* injectée dans la modélisation par les *priors*, peut difficilement nous être faite.

3.3.3 Article publié dans *Science of the Total Environment*

A partir de la page suivante se trouve la "version auteur" de l'article publié dans le journal *Science of the Total Environment*. Le *Supplementary Information* de cet article peut être trouvé en Annexe [A.2](#).

How does interspecific competition modify the response of grass plants against herbicide treatment? A hierarchical concentration-response approach.

Vincent BAILLARD^{a,*}, Marie Laure DELIGNETTE-MULLER^b, Cécile SULMON^c, Anne-Kristel BITTEBIERE^d, Cendrine MONY^c, Ivan COUEE^c, Gwenola GOUESBET^c, Simon DEVIN^a, Elise BILLOIR^a

^a *Université de Lorraine, CNRS, LIEC, F-57000 Metz, France*

^b *Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, VetAgro Sup, UMR 5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, 69622 Villeurbanne, France*

^c *Univ Rennes, CNRS, ECOBIO [(Ecosystèmes, biodiversité, évolution)] - UMR 6553, F-35000 Rennes, France*

^d *Université de Lyon 1, CNRS, UMR 5023 LEHNA, 43 Boulevard du 11 novembre 1918, Villeurbanne Cedex, 69622, France*

Abstract

Ecological interactions are rarely taken into account in environmental risk assessment. The objective of this work was to assess how interspecific competition affects the way plant species react to herbicides and more specifically how it modifies the concentration-response curves that can be built using ecotoxicological bioassays. To do this, we relied on the results of experiments carried out on six grass plant species exposed to isoproturon under two conditions: in presence and in absence of a competitor. At the end of the experiments, eleven endpoints were measured. We modelled these data using a hierarchical modelling framework designed to assess the effects of competition on each of the four parameters of the concentration response curves, *e.g.* the level of response at the control or the EC₅₀, simultaneously for the six species. The modelled effects could be of three types, 1) competition had no effect on the parameter, 2) competition had the same effect on the parameter for all species and 3) competition had a different effect on the parameter for each species. Our main hypothesis was

*Corresponding author

Email address: vincent.baillard@univ-lorraine.fr (Vincent BAILLARD)

that different species would react differently to competition. Results showed that about a half of the estimated parameters led to a modification under competition pressure. Only a quarter of those competition parameters was better described with a species-specific effect, the other three-quarters being better described with the same effect between the different species. Our initial hypothesis was not supported as species mainly responded similarly to toxicants in the presence of competition. The competition effect on plants was mainly negative, showing that they were more affected by isoproturon under competition pressure. This study establishes how competition modifies plant responses to herbicide-related stress and how this interaction varies from one species to the other.

Keywords: hierarchical modelling, environmental risk assessment, isoproturon, non-target terrestrial plants, biotic interaction, multi-stress

1 1. Introduction

2 Environmental Risk Assessment (ERA) is mainly based on data from monospe-
3 cific bioassays, even if higher tier methods can use data from mesocosms or field
4 studies. Interspecific competition is one of the biotic interactions that can have
5 an important effect on plant development. It is defined by Aschehoug et al.
6 [2016] as "the ability of individuals to usurp resources or otherwise suppress
7 their neighbor's fitness and include both resource and interference competi-
8 tion". Even if this biotic constraint has been largely studied [Aschehoug et al.,
9 2016], studies of its interactions with pesticide-related stress remain scarce. For
10 example, Boutin et al. [2019] studied how sublethal doses of two herbicides,
11 glyphosate and metsulfuron methyl, could modify the competitive interactions
12 between two plants, *Centaurea cyanus* L. and *Silene noctiflora* L.. The re-
13 sults showed that competitive ability of *S. noctiflora* was negatively affected
14 by glyphosate, leading to a competitive advantage of *C. cyanus*. Concerning
15 metsulfuron methyl, interspecific competition was found to have an important
16 effect on the herbicide effects on seed production. Another study, tested the

17 effects of glyphosate on growth and competitive effect of two grass species *Fes-*
18 *tuca ovina* and *Agrostis capillaris*, in a semi-field experiment [Damgaard et al.,
19 2014]. The results showed that competitive relationships were modified as the
20 competitive effect of *F. ovina* increased whereas that of *A. capillaris* decreased
21 with increasing doses of glyphosate. It is important to emphasise that the study
22 of the interaction between interspecific competition and herbicide-related stress
23 encompasses two questions: whether the competitive ability is affected by the
24 herbicide or whether the tolerance to the herbicide is affected by competition.
25 The previously mentioned studies highlighted the importance to better charac-
26 terize competition effects and quantify their intensity in a context of herbicide
27 exposure, since competition may lead to modulation of plant herbicide stress
28 responses. Most of ERA methods use datasets from monospecific bioassays per-
29 formed in the absence of competition. Concentration-response curves (CRC) are
30 built and a critical effect concentration (CEC) as the x percent effect concentra-
31 tion (EC_x) is derived from each curve to summarize it. Those CEC are finally
32 modelled into species sensitivity distributions (SSD ; Posthuma et al. [2001]).
33 However, Baillard et al. [2020] demonstrated that both CEC and SSD curves
34 were modified when datasets corresponding to plants submitted to competition
35 were used.

36 Furthermore, the risk assessment procedures such as SSD focus on one sta-
37 tistical summary, the estimated CEC, *e.g.* the EC_{10} . Some works tried to
38 implement more complex modelling techniques. For example, Kon Kam King
39 et al. [2015] implemented hierarchical SSD models for six herbicides that in-
40 cluded every concentration-response model. One of the main advantages of this
41 approach was that it integrated the whole information of the data in the models
42 and not only a statistical summary as the EC_{10} . It propagated the uncertainty
43 in the different levels of organization of the data, *i.e.* the different species and
44 contaminant concentrations used, and it gave insights about a global response of
45 the community against the used contaminants. In this work, this approach was
46 carried out further on a dataset previously used in Baillard et al. [2020] where
47 grass plants were exposed to isoproturon in presence/absence of a competitor.

48 We assessed the effects of competition on plant responses to an herbicide by com-
49 paring the entirety of modelled concentration-response curves and analysing if
50 and how the different parameters of said concentration-response curves (*i.e.* the
51 level of the two asymptotes, the steepness of the curve and the position of the
52 inflexion point) were modified by competition. To do this, we modelled at once
53 the concentration-response curves for the different tested species and the two
54 competition modalities to assess in an integrated manner the effects of compe-
55 tition on plant responses to herbicide exposure. Our hypotheses were that, 1)
56 such a modelling framework would be suitable to help understand the interac-
57 tion between herbicide-related stress and interspecific competition and 2) based
58 on Baillard et al. [2020], interspecific competition would negatively affect plant
59 responses to the herbicide used.

60 2. Materials and methods

61 2.1. Experimental design

62 The dataset used in this work has previously been published in Baillard
63 et al. [2020], where a series of experiments realised on grass plant species were
64 carried out in two situations: 1) with plants isolated in each experimental de-
65 vice, *i.e.* without competition, and 2) with plants included in a standardized
66 hexagonal matrix of 37 seedlings of a competitor species *Bromus erectus* [Birch
67 et al., 2007]. Six species of the Poaceae family, representative of plant diversity
68 of grassland communities from permanent meadows, wasteland, grassed water-
69 ways, vegetated strips, or field edges in Brittany (France), were used for these
70 experiments: *Arrhenatherum elatius*, *Dactylis glomerata*, *Lolium multiflorum*,
71 *Poa pratensis*, *Poa trivialis* and *Trisetum flavescens*. Microcosms (three-liter-
72 round microcosms, 20 cm diameter, 12.9 cm height containing inert sterilized
73 vermiculite as substrate) were used for the experiments and vegetalized by trans-
74 ferring seedlings at 2-leaves phenological stage, previously grown from seeds in
75 absence of herbicide. Exposure to isoproturon began after a 4-days acclimatiza-
76 tion. Isoproturon was added to the microcosms *via* watering to induce herbicide

77 exposure to the roots. The watering protocol was as follows: 150 mL of contam-
78 inated nutritive solution [Hoagland basal salt mix (No2, Caisson Laboratories,
79 Smithfield, UT, USA) at 0.82 g/L, pH6] twice a week during the 25 days ex-
80 periment. Five isoproturon concentrations (0.25, 0.5, 1, 1.5 and 1.75 μ M, corre-
81 sponding to, respectively, 51.5, 103, 206, 309, and 360 μ g/L) plus a control were
82 used and for each concentration (six), competition modality (two) and species
83 (six), eight replicates were realized, giving a total of 576 experimental devices.

84 2.2. Endpoint analysis and dataset description

85 After the exposure, a set of eleven endpoints were measured on each or-
86 ganism. These endpoints were chosen to assess the effects of the two tested
87 factors, *i.e.* interspecific competition and herbicide exposure, on the species un-
88 der study. A list of publications used to set up this endpoint list can be found
89 in SI (A). Some endpoints were chosen for their expected response to both com-
90 petition and herbicide. This was the case of maximal shoot height, root length,
91 root dry mass (DM) and shoot DM, which represent global endpoints of plant
92 performance as an outcome of functional trait responses. Some other endpoints
93 were chosen mainly for their response to competition as functional responsive
94 traits: Leaf Dry Matter Content (LDMC), ligula height (corresponding to stem
95 height) and Specific Leaf Area (SLA). A third group of endpoints was chosen for
96 its response mainly to herbicide: carotenoid and chlorophyll contents and max-
97 imum efficiency of photosystem II determined from Fv/Fm (further referred to
98 as Fv/Fm). A final performance endpoint, total DM, was calculated by adding
99 together root and shoot DM. This was considered as a performance trait indi-
100 cating plant ability to tolerate isoproturon and competition. We also measured
101 *B. erectus* shoot DM at the end of the experiment to ensure that this DM was
102 constant between the different isoproturon concentrations for each species and
103 that competition pressure was constant all along each concentration-response
104 curve.

105 A log-transformation was applied on every endpoint but Fv/Fm. For this
106 latter, as it is expressed as a proportion, a logit transformation was applied.

107 Such transformations helped improve data normality and homoscedasticity as
 108 shown in Chiarini et al. [1998] and Baillard et al. [2020].

109 2.3. Data modelling

110 2.3.1. Rationale

111 The main objective was to derive parameter values for the concentration-
 112 response curves (CRCs) and to estimate the modification of those parameter
 113 values due to interspecific competition. This was done to describe in a more
 114 integrated way the effects of interspecific competition on grass plant response
 115 toward an herbicide and see if those competition effects were similar between the
 116 different tested species. When looking at CRCs independently, it is impossible
 117 to draw a global and statistically significant conclusion concerning the effects of
 118 competition. Here, we built a modelling framework allowing to take into account
 119 every data simultaneously and help co-interpret the results for each species.
 120 For each endpoint, twelve CRCs were described within one single hierarchical
 121 model (six species * two competition modalities), allowing to describe every data
 122 point, *i.e.* for every species, competition modality, isoproturon concentration
 123 and replicate, and to study the effects of interspecific competition on the CRCs
 124 of all species at once. The modelling framework was built to assess the effects of
 125 competition on different elements of the CRC as for example the modification
 126 of the level of response at the control, *i.e.* without herbicide exposure, or the
 127 shift in EC_{50} values.

128 2.3.2. Presentation of the core model

129 For each endpoint, a modelling framework was designed to encompass twelve
 130 CRCs. We used a log-probit model to describe those curves:

$$\begin{aligned} \mu_{i,j,k} &= d_{i,j} - \Delta dc_{i,j} * \phi\left(\frac{\log(x_k/e_{i,j})}{b_{i,j}}\right) * resp_i \\ y_{i,j,k,l} &= \mu_{i,j,k} + \epsilon_{i,j,k,l} \text{ with } \epsilon_{i,j,k,l} \sim \mathcal{N}(0, S_i) \end{aligned} \quad (1)$$

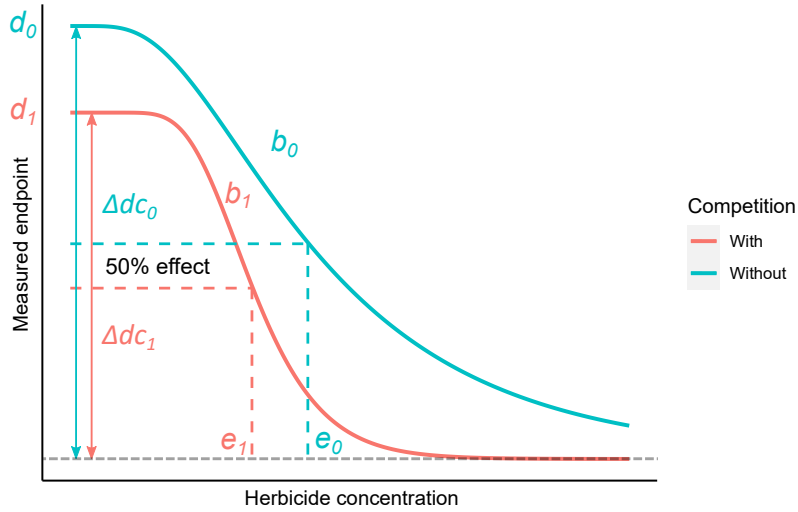
131 where i indicates the species, j indicates the competition modality (0 means
 132 there is no competition and 1 means there is competition), k indicates the iso-
 133 proturon concentration and l indicates the replicate. $y_{i,j,k,l}$ is the measured

134 endpoint value, $d_{i,j}$ is the asymptotic response for low concentrations, $\Delta dc_{i,j}$ is
 135 the difference between $d_{i,j}$ and the response value at high concentrations, $e_{i,j}$
 136 is the concentration of the curve's inflection point, corresponding to the EC₅₀
 137 value, and $b_{i,j}$ is a shape parameter. More precisely, $b_{i,j}$ corresponds to the stan-
 138 dard deviation of the normal distribution in log scale of concentrations of which
 139 ϕ is the cumulative distribution function. Hence, the lower is $b_{i,j}$, the steeper
 140 is the log-probit model. A summary of the role of these different parameters
 141 on the log-probit curves can be found in Figure 1. Because $b_{i,j}$ and $e_{i,j}$ values
 142 could take various orders of magnitude, they were manipulated in log scale. The
 143 notations $\log b_{i,j}$ and $\log e_{i,j}$ will be used hereafter. For each species, replicate
 144 spreading around CRC is considered to be Gaussian and is characterized by a
 145 standard deviation S_i supposed to be constant inside a given species and thus
 146 independent of concentration and competition. The $resp_i$ parameter indicates
 147 whether the log-probit model is necessary to describe the concentration-response
 148 relationship or if a constant model at the $d_{i,j}$ level describes the data sufficiently
 149 well. We considered that $resp_i$ should be the same with and without competi-
 150 tion for a given endpoint, so that this parameter is defined at the species level.

151 2.3.3. Modelling of competition effects, parameter definition and model choice

152 For each species (index i), two sets of basic log-probit parameters ($d_{i,j}$,
 153 $\Delta dc_{i,j}$, $\log e_{i,j}$ and $\log b_{i,j}$, this group of parameters later denoted as $\theta_{i,j}$) were
 154 estimated, one in absence ($j = 0$) and the other in presence ($j = 1$) of com-
 155 petition, these two sets of parameters later denoted as $\theta_{i,0}$ and $\theta_{i,1}$. For each
 156 parameter, the difference of value between the two competition modalities, *e.g.*
 157 the difference between $d_{i,0}$ and $d_{i,1}$, were defined by competition parameters
 158 named *compd* for $d_{i,j}$, *comp Δ dc* for $\Delta dc_{i,j}$, *complog e* for $\log e_{i,j}$ and *complog b*
 159 for $\log b_{i,j}$, this group of parameters later defined as *comp θ* (see SI B). For a
 160 given endpoint, we considered that each *comp θ* parameter could be of three
 161 different types. First, it could be a null effect and be equal to 0 for every species
 162 as it was possible for interspecific competition to have no visible effects on the
 163 parameter for the given endpoint. Second, it could have a constant value among

Figure 1: Scheme of the role of the different parameters of the basic log-probit model, their modification by the competition parameters and how this is translated on theoretical CRCs showing a visible variation of parameters value with competition: the blue curve and the parameters named with the index 0 refers to the situation without competition and the red curve and the parameters named with the index 1 to the situation with interspecific competition.



164 the different species (fixed effect, *i.e.* generic effect) meaning that modelling the
 165 same non-null effect of competition on CRC best described the data. Finally,
 166 the competition parameter could have a different value for each species (random
 167 effect, *i.e.* species-specific effect) as reaction to competition is not necessarily
 168 the same for every species. In that last case, competition parameters became
 169 respectively $compd_i$, $comp\Delta dc_i$, $complog e_i$ and $complog b_i$, this group of param-
 170 eters later defined as $comp\theta_i$ parameters, as they have different values for the
 171 different species.

172 The effects of those competition parameters on the CRC can be highlighted
 173 and translated into biological terms. $compd$ translates the modification of the
 174 response level at the control, *i.e.* without herbicide exposure, and shows the
 175 effects of competition alone on the monitored endpoint. The three other $comp\theta$
 176 parameters ($comp\Delta dc$, $complog e$ and $complog b$) are for their part translating
 177 a modification of the toxic effects by competition ($\Delta dc_{i,j}$, $log e_{i,j}$ and $log b_{i,j}$

178 being contaminant-related parameters) as $comp\Delta dc$ translates a change in the
179 amplitude of the toxic response, $complogc$ a change in the concentration at which
180 is situated the inflection point of the curve, *i.e.* a change in the EC_{50} which is
181 commonly used in ERA, and $complogb$ a change in the concentration-response
182 curve steepness.

183 As $\theta_{i,j}$ parameters were defined at the species level, each parameter had a
184 different value for each species, but these values were assumed to be normally
185 distributed, as frequently hypothesized in Species Sensitivity Distribution mod-
186 elling [Posthuma et al., 2001]. Likewise, when $comp\theta$ parameters were defined
187 as random (*i.e.* species-specific parameters), they were defined at the species
188 level and assumed to be normally distributed.

189 The type of each competition parameter was defined by calculating the DIC
190 (Deviance Information Criterion, a criterion of fit quality for hierarchical models
191 using Bayesian inference penalized by the model complexity) of models built
192 using every different combination types for each competition parameter and
193 selecting the model with the lowest DIC. When DIC values were close, *i.e.*
194 with a difference of less than two as commonly applied for the AIC criterion
195 in frequentist inferences, the simplest model was kept. For a global view of
196 the built models, a summary of the defined nodes and their definition and an
197 example of a probabilistic Directed Acyclic Graph (DAG) can be found in SI B.

198 2.3.4. Inference and parameter estimation

199 Bayesian inference was carried out to estimate model parameters. This
200 method provides estimates as posterior distributions, based on prior distribu-
201 tions and observations. In this work, mainly weakly informative priors based on
202 the experimental design were chosen to keep inferences in a reasonable range.
203 The details of how those priors were defined and the explanations of these values
204 can be found in SI C. Posterior parameter estimation by Bayesian inference were
205 realized with Markov Chains Monte-Carlo techniques [Gilks et al., 1996] using
206 JAGS [Plummer, 2003] and Rjags [Plummer, 2018] under the R environment [R
207 Core Team, 2019]. Three independent chains were generated. For each model,

208 a Raftery and Lewis diagnostic [Raftery and Lewis, 1991] was done to define
209 the number of iterations necessary to reach a good convergence in our simu-
210 lations. For each endpoint, chain convergence was checked visually and using
211 Gelman and Rubin convergence diagnostic [Gelman and Rubin, 1992]. To take
212 into account potential autocorrelation of iterations, we applied a "thin" on the
213 chains, consisting in keeping only one simulated point every thin number. The
214 precise procedure and settings used for simulations can be found in SI D. DIC
215 values were calculated using the same number of iterations and thin. Parameter
216 estimation was realized in two steps since, because of its boolean nature, the
217 estimation of $resp_i$ at the same time of the other parameters caused convergence
218 difficulties for these parameters. First, the simulations were run as described
219 above but only the estimated values of the $resp_i$ parameter were kept. Those
220 values were considered to be of good quality after a visual inspection of the
221 CRCs. In a second time, the simulations were run again with $resp_i$ values fixed
222 at 0 or 1 according to the results of the first simulation.

223 3. Results

224 3.1. Modelling quality indicators

225 For a majority of endpoints, the procedure was able to return CRCs that
226 described the data well. The exceptions were for chlorophyll and carotenoid
227 contents that exhibited high variability and for which responses varied very
228 little against the isoproturon concentration. Those endpoints were excluded
229 from the analysis (raw data plots for those two endpoints can be found in SI
230 E), leaving nine remaining endpoints for the modelling.

231 With a maximum value of about 1.04, the results obtained for the Gelman
232 and Rubin indicator were low enough to indicate a good convergence of the
233 Bayesian inference (detailed results are provided in SI F). Table 1 shows which
234 effect type was applied on each $\theta_{i,0}$ parameter, *i.e.* in absence of competition, to
235 obtain its $\theta_{i,1}$ counterpart, *i.e.* in presence of competition. For every endpoint,
236 best models included at least one non-null $comp\theta$ parameter, highlighting an

237 effect of interspecific competition. However, for the two endpoints of root length
 238 and root DM, competition only modified the response to the control (*via compd*),
 239 meaning that the other aspects of the modelled CRCs were not significantly
 240 affected by the competition.

Competition effect on parameter				
Endpoint	$d_{i,j}$ (<i>via compd</i> or <i>compd_i</i>)	$\Delta dc_{i,j}$ (<i>via compΔdc</i> or <i>compΔdc_i</i>)	$loge_{i,j}$ (<i>via comploge</i> or <i>comploge_i</i>)	$logb_{i,j}$ (<i>via complogb</i> or <i>complogb_i</i>)
Fv/Fm	-	-	-	Fixed
LDMC	-	-	Fixed	Fixed
Ligula height	-	Fixed	Fixed	Fixed
Max shoot height	Random	Fixed	-	-
Root DM	Fixed	-	-	-
Root length	Fixed	-	-	-
Shoot DM	Random	-	Fixed	-
SLA	Fixed	-	Random	-
Total DM	Random	-	Fixed	-
Effect type				
Total null	3	7	4	6
Total fixed	3	2	4	3
Total random	3	0	1	0

Table 1: In the first part: models chosen by the procedure described in this article. It is indicated for each endpoint which was the effect type for each *comp θ* or *comp θ_i* between null (represented by a "-" sign), fixed and random effect. In the second part: summary of the chosen competition effect type of each estimated *comp θ* or *comp θ_i* parameters. It is reminded that a fixed effect means that competition had a generic effect on the parameter (*i.e.* same effect for every species), while a random effect means that competition had a species-specific effect on the parameter.

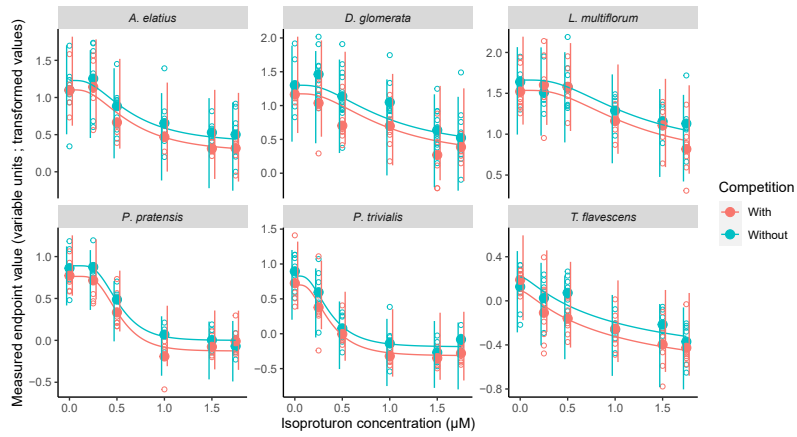
241 Two examples of fit can be found in Figure 2, for the performance endpoint
 242 root DM in Figure 2a and for SLA in Figure 2b (the CRCs fitted for every other

243 endpoint are provided in SI G). The results for those two endpoints were cho-
244 sen because they were good examples of how the different effect types applied
245 by the modelling framework were translated in CRCs. For root DM (and for
246 root length), the data were better described with a null effect of competition on
247 $\Delta dc_{i,j}$, $loge_{i,j}$ and $logb_{i,j}$ and with a fixed effect on $d_{i,j}$ which reflects an effect
248 of competition without herbicide-related stress. We can see on Figure 2a that
249 this is visible on the CRC with only a vertical shift between curves with and
250 without competition. For the competition responsive functional endpoint SLA,
251 the data were better described with a null effect of competition on $\Delta dc_{i,j}$ and
252 $logb_{i,j}$, a fixed effect on $d_{i,j}$ and a random effect on $loge_{i,j}$ which reflects an
253 effect of competition on EC_{50} . The effect on $loge_{i,j}$ is translated on Figure 2b
254 by an horizontal shift of the curve to the left and a decrease of the EC_{50} values,
255 this shift being different for each species contrary to the vertical one, the same
256 vertical shift as for root DM being also visible. These two shifts mean that for
257 SLA, interspecific competition modified the way plant responded to isoproturon
258 by making the different species more sensitive to herbicide (*via comploge_i* pa-
259 rameter). The only exception is for *P. trivialis* which exhibited no response
260 against isoproturon with or without competition and had a $resp_i$ value of zero,
261 corresponding to a constant curve. Shoot and total DM performance endpoints
262 had a pattern close from the one displayed for SLA. Competition had an effect
263 on the same two parameters. However, for shoot and total DM, the competi-
264 tion effect was random on $d_{i,j}$ meaning that competition alone had a different
265 effect on the different species, and a fixed one on $loge_{i,j}$ meaning that the shift
266 in EC_{50} values was the same from one species to another (Figures S9 and S10
267 from SI G). Of the four remaining endpoints, three of them, Fv/Fm, LDMC
268 and ligula height, had respectively one, two and three parameters with a fixed
269 effect. They had a fixed effect on $logb_{i,j}$ which reflects an effect of competition
270 on the slope of the curve. In addition, for LDMC and ligula height, a fixed
271 effect was applied for $loge_{i,j}$. The $loge_{i,j}$ and $logb_{i,j}$ parameters together define
272 the species sensitivity against the contaminant and are the most important to
273 assess the effects of competition on species response. Finally, ligula height also

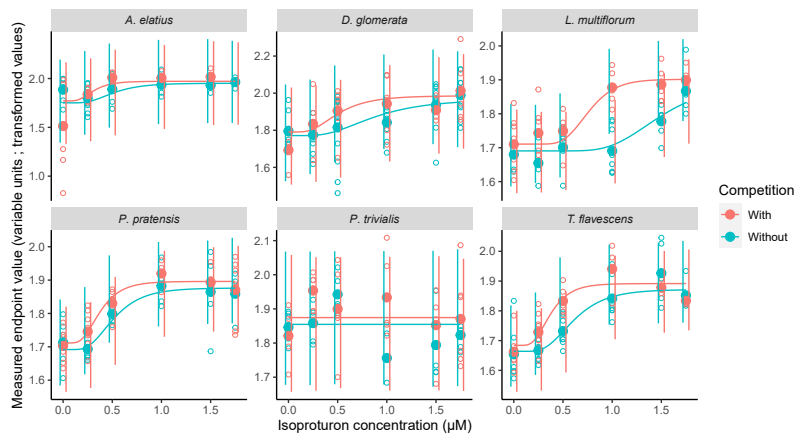
274 had a fixed effect on $\Delta dc_{i,j}$. This parameter is more complicated to interpret
275 as it reflects a change in response amplitude between the two asymptotes of
276 the curves. However, the absence of effect on the $d_{i,j}$ parameter means that
277 the species were more strongly impacted by high doses of isoproturon when the
278 competition constraint was present. The remaining endpoint is the maximum
279 shoot height, for which the best model included a random effect applied on $d_{i,j}$
280 and a fixed effect on $\Delta dc_{i,j}$. It is difficult to interpret this situation directly. The
281 fitted CRCs for this endpoint (Figure S6 from SI G) show that some species are
282 less affected by high concentrations of isoproturon in presence of a competition
283 constraint.

284 The second part of Table 1 summarizes the number of null, fixed and random
285 effects of competition on each of the four parameters of CRCs for the nine
286 endpoints. We can see in this table that adding a competition effect in the
287 concentration response curves described the data better for 16 parameters on
288 36. These effects were mainly fixed effects (12 parameters on 36) and random
289 effects were rarely selected by the modelling framework (4 parameters on 36). A
290 small majority of competition parameters was determined as corresponding to
291 null effects (20 parameters on 36), meaning that data were not described better
292 when effects due to interspecific competition was taken into account for these
293 parameters.

294 Graphs showing the estimated competition effects for each CRC parameter
295 can be found in Figure 3a for fixed effects (*i.e.* generic effects) and 3b for random
296 effects (*i.e.* specific effects). We can see on these two figures that observed
297 competition effects could be positive or negative depending on the measured
298 endpoints. In some cases, for example for $compd_i$ of shoot DM (Figure 3b),
299 this effect was positive for some species (*L. multiflorum*) and negative for the
300 others, showing a variety of reaction against competition not only in intensity,
301 but sometimes also in direction. Another important point was that for every
302 random effect on $compd_i$ (this trend was less visible on $comploge_i$), the rank of
303 intensity of this effect between the different species was similar: *D. glomerata*
304 and *P. trivialis* showed the most negative effect, *A. elatius*, *P. pratensis* and *T.*



(a) Root DM endpoint

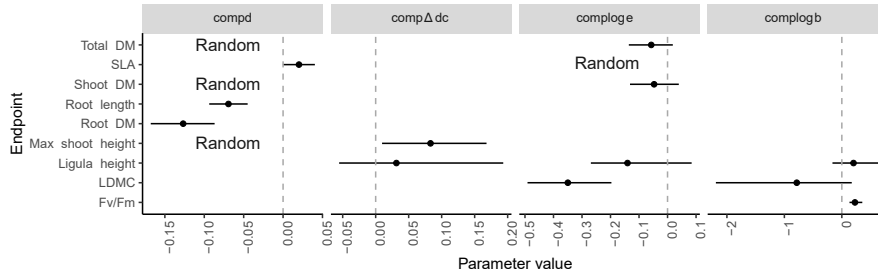


(b) SLA endpoint

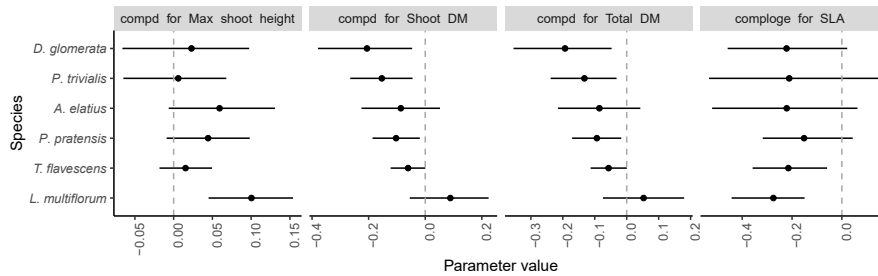
Figure 2: Example of concentration-response curves produced using parameters of the model built for the Root DM and SLA endpoints. Open circles represent the data point, plain circles represent the mean of data points for each concentration, the lines are the CRCs drawn using the mean estimated value of each parameter and the vertical plain lines are the 95% Credible Interval (CI) of the model response at each tested concentration (abscissa values were modified for those lines not to superimpose on the data points). In blue are the data/model without competition and in red the data/model with competition.

305 *flavescens* an intermediate effect and *L. multiflorum* the most positive effect,
 306 providing information about the difference of response to competitor of these

307 species. Species have been ordered on Figure 3b to highlight this point.



(a) For the fixed effect parameters.



(b) For the random effect parameters.

Figure 3: Figures showing median (point) and 95% IC (solid line) of the estimated $comp\theta$ and $comp\theta_i$ parameter value according to the effect type, the endpoint and the species (for random effect only). The vertical grey dashed lines highlight the zero value. For the fixed effect parameters (a), each graphic represents the information for a given $comp\theta$ parameter and each line give the associated value for a specific endpoint. The word "Random" means that the parameter was defined to be random and is represented on Figure 3b. No information means that the parameter was defined to be of the null type. For the random effect parameters (b), each graphic represents the information for a given $comp\theta_i$ parameter and endpoint combination. On each line is shown the informations for a specific species.

308 **4. Discussion**

309 Despite recent advances [Boutin et al., 2019, Damgaard et al., 2014], the
 310 effects of competition on plant response to pesticide exposure remain poorly
 311 characterised. In this work, we used a single modelling framework to analyse
 312 data from monospecific bioassays for six phylogenetically close plant species in

313 the presence and absence of interspecific competition. The aim was to see how
314 competition modifies the CRCs of those species for the studied contaminant.
315 This hierarchical modelling showed that an effect of interspecific competition
316 on plant response to herbicide was visible for every species and selected end-
317 point, highlighting the importance of using multi endpoint and/or multi species
318 approaches in ERA methods. This competition effect was highlighted by the
319 modelling framework on close to a half of the total estimated CRC parame-
320 ters. Only 25% of the estimated competition effect parameters varied from one
321 species to another, the others being defined as constant between the different
322 species.

323 This approach has the advantage to estimate the values of all parameters for
324 a given endpoint, *i.e.* for every species and competition modality, at once. The
325 CRCs of the six species and two competition modalities are defined all together
326 and are interdependent. This is not the case in classical ERA approaches as in
327 Baillard et al. [2020] where CRCs were defined independently. In our study, this
328 approach had the advantage to integrate the competition effect for the different
329 species in the four parameters of the sigmoid CRCs, to see which aspect of the
330 model the interspecific competition had an effect on. An alternate approach
331 would have been to model the response of all species and all endpoints simul-
332 taneously. However, this would have been impossible as the different endpoints
333 exhibited a range of values that varied too widely, limiting the shrinkage ca-
334 pabilities of the model fitting. It would have been possible to transform the
335 data to bring them in the same range, for example by calculating percentages of
336 variation compared to the control, but we made the choice not to superimpose
337 different transformation types as we already applied one to improve residuals
338 normality and homoscedasticity. This would also have been problematic for
339 SLA that increases with isoproturon compared to the other tested endpoints
340 that decrease with isoproturon.

341 In our modelling process, integrating the competition effect in the models
342 better described the dataset. Indeed, for each endpoint analyzed, at least one
343 parameter varied under competition, which led to a significant effect of com-

344 petition on half of the 36 parameters tested, each of the nine endpoint being
345 associated to 4 parameters (Table 1). In particular, among the 16 parameters
346 modified by competition, ten corresponded to parameters involved in plant re-
347 sponses to isoproturon, *e.g.* parameter $\log e_{i,j}$ which corresponds to the EC_{50} or
348 parameter $\log b_{i,j}$ which corresponds to the slope of the CRC, whereas six were
349 independent from herbicide exposure, *i.e.* parameter $d_{i,j}$ which corresponds to
350 the response level at the control.

351 The herbicide-independent parameters, and more particularly the responses
352 of shoot-related endpoints to competitors in the absence of herbicide (*compd*
353 or *compd_i* parameters), indicated that competition mainly acted on aerial parts
354 of plants, which also constitutes the isoproturon target. Indeed, the increase
355 of both shoot height and SLA under competition (Figure 3), which represents
356 an investment to be taller and develop larger leaf area than its neighbors, is
357 characteristic of response to shading, allowing increasing light interception [Fan
358 et al., 2019, Yang et al., 2019]. These strong competition effects on aerial parts
359 were also in line with the fact that experiments were conducted under non-
360 limiting water and mineral nutrient conditions at the root level, leading to
361 significant but low effects of competition at root level (Table 1, Figure 2).

362 The responses of plant endpoints to herbicide exposure can depend on the
363 mode of action of the herbicide. Although the existence of multiple targets
364 cannot be ruled out [Ramel et al., 2012], the phenylurea herbicide isoproturon
365 is known to target photosynthesis through PSII, with subsequent generation
366 of triplet chlorophyll, singlet oxygen and ROS cascades [Grouselle et al., 1995,
367 Rutherford and Krieger-Liszkay, 2001]. Moreover, root-level application of her-
368 bicides can lead to effects on shoots by whole-plant distribution through the
369 xylem flow [Sulmon et al., 2007]. This is particularly the case for systemic her-
370 bicides such as isoproturon. Given its effects on PSII, the present isoproturon
371 exposure can be seen as a situation of leaf PSII perturbation and photooxidative
372 stress with a cascade of regulatory and developmental consequences involving
373 metabolic, hormonal and shoot-root signalling mechanisms.

374 On the other hand, the fact that several parameters related to herbicide

375 responses were affected by competition demonstrated that the presence of com-
376 petitors modified the way plants respond to herbicide exposure. From a mech-
377 anistic point of view, as isoproturon is known to target PSII, and given that
378 PSII efficiency, represented by Fv/Fm, was the most sensitive endpoint to this
379 herbicide, the absence of competition effect on most of Fv/Fm CRC parameters,
380 and in particular on the EC₅₀-related parameter $e_{i,j}$, indicated that competition
381 did not limit the herbicide impact on its PSII target. In contrast, the results
382 obtained from both situations of absence and presence of herbicide, strongly
383 suggested that competition mainly acted through shading in the present study.
384 Aerial parts of the plants were directly targeted by both isoproturon treatment
385 and interspecific competition through shading. This explains the results of Ta-
386 ble 1 where isoproturon-related parameters exhibited a competition effect only
387 for the shoot-related endpoints. Despite the absence of strong competition ef-
388 fect on root-related endpoints, in accordance with the absence of isoproturon
389 target in roots, this result would need to be confirmed under conditions of water
390 and nutrient limitation promoting root growth. In the model, the $e_{i,j}$ param-
391 eter corresponds to the EC₅₀ value of the concentration-response curve. The
392 *complog_e* or *complog_e_i* parameters, estimating the modification of CRC EC₅₀
393 values under competition, can be taken as a relevant marker of herbicide-related
394 stress – competition interaction. These parameters were found to be significant
395 for the shoot-related endpoints LDMC, SLA, ligula height, and shoot and to-
396 tal DM (Table 1), competition inducing in each case a decrease of EC₅₀ values
397 (Figure 3, SI G). As functional traits directly involved in competition response
398 [Fan et al., 2019, Yang et al., 2019], the leaf-dedicated LDMC and SLA end-
399 points were particularly affected by competition. This makes them particularly
400 relevant endpoints to conclude that interspecific competition increases the in-
401 hibition effect of isoproturon on plant species or makes them more sensitive to
402 isoproturon. In contrast, shoot and total DM represent more global endpoints
403 of plant performance, resulting from the integration, at the whole plant level,
404 of functional trait responses to competition (shoot height, SLA, root length)
405 and to herbicide exposure (Fv/Fm, SLA, LDMC). Existence of a competition

406 effect on $\log e_{i,j}$ for these endpoints demonstrated the maintenance of herbicide-
407 competition interaction effects at a higher level of organization, and highlighted
408 the relevance using EC₅₀ approach with such global endpoints in a context of
409 competition. The $complogb$ and $complogb_i$ parameters also demonstrated in-
410 teresting effects of interspecific competition on mainly leaf-related endpoints
411 (Table 1). Competition was found to increase CRC steepness of Fv/Fm whereas
412 decreasing it for LDMC (SI G). These results suggest that competition relieves
413 isoproturon effect on photosynthesis, as herbicide-targeted process, and em-
414 phasizes its effect on LDMC, a more global leaf physiology-related endpoint.
415 Competition, by inducing leaf shading, has been shown to change leaf physi-
416 ology, leading to an increase of chloroplast number and grana layer thickness
417 [Fan et al., 2019]. As these changes may increase the number of PSII and conse-
418 quently the number of D1 proteins targeted by isoproturon, the herbicide would
419 be less efficient in inhibiting a higher number of D1 targets. LDMC represents
420 a proxy of leaf density [Ryser, 1996], which is strongly related to its biochemical
421 composition and in particular to its protein content [Wilson et al., 1999]. Yet,
422 this endpoint has been shown to be decreased by shading under competition
423 [Yang et al., 2019]. Changes in leaf components, and especially the decrease in
424 leaf protein content suggested by LDMC decrease under competition, may ex-
425 plain the increase of plant sensitivity to isoproturon since plants need numerous
426 cell compounds as antioxidants, chaperone proteins and antioxidant enzymes to
427 respond to herbicide treatment and particularly to PSII inhibiting herbicides
428 [Ramel et al., 2009, 2007]. The $\Delta dc_{i,j}$ parameter was the least affected by com-
429 petition. Indeed, this parameter, which estimates the inhibitory effect of the
430 highest isoproturon treatment (1.75 μ M, so 360 μ g/L), exhibited a positive com-
431 petition effect only for the shoot-related height endpoints, ligula height and max
432 shoot height (Table 1, Figure 3a), which were more inhibited by isoproturon un-
433 der competition than without. It seemed that competition weakly affected plant
434 responses at herbicide treatment of high intensity, close to field contamination
435 or strong environmental soil contamination, in accordance with previous studies
436 on abiotic stresses demonstrating that competition acts mainly under low stress

437 intensity [Callaway and Walker, 1997, Choler et al., 2001, Jung et al., 2009,
438 Liancourt et al., 2005]. Moreover, the fact that competition had reversed effects
439 on isoproturon response for shoot height, adverse for low concentrations and ad-
440 vantageous for high concentrations (SI G) strongly suggested the involvement
441 of energetic trade-offs under combined herbicide-related and biotic stresses.

442 This study was carried out by using six species of the Poaceae family in or-
443 der to be representative of some plant biodiversity in grass communities and in
444 order to consider the potential diversity of responses to herbicide exposure and
445 to competitors. This experimental design showed that most competition effects
446 identified for parameters related to herbicide responses, *i.e.* effects on $\Delta dc_{i,j}$,
447 $\log e_{i,j}$ and $\log b_{i,j}$, were characterized as fixed and thus species-independent.
448 In contrast, of the four random competition effects obtained in total, three
449 were applied on $d_{i,j}$ parameter, which is herbicide stress-unrelated (Table 1).
450 For most of the endpoints analyzed, the effect of competition under herbicide-
451 related stress could be described as fixed effect, *i.e.* constant for the six species
452 tested. Moreover, this generic effect was not related to the competition effect
453 observed in the absence of herbicide exposure, which could be null, constant,
454 or species-specific (Table 1). This result suggested a role of herbicide treat-
455 ment in homogenizing competition effects. Given the focus of our study on
456 Poaceae, the generic characteristic of the competition effects observed on CRC
457 parameters will need to be confirmed by further studies involving species of
458 different families. Nevertheless, demonstration of such genericity of herbicide-
459 related stress - competition interactions, for at least Poaceae species, may be
460 particularly useful for ERA and plant dynamics modelling of grazed pasture or
461 grassland plant communities, which cover a large fraction of the Earth's land
462 surface [Barbehenn et al., 2004]. In particular, *comploge* parameter, which es-
463 timates the modification of EC_{50} values under competition, was characterized
464 as generic for global performance endpoints such as shoot biomass (Table 1).
465 Further works are however needed to extend this result to a wider diversity of
466 species. Finally, induction of PSII perturbation is also known to occur in a num-
467 ber of abiotic stresses, such as high light, drought, salinity, or heat [Pospíšil and

468 Prasad, 2014], which are known to be significant components of climate change
469 constraints [Bigot et al., 2018]. Existence of interactions between competition
470 and herbicide exposure at the level of PSII functioning (Table 1) represents a rel-
471 evant clue to suggest potential interferences of competition with climate change
472 responses [Bigot et al., 2018, D’Alessandro and Havaux, 2019, Munné-Bosch
473 et al., 2013, Noctor and Mhamdi, 2017]. Such interferences remain however to
474 be characterized and could be tested by using the modelling approach developed
475 in the present study.

476 **5. Conclusion**

477 This study helps to understand better how competition modifies the way
478 that grass plants respond to herbicide exposure and how this response varies
479 from one species to another. Competition effects were observable on every
480 endpoint and these effects could be indentified on the different parameters of the
481 fitted concentration-response curves. This innovative approach has the major
482 advantage of being able to integrate every information given by the dataset
483 and to propagate uncertainty from one hierarchical level to another. This work
484 gives new insights for the integration of realistic supplementary factors, such as
485 competition, into ecotoxicological bioassays and environmental risk assessments.
486 Further studies are now needed to estimate the advantage of developing ERA
487 methods taking into account such modelling approach and its associated results.

488 **Associated content**

489 SI A: Bibliographical informations on chosen endpoint response to both stud-
490 ied stress; SI B: Summary of the nodes defined in the model and their definitions;
491 SI C: Details on the prior distributions and the explanation of these choices; SI
492 D: Precise procedure used to get final used number of iterations, thin number
493 and burn-in number; SI E: Raw data concentration-response plots for chloro-
494 phyll and carotenoid contents, the two non-kept endpoints; SI F: Results ob-
495 tained from the Gelman and Rubin diagnostic of convergence for the different

496 estimated parameters and the different endpoints; SI G: Figures showing the
497 concentration-response curves produced by the applied models.

498 **Acknowledgements**

499 This work has been funded by the “Ecosphère continentale et côtière” (EC2CO)
500 interdisciplinary program from the Centre National de la Recherche Scientifique
501 (CNRS, France). Financial support for mobility has also been provided by the
502 Groupe de Recherche (GDR) 3645 Statistical Ecology (CNRS, France) to Vin-
503 cent BAILLARD. Vincent BAILLARD finally received financial support for
504 salary from French Research ministry and the Région Grand Est.

505 The authors are grateful to Valerie GOUESBET (Ecobio Research Unit,
506 Experimental Ecology platform), to Lucie WRONKA and Malo BOURGET for
507 help with experimentations, and to Sandra RIGAUD (Ecobio Research Unit) for
508 administrative and accounting work. The authors thank Jean-Pierre CAUDAL
509 (Ecobio Research Unit, Experimental Ecology platform) and the Experimen-
510 tal Ecology platform of Ecobio research unit for providing all the infrastruc-
511 ture needed to carry out the experiments. We would finally like to thank the
512 two anonymous reviewers whose suggestions and comments helped improve this
513 manuscript.

514 **References**

- 515 Aschehoug, E. T., Brooker, R., Atwater, D. Z., Maron, J. L., and Callaway,
516 R. M. (2016). The Mechanisms and Consequences of Interspecific Competi-
517 tion Among Plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*,
518 47(1):263–281.
- 519 Baillard, V., Sulmon, C., Bittebiere, A.-K., Mony, C., Couée, I., Gouesbet,
520 G., Delignette-Muller, M. L., Devin, S., and Billoir, E. (2020). Effect of
521 interspecific competition on species sensitivity distribution models: Analysis
522 of plant responses to chemical stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*,
523 200:110722.

- 524 Barbehenn, R. V., Chen, Z., Karowe, D. N., and Spickard, A. (2004). C3
525 grasses have higher nutritional quality than C4 grasses under ambient and
526 elevated atmospheric CO2. *Global Change Biology*, 10(9):1565–1575. _eprint:
527 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-2486.2004.00833.x>.
- 528 Bigot, S., Buges, J., Gilly, L., Jacques, C., Boulch, P. L., Berger, M., Delcros, P.,
529 Domergue, J.-B., Koehl, A., Ley-Ngardigal, B., Canh, L. T. V., and Couée,
530 I. (2018). Pivotal roles of environmental sensing and signaling mechanisms in
531 plant responses to climate change. *Global Change Biology*, 24(12):5573–5589.
532 _eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/gcb.14433>.
- 533 Birch, C. P., Oom, S. P., and Beecham, J. A. (2007). Rectangular and hexagonal
534 grids used for observation, experiment and simulation in ecology. *Ecological*
535 *Modelling*, 206(3-4):347–359.
- 536 Boutin, C., Montroy, K., Mathiassen, S. K., Carpenter, D. J., Strandberg, B.,
537 and Damgaard, C. (2019). Effects of Sublethal Doses of Herbicides on the
538 Competitive Interactions Between 2 Nontarget Plants, *Centaurea cyanus* L.
539 and *Silene noctiflora* L. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(9):2053–
540 2064. Publisher: John Wiley & Sons, Ltd.
- 541 Callaway, R. M. and Walker, L. R. (1997). Competition
542 and Facilitation: A Synthetic Approach to Interactions in
543 Plant Communities. *Ecology*, 78(7):1958–1965. _eprint:
544 <https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1890/0012-9658%281997%29078%5B1958%3ACAFASA%5D2.0.CO%3B2>.
- 546 Chiarini, L., Bevivino, A., Dalmastri, C., Nacamulli, C., and Tabacchioni, S.
547 (1998). Influence of plant development, cultivar and soil type on microbial
548 colonization of maize roots. *Applied Soil Ecology*, 8(1):11–18.
- 549 Choler, P., Michalet, R., and Callaway, R. (2001). Competition and facilitation
550 on gradients in alpine communities. *Ecology*, 82:3295–3308.

- 551 D'Alessandro, S. and Havaux, M. (2019). Sensing β -carotene oxidation in photo-
552 system II to master plant stress tolerance. *New Phytologist*, 223(4):1776–1783.
553 _eprint: <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/nph.15924>.
- 554 Damgaard, C., Strandberg, B., Mathiassen, S. K., and Kudsk, P. (2014).
555 The effect of glyphosate on the growth and competitive effect of perennial
556 grass species in semi-natural grasslands. *Journal of Environmental Science
557 and Health, Part B*, 49(12):897–908. Publisher: Taylor & Francis _eprint:
558 <https://doi.org/10.1080/03601234.2014.951571>.
- 559 Fan, Y., Chen, J., Wang, Z., Tan, T., Li, S., Li, J., Wang, B., Zhang, J., Cheng,
560 Y., Wu, X., Yang, W., and Yang, F. (2019). Soybean (*Glycine max* L. Merr.)
561 seedlings response to shading: leaf structure, photosynthesis and proteomic
562 analysis. *BMC Plant Biology*, 19(1):34.
- 563 Gelman, A. and Rubin, D. B. (1992). Inference from Iterative Simulation Using
564 Multiple Sequences. *Statistical Science*, 7(4):457–472.
- 565 Gilks, W. R., Richardson, S., and Spiegelhalter, D. J. (1996). Introducing
566 markov chain monte carlo. *Markov chain Monte Carlo in practice*, 1:19.
- 567 Grouselle, M., Grollier, T., Feurtetmazel, A., Ribeyre, F., and Boudou, A.
568 (1995). Herbicide Isoproturon-Specific Binding in the Freshwater Macrophyte
569 *Elodea densa*-A Single-Cell Fluorescence Study. *Ecotoxicology and Environ-
570 mental Safety*, 32(3):254–259.
- 571 Jung, V., Mony, C., Hoffmann, L., and Muller, S. (2009). Impact of
572 competition on plant performances along a flooding gradient: a multi-
573 species experiment. *Journal of Vegetation Science*, 20(3):433–441. _eprint:
574 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1654-1103.2009.05786.x>.
- 575 Kon Kam King, G., Larras, F., Charles, S., and Delignette-Muller, M. L.
576 (2015). Hierarchical modelling of species sensitivity distribution: develop-
577 ment and application to the case of diatoms exposed to several herbicides.
578 *arXiv:1501.05230 [stat]*.

- 579 Liancourt, P., Callaway, R. M., and Michalet, R. (2005). Stress
580 Tolerance and Competitive-Response Ability Determine the Out-
581 come of Biotic Interactions. *Ecology*, 86(6):1611–1618. _eprint:
582 <https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1890/04-1398>.
- 583 Munné-Bosch, S., Queval, G., and Foyer, C. H. (2013). The Impact of Global
584 Change Factors on Redox Signaling Underpinning Stress Tolerance. *Plant*
585 *Physiology*, 161(1):5–19. Publisher: American Society of Plant Biologists
586 Section: UPDATES.
- 587 Noctor, G. and Mhamdi, A. (2017). Climate Change, CO₂, and Defense:
588 The Metabolic, Redox, and Signaling Perspectives. *Trends in Plant Science*,
589 22(10):857–870.
- 590 Plummer, M. (2003). JAGS: A program for analysis of Bayesian graphical
591 models using Gibbs sampling.
- 592 Plummer, M. (2018). rjags: Bayesian Graphical Models using MCMC.
- 593 Pospíšil, P. and Prasad, A. (2014). Formation of singlet oxygen and protection
594 against its oxidative damage in Photosystem II under abiotic stress. *Journal*
595 *of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 137:39–48.
- 596 Posthuma, L., Suter II, G. W., and Traas, T. P. (2001). *Species sensitivity*
597 *distributions in ecotoxicology*. CRC press.
- 598 R Core Team (2019). R: A Language and Environment for Statistical Comput-
599 ing.
- 600 Raftery, A. E. and Lewis, S. (1991). How Many Iterations in the Gibbs Sampler?
601 Technical report, WASHINGTON UNIV SEATTLE DEPT OF STATISTICS.
- 602 Ramel, F., Sulmon, C., Bogard, M., Couée, I., and Gouesbet, G. (2009). Dif-
603 ferential patterns of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms
604 during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana*
605 plantlets. *BMC Plant Biology*, 9(1):28.

- 606 Ramel, F., Sulmon, C., Cabello-Hurtado, F., Tacconnat, L., Martin-Magniette,
607 M.-L., Renou, J.-P., El Amrani, A., Couée, I., and Gouesbet, G. (2007).
608 Genome-wide interacting effects of sucrose and herbicide-mediated stress in
609 *Arabidopsis thaliana*: novel insights into atrazine toxicity and sucrose-induced
610 tolerance. *BMC Genomics*, 8(1):450.
- 611 Ramel, F., Sulmon, C., Serra, A.-A., Gouesbet, G., and Couée, I. (2012). Xeno-
612 biotic sensing and signalling in higher plants. *Journal of Experimental Botany*,
613 63(11):3999–4014. Publisher: Oxford Academic.
- 614 Rutherford, A. W. and Krieger-Liszka, A. (2001). Herbicide-induced oxidative
615 stress in photosystem II. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(11):648–653.
- 616 Ryser, P. (1996). The Importance of Tissue Density for Growth and Life Span of
617 Leaves and Roots: A Comparison of Five Ecologically Contrasting Grasses.
618 *Functional Ecology*, 10(6):717–723. Publisher: [British Ecological Society,
619 Wiley].
- 620 Sulmon, C., Gouesbet, G., Binet, F., Martin-Laurent, F., El Amrani, A., and
621 Couée, I. (2007). Sucrose amendment enhances phytoaccumulation of the her-
622 bicide atrazine in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Pollution*, 145(2):507–
623 515.
- 624 Wilson, P. J., Thompson, K., and Hodgson, J. G. (1999). Specific leaf area and
625 leaf dry matter content as alternative predictors of plant strategies. *The New*
626 *Phytologist*, 143(1):155–162. Publisher: Cambridge University Press.
- 627 Yang, M., Liu, M., Lu, J., and Yang, H. (2019). Effects of shading on the growth
628 and leaf photosynthetic characteristics of three forages in an apple orchard on
629 the Loess Plateau of eastern Gansu, China. *PeerJ*, 7:e7594. Publisher: PeerJ
630 Inc.

Chapitre 4

Discussion générale

« Nous sommes comme des nains juchés sur des épaules de géants (les Anciens), de telle sorte que nous puissions voir plus de choses et de plus éloignées que n'en voyaient ces derniers. Et cela, non point parce que notre vue serait puissante ou notre taille avantageuse, mais parce que nous sommes portés et exhausés par la haute stature des géants. »

Bernard de Chartres (XII^{ème} siècle)

Sommaire

4.1 Lien entre les approches classique et hiérarchique de l'étude des effets de la compétition interspécifique	152
4.1.1 Comparaison des résultats des étapes de sélection des données	152
4.1.2 Comparaison des HC ₅	153
4.1.3 Quelle approche privilégier?	154
4.2 Comment améliorer la représentativité de l'ERA et des SSD?	156
4.2.1 Améliorer la représentativité des données écotoxicologiques	156
4.2.1.1 Les plans expérimentaux	157
4.2.1.2 Les données omiques	158
4.2.1.3 L'accès aux données	160
4.2.2 Repenser la modélisation des SSD	161
4.2.3 Faut-il nécessairement modéliser les phénomènes d'hormèse?	163
4.3 Que faire de la variabilité intraspécifique?	164
4.4 Perspectives	166

4.1 Lien entre les approches classique et hiérarchique de l'étude des effets de la compétition interspécifique

Les deux approches présentées précédemment dans ce document afin de prendre en compte les effets de la compétition interspécifique sur les relations concentration-réponse de plantes herbacées (voir Section 3.2.2 et Section 3.3) ont été réalisées de manière indépendante. Elles présentent cependant un nombre conséquent de points communs tels que l'utilisation du même jeu de données et du même modèle sigmoïde afin de représenter la relation concentration-réponse ou encore l'utilisation d'une procédure de sélection des sous jeux de données d'intérêt. Il semble ainsi intéressant de comparer de manière plus poussée ces deux approches et leurs résultats. En effet, il semble important de s'interroger sur la pertinence de réaliser deux approches. Si les résultats sont proches, est-il vraiment nécessaire d'utiliser une méthode complexe à mettre en oeuvre telle que celle de l'approche hiérarchique? Au contraire, si les résultats divergent de manière trop importante, cela signifie-t-il qu'au moins une des deux approches utilisées donne des résultats trop éloignés de la réalité?

Cette comparaison sera effectuée sur deux points, 1) les résultats des étapes de sélection des données, 2) la comparaison des HC_5 obtenues avec l'approche classique avec des HC_5 calculées pour l'approche hiérarchique grâce à des SSD construites à partir des courbes concentrations-réponse produites.

4.1.1 Comparaison des résultats des étapes de sélection des données

Les étapes de sélection des sous jeux de données étaient différentes pour les deux approches, celle de l'approche classique étant basée sur un test de tendance linéaire alors que celle de l'approche hiérarchique était réalisée par l'estimation d'un paramètre dédié, "resp", définissant si le modèle sigmoïde apportait un avantage significatif par rapport à un modèle constant. Cependant, au delà des différences de méthodes, la philosophie sous-jacente était la même : ne modéliser une courbe sigmoïde que si une relation non-constante était visible entre la concentration en isoturon présente dans le substrat et la mesure de l'endpoint d'intérêt. Dans les deux approches, cette procédure a été automatisée du fait du grand nombre de courbes concentration-réponse à modéliser (132 au total).

La comparaison des résultats des étapes de sélection pour les deux approches (Tableau 4.1) mettent en évidence des résultats assez proches pour les deux procédures. Pour les neuf endpoints inclus dans les deux analyses, seuls sept couples espèce*endpoint sur 108 présentent des

résultats différents. Ces résultats vont de plus toujours dans le même sens, à savoir que l'approche hiérarchique a sélectionné ces couples alors que l'approche classique les a écartés. L'approche hiérarchique semble ainsi plus sensible que l'approche classique dans la détection des réponses des différents endpoints à l'isoproturon. Il peut de plus être noté que les trois endpoints écartés de l'approche hiérarchique (*i.e.* Caroténoïdes, Chlorophylles et MS racine/MS PA) ont été peu sélectionnés par l'approche classique (3 couples sur 18 sélectionnés). Ceci aide à valider notre choix de les écarter de l'analyse hiérarchique, même si cela ne le justifie pas totalement : LDMC par exemple n'a été sélectionné que pour une seule espèce dans l'approche classique mais a été sélectionné pour cinq espèces pour l'approche hiérarchique. Des tests préliminaires ont cependant montré que ces endpoints étaient également peu sélectionnés par l'approche hiérarchique et ont grandement alimenté ce choix de les écarter.

Endpoint	<i>A. elatius</i>	<i>D. glomerata</i>	<i>L. multiflorum</i>	<i>P. pratensis</i>	<i>P. trivialis</i>	<i>T. flavescens</i>
Hauteur ligule		D		D	D	
Hauteur maximum PA	H	D		D	D	
Longueur des racines	D	D	H	D	D	
LDMC	H	H	H	H		D
SLA	H	D	D	D		D
Fv/Fm	D	D	D	D	D	D
MS racines	D	D	D	D	D	D
MS PA	D	D	D	D	D	D
MS totale	D	D	D	D	D	D
Caroténoïdes						
Chlorophylles				C		
MS racines/MS PA					C	C

TABLEAU 4.1 – Comparaison des résultats de l'étape de sélection pour l'approche classique et l'approche hiérarchique. "C" signifie que le couple espèce * endpoint a été sélectionné dans l'approche classique, "H" qu'il a été sélectionné dans l'approche hiérarchique, "D" qu'il a été sélectionné dans les deux approches et une case vide qu'il n'a été sélectionné dans aucune des deux approches. Les lignes surlignées en gris correspondent aux endpoints ayant été écartés de l'approche hiérarchique. "PA" signifie "parties aériennes" et MS "masse sèche".

4.1.2 Comparaison des HC₅

Dans le manuscrit portant sur l'approche hiérarchique, il a été décidé de focaliser le propos sur les modèles réalisés et sur les interprétations permises par ce cadre hiérarchique. La répercussion des effets observés sur les SSD et les HC₅ n'a ainsi pas été traitée dans ce manuscrit, à la fois par manque de place et par soucis de cohérence au sein de l'article, mais trouve sa place dans cette section. Plus précisément, les résultats de l'approche hiérarchique contenaient, entre autres, les paramètres des courbes sigmoïdes décrivant la relation concentration-réponse pour chaque es-

pece, endpoint et modalité de compétition. Ces paramètres ont ainsi permis pour chaque courbe concentration-réponse, de calculer les quatre types de CEC utilisés dans l'approche classique. Ces différents CEC ont ensuite été intégrés dans des SSD suivant les quatre scénarios de gestion des CEC multiples pour chaque espèce mis en œuvre dans l'approche classique (*i.e.* Minimum, Moyenne, MS totale ou *Distribution de Sensibilité des Endpoints –ou Endpoint Sensitivity Distribution– (ESD)*). Pour chaque SSD, une valeur d'HC₅ a ainsi pu être estimée, permettant de construire l'équivalent du tableau récapitulatif présent à la fin de la publication sur l'approche classique (Section 3.2.2) pour l'approche hiérarchique. Ce nouveau tableau est le Tableau 4.2. Sa comparaison avec le tableau de l'article en Section 3.2.2 permet de noter que si l'effet modélisé de la compétition sur les HC₅ va bien dans le même sens, à savoir que la compétition entraîne une baisse des valeurs d'HC₅ (à l'exception des SSD modélisés à l'aide d'EC₁₀ et de la méthode Minimum pour lesquels le ratio des deux HC₅ (sans et avec compétition) est inférieur à 1), cet effet a tendance à être plus réduit pour l'approche hiérarchique, tous les ratios entre valeurs d'HC₅ étant en effet compris entre 1 et 2. De plus, 11 de ces ratios sur 16 (soit près de 70%) ont des valeurs moins élevées avec l'approche hiérarchique qu'avec l'approche classique. Il est d'ailleurs intéressant de noter que ce rapport entre les deux HC₅ varie en fonction de la CEC considérée : les ratios des HC₅ avec/sans compétition sont en effet nettement inférieurs pour l'approche hiérarchique dans tous les cas utilisant des EC₁₀ et des BMD_{1sd} alors qu'ils sont supérieurs à ceux de l'approche classique pour tous les cas utilisant des EC₅₀. Les résultats s'appuyant sur des BMD_{2sd} sont pour leur part plus hétérogènes et aucune tendance claire n'y est observable. Les effets mesurés de la compétition ne se traduisent donc pas avec la même force selon la démarche de modélisation adoptée, l'approche hiérarchique conduisant à des effets moins importants. Cette approche hiérarchique ne fait de plus pas apparaître de valeurs très élevées telles que celles apparaissant avec l'approche classique, notamment pour le cas EC₁₀*Minimum qui conduit à une valeur de 11.13 avec l'approche classique, et qui est au contraire la seule valeur inférieure à 1 pour l'approche hiérarchique (0.885). Ceci peut notamment traduire le fait que les CEC aux valeurs "extrêmes" ont eu un poids moins important au sein de l'approche hiérarchique qu'au sein de l'approche classique, cette valeur élevée de ratio se trouvant pour l'approche Minimum, elle-même plutôt sensible aux valeurs de CEC extrêmes.

4.1.3 Quelle approche privilégier?

Les deux approches de modélisation réalisées sur ce jeu de données sont différentes, en premier lieu vis-à-vis de la philosophie sous-jacente à chacune. En effet, l'objectif de l'approche

	EC ₁₀	EC ₅₀	BMD _{1sd}	BMD _{2sd}
Minimum	0.062/0.070 (0.885)	0.382/0.226 (1.692)	0.189/0.114 (1.663)	0.259/0.212 (1.218)
Moyenne	0.233/0.211 (1.103)	0.476/0.422 (1.128)	0.348/0.280 (1.245)	0.521/0.440 (1.184)
MS totale	0.131/0.114 (1.143)	0.390/0.341 (1.144)	0.190/0.166 (1.145)	0.282/0.247 (1.146)
5^{ème} pourcentile d'ESD	0.032/0.019 (1.717)	0.202/0.141 (1.425)	0.067/0.043 (1.556)	0.109/0.090 (1.210)

TABLEAU 4.2 – Tableau récapitulatif des HC₅ calculées à partir des résultats de l'approche hiérarchique. La valeur avant le slash est l'HC₅ avec compétition et celle après le slash la valeur d'HC₅ sans compétition. La valeur entre parenthèses correspond au ratio entre les deux HC₅.

classique était d'évaluer les effets de la compétition interspécifique sur les SSD dans un contexte comparable à celui appliqué dans le cadre des procédures d'ERA. Cette approche de modélisation était ainsi plutôt simple dans sa manipulation des données avec notamment un résumé de chaque courbe concentration-réponse par une valeur dérivée de CEC et l'inclusion de ces valeurs dans une SSD, faisant ainsi perdre une partie considérable de l'information contenue dans les points de données initiaux. Le résultat final était de fait "simple" le déplacement de la valeur finale calculée d'HC₅ sous l'effet de la compétition. Au contraire, l'approche hiérarchique était basée sur une philosophie plus "élaborée" dont l'objectif était d'intégrer aux modèles l'intégralité de l'information disponible et de pouvoir modéliser de manière plus fine et précise les effets de la compétition sur les différents aspects des courbes en concentration-réponse, à la fois en terme de nature d'effet (effet nul, fixe ou aléatoire) et en terme d'importance d'effet.

Ces différences ne signifient cependant pas que les résultats de l'approche hiérarchique sont dans l'absolu de plus grand intérêt que ceux de l'approche classique du fait de leur plus grande complexité. En effet, les résultats de l'approche classique traduisent l'effet direct et intégré de la compétition sur le résultat final de la procédure d'ERA. Ce résultat serait donc bien plus utile à un régulateur que les résultats de l'approche hiérarchique, plus fins certes, mais bien moins informatifs sur les conséquences directes de la prise en compte ou non de ce facteur dans les textes officiels. Une autre différence d'importance est la mise en place de ces deux approches. L'approche classique est en effet assez simple à mettre en œuvre techniquement parlant, des outils dédiés existant notamment sous la forme de packages au sein du logiciel R (drc [RITZ et collab., 2015] pour la modélisation de courbes concentration-réponse et la dérivation d'EC_x, fitdistrplus [DELIGNETTE-MULLER et DUTANG, 2015] pour la modélisation de distributions et donc de SSDs). Ceci n'est pas le cas pour l'approche hiérarchique qui a nécessité un temps bien plus considérable afin d'être mise en place sur un plan technique (rédaction du modèle basique, affinage du dit modèle afin d'en améliorer la convergence, contrôle de nombreux indicateurs afin de valider la qualité des modèles construits...). Ce type d'approche est donc difficilement accessible sans une

période approfondie de formation et de documentation, sans compter le temps nécessaire à la mise en place de l'approche elle-même. Finalement, il existe également une différence importante de temps de calcul entre les deux approches. L'approche classique peut être réalisée en quelques minutes sur un nouveau jeu de données si nécessaire. Au contraire, plusieurs centaines d'heures de calcul sont nécessaires afin d'estimer les paramètres des nombreux modèles testés dans le cadre de l'approche hiérarchique (trois possibilités par paramètres * quatre paramètres * neuf endpoints testés = 729 modèles testés avec un temps de calcul d'une à trois heures environ par modèle). L'approche hiérarchique est donc impossible en l'état à mettre en place en routine comme l'approche classique peut l'être.

L'approche hiérarchique présente cependant des avantages indéniables en dehors du seul cadre réglementaire. En effet, le niveau plus fin de description des effets observés au niveau des différents paramètres des modèles a permis d'affiner également les discussions et interprétations en découlant. En effet, si la conclusion de l'approche classique peut se résumer à "la compétition tend à rendre les herbacées plus sensibles à l'isoproturon", l'approche hiérarchique permet d'aller plus loin dans l'interprétation biologique et de qualifier la manière dont les organismes réagissent à ce second stress qu'est la compétition interspécifique. Un biologiste végétal pourrait ainsi être potentiellement bien plus intéressé par les résultats de cette approche plutôt que par ceux de l'approche classique qui ne peut pas rentrer dans le détail des effets observés.

Aucune des deux approches appliquées n'est ainsi plus utile que l'autre dans l'absolu, mais l'échelle et le niveau de finesse des résultats peut ainsi intéresser différemment des individus issus de domaines différents.

4.2 Comment améliorer la représentativité de l'ERA et des SSD ?

Il a été montré tout au long de ce manuscrit que, si les [SSD](#) peuvent être pratiques du fait de leur relative facilité de mise en œuvre, ils souffrent d'un certain nombre de biais inhérents notamment à la manière dont sont conduits les bioessais en écotoxicologie et à la manière dont les [SSD](#) eux-mêmes sont appliqués. Ce constat n'est cependant pas une implacable fatalité et un certain nombre d'actions sont envisageables afin d'améliorer la pertinence de ces procédures.

4.2.1 Améliorer la représentativité des données écotoxicologiques

Un des moyens permettant d'améliorer la représentativité des méthodes d'[ERA](#) de manière générale et des [SSD](#) en particulier serait d'améliorer la représentativité des données écotoxico-

logiques disponibles afin de mettre en place ces différentes approches. Trois approches pouvant aider à cette hausse de la représentativité des données sont proposées dans les sous sections suivantes, 1) les designs expérimentaux, 2) les données omiques et 3) l'accès aux données.

4.2.1.1 Les plans expérimentaux

Concernant la représentativité des données écotoxicologiques disponibles, une possibilité pourrait être de délaissier progressivement les expérimentations de type bioessais monospécifiques au profit d'expérimentations en mésocosmes, bien plus proches de la réalité environnementale et intégrant notamment des interactions biotiques rarement prises en compte telles que la prédation ou la compétition entre individus. Cette proposition n'est cependant rien de plus qu'un vœu pieux. En effet, ce changement des pratiques semble irréaliste d'un point de vue budgétaire et logistique tant les substances à tester sont nombreuses, chaque mésocosme nécessitant beaucoup plus de temps de conception, de mise en place et d'espace comparé aux bioessais monospécifiques. Ceci ne réglerait de plus pas tous les problèmes, puisque des problématiques telles que la prise en compte des phénomènes de contaminations multiples resteraient insolubles, ce point étant déjà particulièrement difficile à évaluer dans le cadre des bioessais monospécifiques classiques. Un autre point rendant cette approche du tout mésocosme impossible est le fait que traiter des données issues de mésocosmes peut parfois s'avérer compliqué, les sources de variabilité étant bien plus nombreuses que pour des bioessais monospécifiques : comment s'assurer que les potentielles variations observées sont bien liées au facteur étudié? La complexification du milieu d'exposition nécessiterait de plus de fournir en sus des efforts supplémentaires concernant la caractérisation de l'écodynamique des contaminants étudiés.

Une possibilité plus réaliste afin d'améliorer la pertinence des données écotoxicologiques pourrait être d'intégrer dans les plans expérimentaux des bioessais, outre l'exposition à un contaminant, une source de stress supplémentaire simple à mettre en place et pour laquelle il serait certain que l'effet soit néfaste pour les organismes. Les données (et ainsi les CEC et HC₅) obtenues dans un protocole multistress de ce type seraient ainsi légèrement plus représentatives de la réalité environnementale, puisqu'une source de stress présente dans l'environnement serait intégrée au bioessai et plus protectrices que si elles avaient été produites via des bioessais monospécifiques puisque ce stress aurait été choisi de manière à mener à des CEC plus faibles qu'en son absence. Il serait bien entendu toujours nécessaire d'appliquer un AF aux résultats finaux obtenus puisque de nombreux points resteraient non pris en compte dans ces expérimentations. A la vue des résultats présentés dans les chapitres 2 et 3, les valeurs d'AF utilisées pour des SSD pourraient potentiel-

lement conserver leurs bornes actuelles (*i.e.* entre 1 et 5), même avec des CEC plus basses, cette baisse de valeurs de CEC étant comparable à cet intervalle de valeurs d'AF lorsque la compétition interspécifique ou la variabilité intraspécifique ont été prises en compte. Il serait cependant nécessaire de valider les résultats obtenus sur ces points via de nouvelles expérimentations. L'intégration d'une compétition inter ou intraspécifique aux bioessais monospécifiques (qui ne seraient alors plus forcément monospécifiques) pourrait être une possibilité intéressante dans ce cas. Des développements méthodologiques seraient nécessaires, notamment afin de déterminer quelles espèces utiliser dans le cadre d'une compétition interspécifique ou afin de déterminer combien d'individus doivent composer le stress compétitif, intra comme interspécifique.

4.2.1.2 Les données omiques

Concernant les données disponibles afin de mettre en place l'ERA, un autre point d'importance est l'essor des investigations omiques. Ces nouvelles méthodes d'étude du vivant permettent d'accumuler de très grandes quantités de données à des échelles biologiques très réduites (génomique, transcriptomique, protéomique...). Ces méthodes sont de plus en plus abordables et elles sont ainsi de plus en plus employées en écotoxicologie [GONZALEZ et PIERRON, 2015]. Le traitement de ces données pose cependant problème du fait de la taille des jeux de données obtenus : les mesures sont en effet réalisées sur un très grand nombre d'éléments comme par exemple sur des milliers, voire des dizaines ou centaines de milliers de probes pour une mesure transcriptomique. Cette quantité d'information est bien entendu multipliée par le nombre d'échantillons mesurés, ce qui conduit ces approches à être le plus souvent mises en oeuvre dans le cadre de designs à deux conditions (*e.g.* en présence/absence du contaminant ou afin de comparer des situations amont et aval...). Des outils apparaissent cependant peu à peu afin de faciliter le traitement des données omiques. Par exemple, l'outil DRomics [LARRAS et collab., 2018], proposé sous la forme d'un package R et d'une application Shiny (disponible en ligne à l'adresse suivante : <http://lbbe-shiny.univ-lyon1.fr/DRomics-shiny/>), a été construit et proposé afin de permettre le traitement automatisé de données obtenues dans le cadre d'analyses omiques pour des designs expérimentaux en dose-réponse. Cet outil, actuellement utilisable pour des données microarrays, RNAseq, et métaboliques, réalise plusieurs étapes successives sur les données d'entrée afin d'obtenir des résultats exploitables :

- **Etape 1 (optionnelle) :** Importation et vérification des données puis application d'une normalisation/transformation de ces données si nécessaire suivant plusieurs méthodes en fonction du type de données en entrée.

- **Etape 2 :** Sélection des items (probes, métabolites...) présentant une réponse monotone ou biphasique significative *via* trois méthodes de sélection (à partir d'un test ANOVA, à partir d'un test de tendance linéaire ou à partir d'un test de tendance quadratique) et l'application d'un taux de fausse découverte afin de réduire le nombre de faux positifs.
- **Etape 3 :** Modélisation d'une CRC pour chaque item sélectionné selon cinq types de modèles (linéaire, exponentiel, hill, gaussien-probit et log-gaussien-probit), le meilleur modèle étant choisi à partir de valeurs calculées d'AIC.
- **Etape 4 :** Calcul de CEC sur chacune des CRC.

DRomics permet ainsi de résumer la relation concentration-réponse de chaque item par une CEC. Mais pour chaque organisme, la sensibilité d'un très grand nombre d'items est ainsi évaluée, rendant l'utilisation de ces données plus compliquée en ERA. En effet, ce grand nombre peut, en soi, représenter un problème : comment déduire la sensibilité "totale" et réelle des organismes en question? L'outil propose notamment en sortie la distribution des valeurs de CEC (en somme, une "Distribution de Sensibilité des Items") calculées sur le jeu de données. Si une annotation fonctionnelle de ces items a pu être réalisée, cette distribution peut ainsi devenir une "Distribution de Sensibilité des Fonctions" et ainsi traduire l'évolution du nombre de fonctions affectées par le contaminant au fur et à mesure que sa concentration augmente. Il est envisageable d'inclure cette distribution à des SSD, que ce soit à une SSD classique en résumant cette distribution (par exemple en utilisant le cinquième pourcentile de cette distribution comme cela a été fait au sein de l'article en Section 3.2.2) ou à une SSD permettant d'inclure une distribution de valeurs de CEC plutôt qu'une CEC seule pour chaque espèce, tel que cela a été fait par **KON KAM KING et collab. [2015]**.

Qu'en est-il cependant de la représentativité des données omiques au sein de l'ERA? Par exemple, comme cela est présenté par **GONZALEZ et PIERRON [2015]**, lorsque exposés à un contaminant, les organismes subissent trois phases successives concernant leur transcriptome : une première réponse résultant de l'interaction entre le contaminant et sa cible cellulaire, une réponse correspondant à l'activation de gènes permettant de combattre les dommages dus au contaminant puis une réponse adaptative lors de laquelle un faible nombre de gènes est exprimé différemment afin de restaurer les fonctions normales de la cellule et donc l'homéostasie, en présence du contaminant. Les résultats d'une mesure transcriptomique ne sont ainsi (comme pour n'importe quelle autre mesure en écotoxicologie) qu'un instantané de la réaction du transcriptome au contaminant et les effets observés pourraient correspondre à l'une des trois phases de réponse

présentées précédemment, compliquant l'interprétation de ces résultats. Un autre problème est celui de la pertinence environnementale. En effet, des effets observés à l'échelle moléculaire (parfois même sans certitudes d'une traduction en protéines des gènes présentant une différence d'expression) ont-ils vraiment un sens à l'échelle environnementale? Dans tous les cas, il pourrait être argué que, de la même manière que lors de phénomènes d'hormèse, d'une expression différente de gènes sous l'effet d'une pression résulte toujours un coût énergétique, ce qui impacte les organismes étudiés. Ces outils peuvent également être très utiles afin de repérer des contaminations précoces ayant des effets sublétaux sur les organismes comme le permet également l'étude de biomarqueurs tels que les cytochromes P450. Ils sont également plus sensibles que les outils à des échelles biologiques supérieures. Si la recherche sur les méthodes omiques, notamment appliquées à l'environnement, progresse rapidement depuis deux décennies, leur inclusion dans les méthodes d'ERA souffre cependant d'un retard considérable [LEUNG, 2018]. Ceci peut s'expliquer par le manque d'outils permettant d'automatiser ces procédures, tant expérimentalement qu'au niveau du traitement des données obtenues, tels que DRomics. Un autre point venant freiner cette inclusion est la difficulté d'annotation des items pour les organismes non séquencés, ce qui empêche de savoir quelles fonctions des organismes sont affectés par la contamination.

4.2.1.3 L'accès aux données

Enfin, un point important permettrait d'améliorer sensiblement la manière dont les méthodes d'ERA peuvent être techniquement appliquées : l'accès aux données. Les bases de données actuelles ont un important potentiel. Elles permettent de rassembler rapidement un grand nombre de ces données afin de répondre à des questions de recherche spécifiques. Elles présentent cependant un problème de taille : le plus souvent, seules les CEC résumant les résultats obtenus sont rendues disponibles facilement dans les grandes bases de données. Il est parfois possible (et ceci est de plus en plus encouragé par les institutions, les revues et une partie de la communauté scientifique) d'avoir accès aux données brutes ayant permis d'obtenir ces CEC dans les publications scientifiques présentant ces CEC, mais dans les faits ceci reste cependant assez rare, même si certaines initiatives telles que la mise en place de plans de gestion des données ou les incitations de la part des éditeurs et institution à la publication des jeux de données peuvent contribuer à la pérennité de jeux de données bruts et donc à leur potentielle propagation. Ces données brutes ne sont de plus que rarement indexées au sein des bases de données écotoxicologiques, ce qui rend leur collecte, leur évaluation et leur manipulation bien plus longue et laborieuse que celle des CEC directement. Ceci est dommageable car limiter l'accès aux CEC uniquement limite la

quantité de données utilisable au sein d'une même étude, car toutes les CEC calculables sur les résultats d'un bioessai ne sont pas calculées et rendues disponibles dans les bases de données. Par exemple, pour le manuscrit de publication sur l'évaluation des effets de la prise en compte de la variabilité intraspécifique et de la variabilité intergénomique sur les résultats des SSD (voir Section 2.2), seule une partie des données disponibles était exprimée sous la forme d'EC₅₀, de nombreuses autres étant exprimées sous la forme de NOEC, LOEC, MATC (*Maximum acceptable toxicant concentration*, calculé comme étant la moyenne géométrique entre la NOEC et la NOEC) EC₁₀, EC₂₀ et EC₂₅. Au total, sur 234 résultats présents dans la base écotoxicologique des l'USEPA, seuls 39 étaient exprimés sous la forme d'une EC₅₀. Cela ne signifie cependant pas que seul 16% de l'information disponible a été intégré à notre étude, des entrées différentes pouvant être des CEC différentes calculées à partir du jeu de données de la même publication et 27 des entrées dans la base ne précisait pas quel type de CEC était fourni. Il pourra nous être reproché qu'il nous aurait été possible d'inclure au moins une partie de ces données grâce à l'utilisation de facteurs d'extrapolation (tels qu'ils le sont par exemple appliqués par WIGGER et collab. [2020] afin d'estimer des NOEC chroniques à partir d'autres types de CEC), mais ces estimations auraient ajouté une nouvelle source d'incertitude et de variabilité à notre jeu de données, ce qui en aurait compliqué l'exploitation et l'interprétation. Nous avons ainsi préféré privilégier la qualité à la quantité de nos données comme conseillé par DOWSE et collab. [2013].

4.2.2 Repenser la modélisation des SSD

La communauté scientifique bénéficie de plus de quarante années de recul sur l'utilisation des SSD, permettant d'évaluer la qualité de leurs résultats et d'adapter leur méthodologie. Force est cependant de constater que la manière réglementaire d'appliquer les SSD reste à ce jour très proche de celle présentée par KOIJMAN [1987]. Les SSD réglementaires présentent cependant un nombre conséquent d'inconvénients et de sources de non-pertinence environnementales mises en lumière tout au long de ce manuscrit. Un certain nombre de propositions existent déjà afin de corriger ces points. Des nouvelles méthodes de modélisation des SSD ont en effet été proposées à plusieurs reprises dans la littérature scientifique afin de répondre à certaines de ces problématiques. Ceci est par exemple le cas des SSD basées sur le bootstrap, telles qu'évoquées dans le chapitre 1. Deux exemples d'intérêt cités dans ce manuscrit sont les travaux de KON KAM KING et collab. [2015] et WIGGER et collab. [2020]. Le premier propose de modéliser à la fois les relations concentration-réponse de chaque espèce et la loi de distribution de la SSD pour une valeur d'EC_x choisie. Ceci est réalisé d'une manière proche de celle adoptée au sein de notre article présent en

section 3.3 puisque les données écotoxicologiques brutes pour les différentes espèces sont incluses au sein d'un unique modèle hiérarchique, dont les paramètres sont estimés à l'aide de l'inférence bayésienne. Cette approche permet, entre autres, de prendre en compte et d'intégrer les différents niveaux d'incertitude existant dans le processus de modélisation des SSD : 1) l'incertitude associée aux valeurs de CEC, traduit par l'intervalle de confiance y étant associé, 2) l'incertitude associée à la modélisation de la SSD elle-même à partir des CEC et enfin 3) l'incertitude associée à l'estimation de la valeur finale d'HC₅. Le deuxième exemple cité est le PSSD+ (pour SSD probabiliste) présenté par WIGGER et collab. [2020] et lui-même une évolution du PSSD [GOTTSCHALK et NOWACK, 2013]. La PSSD consiste à intégrer au sein d'une même fonction de densité de probabilité l'intégralité des CEC existantes pour une espèce et un contaminant donné. Tous les types de CEC sont ici utilisés, chaque valeur étant convertie en un équivalent de NOEC chronique. Ces données sont ensuite modélisées sous la forme de distributions trapézoïdales pour chaque endpoint qui sont ensuite concaténées afin d'obtenir une distribution de la sensibilité au contaminant pour une espèce donnée. dix mille tirages aléatoires sont ensuite réalisés dans ces distributions et rassemblées afin d'obtenir une distribution de probabilité générique pour une espèce. Cette approche est réalisée pour chacune des espèces, ce qui permet d'obtenir au finale la SSD probabiliste. Il est possible d'ajuster les tirages dans des cas de sur-représentation, par exemple si les données pour un endpoint donné sont plus nombreuses que pour les autres. La PSSD+ [WIGGER et collab., 2020] reprend ce concept en réalisant 10.000 itérations de PSSD grâce à une routine de Monte-Carlo et calcule pour chacune une valeur d'HC₅, permettant ainsi d'en produire une distribution. La PSSD+ intègre également des options permettant d'ajuster le poids de chaque espèce dans le cas où certaines seraient très représentées dans un écosystème donné. Ces approches sont relativement proches de celle que nous avons appliquée dans l'article présent en section 2.2 puisqu'elles intègrent l'intégralité des CEC présentes et utilisent des approches basées sur des simulations afin d'obtenir les distributions de sensibilité des espèces et des HC₅. Elles peuvent également être rapprochées de la méthode de gestion de valeurs de sensibilité multiples de l'article de la section 3.2.2 basée sur l'utilisation du cinquième pourcentile des "endpoint sensitivity distributions" puisque l'objectif y est également de modéliser toute l'information disponible pour une espèce donnée sous la forme d'une unique distribution.

Les différentes approches de production de SSD appliquées au sein de ce manuscrit, ainsi que celles présentées dans le paragraphe ci-dessus [GOTTSCHALK et NOWACK, 2013; KON KAM KING et collab., 2015; WIGGER et collab., 2020] et d'autres comme les méthodes basées sur les approches par bootstrap permettent d'intégrer de manière bien plus fidèle la variabilité intraspécifique des

valeurs de sensibilité de chaque espèce. Différents points sont cependant d'importance pour permettre l'expansion de ces méthodes et l'amélioration de la représentativité environnementale des SSD de manière générale. Premièrement, tel que discuté précédemment, il est important d'avoir à disposition un nombre important de données, que ce soient des CEC directement comme pour les PSSD, les PSSD+ ou encore les approches présentées dans les articles des sections 2.2 et 3.2.2 ou les données brutes pour les SSD hiérarchiques ou l'approche présentée dans l'article de la section 3.3. Un autre point déjà évoqué est celui de la possibilité technique de mettre en place ces méthodes. En effet, les cas présentés dans ces différents articles ne peuvent pas être appliqués en routine en l'état, aucun outil n'ayant, à la connaissance des auteurs, encore été développé afin de permettre une application facile de ces méthodes. Ces outils présentent cependant des avantages indéniables et leur développement pourrait améliorer de manière significative la manière dont les SSD sont appliquées en ERA.

4.2.3 Faut-il nécessairement modéliser les phénomènes d'hormèse?

Les points exposés dans la section 3.2.3.2 et notamment les points relatifs à la prise en compte de l'hormèse permettent de s'interroger sur une question d'importance en écotoxicologie : "Qu'est-ce qu'un effet toxique?". En effet, un effet d'hormèse, qui est donc un mécanisme de compensation des effets de la contamination, mis en place par l'organisme avant que des effets toxiques soient observables, est-il vraiment un effet toxique puisqu'il va dans un sens "positif" pour l'organisme vis-à-vis de l'endpoint mesuré? Il est de plus nécessaire de prendre en compte que les lois de conservation de la masse et de l'énergie doivent être prises en compte, impliquant que des mesures de compensation d'effets s'accompagnent d'une dépense énergétique et que cette énergie ne peut donc pas être allouée à une autre fonction. JAGER et collab. [2013] définit trois phénomènes permettant d'expliquer la possibilité de l'existence de l'hormèse. L'augmentation de l'acquisition énergétique est la première de ces options. Elle implique que l'organisme augmente ses apports nutritifs ou soit plus efficace dans son assimilation des nutriments. Cependant, si cela se faisait sans contreparties, il y a fort à parier que des mutants présentant de manière permanente ces caractéristiques se reproduiraient plus tôt et de manière plus importante, ce qui leur donnerait un avantage de *fitness* sur les autres individus. Si ce caractère n'a pas été sélectionné de manière généralisée, c'est qu'il doit exister des contreparties telles que des taux de mortalité plus élevés ou des tailles d'organismes moins importantes, impliquant des risques de prédation plus importants. Cette option peut également avoir des effets à l'échelle de la communauté, puisqu'une augmentation des besoins en apports nutritifs entraîne une pression de compétition plus importante sur les

autres organismes. La seconde option proposée par JAGER et collab. [2013] est la réallocation énergétique. Cette réallocation entraîne une hausse de performance sur un trait, mais également une baisse de performance sur d'autres traits qui se verront allouer moins d'énergie. Cette baisse peut cependant ne pas être observée si l'expérimentation ne comprend pas de mesures des traits négativement impactés ou si elle est trop courte pour que ces effets délétères ne soient observables. La réallocation énergétique due à l'hormèse peut également s'effectuer au détriment des réserves de l'organisme. Lorsque les réserves se trouvent à un niveau trop bas, la hausse de performance des traits prend fin. Cela signifie que l'organisme devient également plus vulnérable lors d'épisodes de réduction des ressources disponibles, n'ayant plus de réserves afin d'y faire face. La réallocation énergétique peut également se traduire par un investissement réduit dans chaque descendant, chacun d'entre eux ayant ainsi une *fitness* réduite. Enfin, la troisième option proposée par JAGER et collab. [2013] est la potentielle médication de l'organisme par le composé. Ce peut être le cas par exemple lorsque le composé est un élément essentiel (comme le zinc ou le cuivre) qui aura ainsi un effet bénéfique sur l'organisme à faibles doses. Si cela est peu probable dans le cas de l'isopruturon utilisé dans notre protocole expérimental, une autre possibilité existe : le composé permet de combattre une infection qui n'avait pas été diagnostiquée lors de l'expérimentation. Une fois encore, le phénomène d'hormèse se ferait ainsi au détriment d'un autre organisme, le pathogène, ce qui aurait ainsi un impact à l'échelle de la communauté. Aucune étude permettant de mettre ce mécanisme en lumière n'a cependant été portée à la connaissance de JAGER et collab. [2013]. Les phénomènes d'hormèse peuvent donc être d'origines diverses et traduire de véritables effets infligés à l'organisme et qui peuvent ainsi être délétères pour lui ou le reste de la communauté. Plusieurs des phénomènes présentés ci-dessus peuvent cependant n'être que des artefacts expérimentaux, tels que la présence non contrôlée de pathogènes dans le dispositif expérimental. Il est dans tous les cas impossible de lier les potentiels phénomènes d'hormèse observés dans notre jeu de données à l'une des causes listées ci-dessus et si ces questions sont d'un intérêt écologique et écotoxicologique évident, la prise en compte de ces comportements d'hormèse dans la modélisation aurait amené beaucoup trop de complexité comparé aux bénéfices théoriques apportés.

4.3 Que faire de la variabilité intraspécifique ?

La variabilité est traitée de manière différente en écologie et en écotoxicologie. Dans cette dernière, cette variabilité est en effet souvent vue comme une contrainte dont il est nécessaire de s'affranchir afin d'obtenir une évaluation claire et précise de la sensibilité des organismes à un conta-

minant. Cela se traduit notamment par une fréquence importante d'utilisation de tests standardisés en écotoxicologie, cette standardisation permettant de fixer un grand nombre de paramètres expérimentaux et ainsi obtenir des estimations moins variables. De plus, les articles traitant de la variabilité intraspécifique le font à travers le prisme de l'effet d'une ou plusieurs sources de variabilité intraspécifique sur les résultats écotoxicologiques finaux (voir par exemple [RAIMONDO et collab. \[2016\]](#) mais également les publications présentées dans les sections 2.2 et 3.2.2 qui ne dérogent pas à la règle). En écologie des communautés, au contraire, la variabilité intraspécifique est vue comme un phénomène biologique comme un autre et reconnue depuis des décennies comme un promoteur de diversité et même une condition nécessaire à la coexistence locale des organismes [[VIOLLE et collab., 2012](#)]. [ALBERT et collab. \[2011\]](#) propose par exemple, entre autres choses, un guide permettant de définir s'il est pertinent de prendre en compte la variabilité intraspécifique dans le cadre d'études en écologie basée sur les traits, le constat étant que cette prise en compte ne se révèle non pertinente que lors d'études locales incluant toutes les espèces d'une communauté ou au contraire dans le cadre d'études globales incluant des espèces très hétérogènes et où la variabilité intraspécifique a de grandes chances de se révéler négligeable comparée à la variabilité interspécifique. De nombreux outils de statistique et de modélisation ont également été mis au point afin d'intégrer cette variabilité aux études et d'en comprendre les effets là où l'écotoxicologie cherche le plus souvent à savoir à quel point sa présence peut affecter la fiabilité des [CEC](#) calculées. [VIOLLE et collab. \[2012\]](#) propose par exemple une statistique T (pour *trait*) basée sur la comparaison des variances intra et interspécifiques des traits fonctionnels pour les différents niveaux d'organisation de la communauté afin d'incorporer cette variabilité à la théorie de l'écologie des communautés. Ce type d'approche peut ainsi permettre d'apporter de nouvelles perspectives par rapport aux forces structurant les communautés. La dernière phrase de cette publication est très intéressante : "Ultimately, this will facilitate the shift from species-based to individual-based community ecology and lead to a more predictive ecological theory.". Ce vœu de passer d'une écologie basée sur les espèces à une écologie basée sur les individus serait également un changement de paradigme appréciable en écotoxicologie et en [ERA](#), les mesures de protection mises en place n'ayant pas pour vocation de protéger les espèces, mais bien les individus qui les composent. Cela résoudrait au passage d'autres problèmes que connaît la biologie de manière générale et notamment ceux liés à la définition du concept d'espèce, la définition classique de ce concept vieillissant (à savoir un groupe d'êtres vivants potentiellement ou effectivement interféconds et dont la descendance est elle-même féconde) étant en constante évolution afin de pouvoir s'adapter (parfois à grand-peine) à des organismes ne se reproduisant pas de manière

sexuée.

4.4 Perspectives

De nombreuses perspectives pourraient être envisagées suite à ces travaux. Parmi les possibilités les plus simples, répliquer ces expérimentations sur d'autres jeux de données afin de confirmer les résultats obtenus, à savoir est-ce que la prise en compte de la variabilité intraspécifique et plus précisément de la variabilité intergénomique et de la compétition interspécifique donnent bien des estimations de [SSD](#) et [HC₅](#) plus protectrices. Une autre possibilité pourrait également être de tester d'autres composantes de la variabilité intraspécifique afin d'évaluer si leur effet irait également dans cette direction. Ces deux propositions sont cependant extrêmement classiques et, si la validation des résultats acquis est d'une importance capitale, ces deux approches n'apporteraient au final qu'assez peu d'information nouvelle.

Un point intrigant des travaux présentés dans ce manuscrit et qui mériterait une investigation plus poussée se trouve pour moi au sein du chapitre 2. En effet, dans la Table 3 de la publication à soumettre qui y est présent, il est possible de noter que les écart-types moyens des EC_{50} log-transformées pour chaque espèce sont très proches lorsque le calcul est réalisé sur le jeu de données expérimentales seulement (c'est à dire en ne prenant en compte que la variabilité intergénomique; 0.961) et lorsqu'il est réalisé sur l'intégralité du jeu de données utilisé (c'est à dire en intégrant les données issues de la base de données écotoxicologiques de l'[USEPA](#) et donc en prenant en compte d'autres sources de variabilité intraspécifique telles que la variabilité interlaboratoire par exemple; 1.21). Ceci signifie que la variabilité intergénomique explique à elle seule une très grande partie (environ 80%) de la variabilité totale des données rencontrée dans ce jeu de données et impliquerait ainsi soit que la variabilité intergénomique est largement majoritaire par rapport aux autres, soit que les autres sources de variabilité intraspécifique n'iraient pas toutes dans le même sens et ainsi qu'il pourrait y avoir compensation entre elles. Ce point est traité de manière très rapide dans l'article et mériterait un approfondissement : l'effet individuel des différentes sources de variabilité étudiées dans ce manuscrit est-il vraiment important comparé à la variabilité totale existant dans l'environnement? [RAIMONDO et collab. \[2016\]](#) ont par exemple estimé que la variabilité intralaboratoire pouvait atteindre un effet d'un facteur 2 sur les EC_{50} calculées sur des moules juvéniles alors que la variabilité interlaboratoire pouvait atteindre un facteur de variabilité de 6.3 pour des EC_{50} calculées sur des moules en stade larvaire, ces valeurs élevées pouvant aider à questionner les résultats que nous avons obtenus. Ce point rejoint ceux du para-

graphe précédent puisqu'il impliquerait de réaliser le même type d'expériences supplémentaires de manière à tester leurs effets comparés à la variabilité intraspécifique totale, mais également à tester ces facteurs de manière croisée afin d'étudier leurs interactions. Ces plans expérimentaux seraient cependant difficiles à mettre en oeuvre, du fait de l'augmentation importante du nombre d'unités expérimentales nécessaires pour la mise en place d'expériences testant l'effet de facteurs croisés.

Conclusion générale

« Remember that all models are wrong; the practical question is how wrong do they have to be to not be useful. »

George Box et Norman Draper -
Empirical Model-Building and
Response Surfaces (1987)

L'évaluation du risque environnemental (ERA) sert de rempart afin de protéger les écosystèmes des effets des diverses activités anthropiques. Des failles existent-elles cependant dans cette fortification? Nous nous sommes proposés dans ces travaux d'évaluer la représentativité d'un outil précis largement utilisé en ERA, les distributions de sensibilité des espèces (SSD). Leur apparente simplicité, tant au niveau conceptuel qu'au niveau de leur mise en place, cache en effet de nombreuses sources potentielles de non représentativité environnementale, concernant par exemple la non prise en compte de sources de variabilité intraspécifique. En plus de ceux de la variabilité intraspécifique de manière globale, les effets de plusieurs de ces sources de variabilité intraspécifique sur les SSD et les HC₅ dérivées ont été étudiés et présentés au sein de ce manuscrit, à savoir la variabilité intergénotypique et la compétition interspécifique. Les effets de la compétition interspécifique ont également été testés sur la forme des courbes concentration-réponse (CRC), permettant ainsi d'évaluer l'importance de la prise en compte de cette source de variabilité intraspécifique sur la réponse des individus à une contamination sur des éléments préliminaires à la construction de courbes SSD. En parallèle, la variabilité inhérente aux méthodes de modélisation employées a également été évaluée, cette source de variabilité pouvant être présente à tous les niveaux des méthodes d'ERA. Les résultats obtenus ont permis de montrer que la prise en compte de ces sources de variabilité, qu'elles fussent globales ou ciblées, dans les CRC et les SSD avait tendance à produire une évaluation du risque plus alarmiste, avec par exemple des HC₅ calculées plus faibles lorsque les données utilisées avaient été produites en présence de ces sources de variabilité étudiées. Les résultats obtenus tendraient ainsi à montrer que la non prise en compte de ces sources de variabilité pourrait entraîner une sous-estimation du risque mesuré pour les contaminants testés, la baisse des valeurs d'HC₅ mesurées s'étant en effet parfois révélée supérieure à ce que les facteurs de sécurité (AF) sont habituellement capables de compenser. Ce manuscrit tend ainsi à proposer que des brèches existent dans les méthodes d'ERA évaluées et qu'il pourrait être vital pour la santé des écosystèmes de poursuivre l'examen des méthodes d'ERA afin de pouvoir trouver des solutions à ces biais, comme par exemple en révisant les valeurs d'AF usuellement appliquées.

Références

- AAGAARD, A., T. C. M. BROCK, E. CAPRI, S. DUQUESNE, M. FILIPIC, P. I. ADRIAANSE et J. BOESTEN. 2013, «Guidance on tiered risk assessment for plant protection products for aquatic organisms in edge-of-field surface waters», *EFSA Journal*, doi :10.2903/j.efsa.2013.3290, p. 268. URL <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/j.efsa.2013.3290>. 23, 24
- AHLERS, J., C. RIEDHAMMER, M. VOGLIANO, R.-U. EBERT, R. KÜHNE et G. SCHÜÜRMAN. 2006, «Acute to chronic ratios in aquatic toxicity—variation across trophic levels and relationship with chemical structure», *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 25, n° 11, doi :10.1897/05-701R.1, p. 2937–2945. URL <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1897/05-701R.1>. 30
- ALBERT, C. H., F. GRASSEIN, F. M. SCHURR, G. VIEILLEDENT et C. VIOLLE. 2011, «When and how should intraspecific variability be considered in trait-based plant ecology?», *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, vol. 13, n° 3, doi :10.1016/j.ppees.2011.04.003, p. 217–225. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S143383191100028X>. 165
- ALDENBERG, T. et W. SLOB. 1993, «Confidence Limits for Hazardous Concentrations Based on Logistically Distributed NOEC Toxicity Data», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 25, n° 1, doi :10.1006/eesa.1993.1006, p. 48–63. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651383710067>. 26, 35
- AMIARD, J.-C. et C. AMIARD-TRIQUET. 2015, «Conventional Risk Assessment of Environmental Contaminants», dans *Aquatic Ecotoxicology*, Elsevier, ISBN 978-0-12-800949-9, p. 25–49, doi : 10.1016/B978-0-12-800949-9.00002-4. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128009499000024>. 6, 10, 11, 13, 14, 21, 25, 28
- AURISANO, N., P. F. ALBIZZATI, M. HAUSCHILD et P. FANTKE. 2019, «Extrapolation factors for characterizing freshwater ecotoxicity effects», *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 38, n° 11, doi :10.1002/etc.4564, p. 2568–2582. URL <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/etc.4564>. 30
- AUSTRALIAN AND NEW ZEALAND ENVIRONMENT AND CONSERVATION COUNCIL et AGRICULTURE AND RESOURCE MANAGEMENT COUNCIL OF AUSTRALIA AND NEW ZEALAND. 2000, *Australian and New Zealand guidelines for fresh and marine water quality 2000*, Australian and New Zealand Environment and Conservation Council and Agriculture and Resource Management Council of Australia and New Zealand, Canberra, ISBN 978-0-9578245-0-8 978-0-9578245-2-2. URL <https://www.mfe.govt.nz/publications/fresh-water/australian-and-new-zealand-guidelines-fresh-and-marine-water-quality>. 33
- BAILLARD, V., C. SULMON, A.-K. BITTEBIERE, C. MONY, I. COUÉE, G. GOUESBET, M. L. DELIGNETTE-MULLER, S. DEVIN et E. BILLOIR. 2020, «Effect of interspecific competition on species sensitivity distribution models: Analysis of plant responses to chemical stress», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 200, doi :10.1016/j.ecoenv.2020.110722, p. 110 722. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651320305613>. 4, 76, 77

- BELANGER, S., M. BARRON, P. CRAIG, S. DYER, M. GALAY-BURGOS, M. HAMER, S. MARSHALL, L. POSTHUMA, S. RAIMONDO et P. WHITEHOUSE. 2016, «Future needs and recommendations in the development of species sensitivity distributions : Estimating toxicity thresholds for aquatic ecological communities and assessing impacts of chemical exposures : Advancing Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology», *Integrated Environmental Assessment and Management*, vol. 13, n° 4, doi :10.1002/ieam.1841, p. 664–674. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/ieam.1841>. 31
- BILLOIR, E. 2008, *Modélisation dynamique et inférence bayésienne pour l'analyse de données en écotoxicologie*, Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1. 118, 121
- BOUDIA, S. et N. JAS. 2019, *Gouverner un monde toxique*, 1^{re} éd., Sciences en questions, Editions Quae, ISBN 9782759229468. URL <https://www.quae.com/produit/1557/9782759229482/gouverner-un-monde-toxique>. 6, 7, 8, 9
- DE BRUIJN, J., D. JAGER, D. KALF, B. MENSINK, M. MONTFORTS, D. SIJM, C. SMIT, P. VAN VLAARDINGEN, E. VERBRUGGEN et A. VAN WEZEL. 2001, «Guidance Document on deriving Environmental Risk Limits», cahier de recherche, Rijksinstituut Voor Volksgezondheid en Milieu. URL <https://rivm.openrepository.com/bitstream/handle/10029/9552/601501012.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. 33
- BUREAU D'ANALYSE DES RISQUES ET POLLUTIONS INDUSTRIELS. 2006, «Explosion de la poudrerie de Grenelle», URL https://www.aria.developpement-durable.gouv.fr/fiche_detaillee/5692/. 7
- CALABRESE, E. J. 2008, «Hormesis : Why it is important to toxicology and toxicologists», *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 27, n° 7, doi :10.1897/07-541.1, p. 1451–1474. URL <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1897/07-541.1>. 17
- CARSON, R. 1962, *Silent Spring*, Houghton Mifflin Company & Riverside Press, ISBN 978-0-618-24906-0. 7
- CASELLA, G. et E. I. GEORGE. 1992, «Explaining the Gibbs sampler», *The American Statistician*, vol. 46, n° 3, doi :10.1080/00031305.1992.10475878, p. 167–174. URL <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00031305.1992.10475878>, publisher : Taylor & Francis. 120
- CHIB, S. et E. GREENBERG. 1995, «Understanding the metropolis-hastings algorithm», *The american statistician*, vol. 49, n° 4, doi :10.1080/00031305.1995.10476177, p. 327–335. URL <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00031305.1995.10476177>, publisher : Taylor & Francis Group. 120
- CRANE, M. et M. C. NEWMAN. 2000, «What level of effect is a no observed effect?», *Environmental Toxicology and Chemistry : An International Journal*, vol. 19, n° 2, doi :10.1002/etc.5620190234, p. 516–519. URL <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/etc.5620190234>. 20
- DEL SIGNORE, A., A. J. HENDRIKS, H. R. LENDERS, R. S. LEUVEN et A. BREURE. 2016, «Development and application of the SSD approach in scientific case studies for ecological risk assessment: Development and application of the SSD», *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 35, n° 9, doi :10.1002/etc.3474, p. 2149–2161. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/etc.3474>. 37, 39
- DELIGNETTE-MULLER, M. L. et C. DUTANG. 2015, «fitdistrplus : An R Package for Fitting Distributions», *Journal of Statistical Software*, vol. 64, n° 4, doi :10.18637/jss.v064.i04, p. 1–34. URL <http://www.jstatsoft.org/v64/i04/>. 32, 155

- DELORENZO, M. E. 2015, «Impacts of climate change on the ecotoxicology of chemical contaminants in estuarine organisms», *Current Zoology*, vol. 61, n° 4, doi :10.1093/czoolo/61.4.641, p. 641–652. URL <https://academic.oup.com/cz/article/61/4/641/1803146>. 41
- DISCOVER MAGAZINE. 2006, *25 Greatest Science Books of All Time*, Kalmbach Publishing. URL <https://www.discovermagazine.com/the-sciences/25-greatest-science-books-of-all-time>. 8
- DOWSE, R., D. TANG, C. G. PALMER et B. J. KEFFORD. 2013, «Risk assessment using the species sensitivity distribution method : Data quality versus data quantity», *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 32, n° 6, doi :10.1002/etc.2190, p. 1360–1369. URL <http://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/etc.2190>. 32, 33, 161
- DUBOUDIN, C., P. CIFFROY et H. MAGAUD. 2004, «Acute-to-chronic species sensitivity distribution extrapolation», *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 23, n° 7, doi :10.1002/etc.5620230723, p. 1774–1785. URL <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/etc.5620230723>. 26
- ECHA. 2020, «Substances enregistrées», URL <https://echa.europa.eu/fr/information-on-chemicals/registered-substances>. 2
- EFSA SCIENTIFIC COMMITTEE, A. HARDY, D. BENFORD, T. HALLDORSSON, M. J. JEGER, K. H. KNUITSEN, S. MORE, A. MORTENSEN, H. NAEGELI, H. NOTEBORN, C. OCKLEFORD, A. RICCI, G. RYCHEN, V. SILANO, R. SOLECKI, D. TURCK, M. AERTS, L. BODIN, A. DAVIS, L. EDLER, U. GUNDELT-REMY, S. SAND, W. SLOB, B. BOTTEX, J. C. ABRAHANTES, D. C. MARQUES, G. KASS et J. R. SCHLATTER. 2017, «Update: use of the benchmark dose approach in risk assessment», *EFSA Journal*, vol. 15, n° 1, doi :10.2903/j.efsa.2017.4658. URL <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2017.4658>. 20, 21
- ERICKSON, R. J. et C. E. STEPHAN. 1988, «Calculation of the Final Acute Value for Water Quality Criteria for Aquatic Organisms», *National Technical Information Service, Springfield, VA, USA*, p. 61. URL https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_Report.cfm?Lab=ORD&dirEntryID=44503. 35
- ESTEVEZ, S. M., F. KECK, S. F. ALMEIDA, E. FIGUEIRA, A. BOUCHEZ et F. RIMET. 2017, «Can we predict diatoms herbicide sensitivities with phylogeny? influence of intraspecific and interspecific variability», *Ecotoxicology*, vol. 26, n° 8, doi :10.1007/s10646-017-1834-z, p. 1065–1077. URL <https://link.springer.com/article/10.1007/s10646-017-1834-z>. 72
- EUROPEAN CHEMICAL BUREAU. 2003, «Technical Guidance Document on Risk Assessment Part II», *Institute for Health and Consumer Protection, Italy, Ispra*. URL <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/technical-guidance-document-risk-assessment-part-1-part-2>. 33, 34
- FORBES, V. E. et P. CALOW. 2002, «Species Sensitivity Distributions Revisited: A Critical Appraisal», *Human and Ecological Risk Assessment : An International Journal*, vol. 8, n° 3, doi :10.1080/10807030290879781, p. 473–492. URL <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10807030290879781>. 27, 32, 33
- FOX, D., R. VAN DAM, R. FISHER, G. BATLEY, A. TILLMANN, J. THORLEY, C. SCHWARZ, D. SPRY et K. MCTAVISH. 2020, «Recent developments in ssd modeling», *Environmental Toxicology and Chemistry*, doi :10.1002/etc.4925. URL <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/etc.4925>. 36
- GELFAND, A. E. et A. F. SMITH. 1990, «Sampling-based approaches to calculating marginal densities», *Journal of the American statistical association*, vol. 85, n° 410, doi :10.1080/01621459.199

- 0.10476213, p. 398–409. URL <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01621459.1990.10476213>, publisher : Taylor & Francis Group. 120
- GEMAN, S. et D. GEMAN. 1984, «Stochastic relaxation, Gibbs distributions, and the Bayesian restoration of images», *IEEE Transactions on pattern analysis and machine intelligence*, doi : 10.1109/TPAMI.1984.4767596, p. 721–741. URL <https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/4767596>, publisher : IEEE. 120
- GONZALEZ, P. et F. PIERRON. 2015, «Chapter 8 - Omics in Aquatic Ecotoxicology : The Ultimate Response to Biological Questions?», dans *Aquatic Ecotoxicology*, édité par C. Amiard-Triquet, J.-C. Amiard et C. Mouneyrac, Academic Press, ISBN 978-0-12-800949-9, p. 183–203, doi :10.1016/B978-0-12-800949-9.00008-5. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128009499000085>. 158, 159
- GOTTSCHALK, F. et B. NOWACK. 2013, «A probabilistic method for species sensitivity distributions taking into account the inherent uncertainty and variability of effects to estimate environmental risk», *Integrated Environmental Assessment and Management*, vol. 9, n° 1, doi :10.1002/ieam.1334, p. 79–86. URL <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ieam.1334>. 162
- GUST, K. A., A. J. KENNEDY, N. L. MELBY, M. S. WILBANKS, J. LAIRD, B. MEEKS, E. B. MULLER, R. M. NISBET et E. J. PERKINS. 2016, «Daphnia magna’s sense of competition: intra-specific interactions (ISI) alter life history strategies and increase metals toxicity», *Ecotoxicology*, vol. 25, n° 6, doi :10.1007/s10646-016-1667-1, p. 1126–1135. URL <http://link.springer.com/10.1007/s10646-016-1667-1>. 41
- HASTINGS, W. K. 1970, «Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their applications», *Biometrika*, vol. 57, n° 1, doi :10.2307/2334940. URL <https://www.jstor.org/stable/2334940?seq=1>. 120
- VAN DER HOEVEN, N. 2001, «Estimating the 5-Percentile of the Species Sensitivity Distributions Without Any Assumptions about the Distribution», *Ecotoxicology*, vol. 10, n° 1, doi :10.1023/A:1008998405241, p. 25–34. URL <https://doi.org/10.1023/A:1008998405241>. 36
- IWASAKI, Y., K. KOTANI, S. KASHIWADA et S. MASUNAGA. 2015, «Does the Choice of NOEC or EC10 Affect the Hazardous Concentration for 5% of the Species?», *Environmental Science & Technology*, vol. 49, n° 15, doi :10.1021/acs.est.5b02069, p. 9326–9330. URL <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.est.5b02069>. 30
- JAGER, T. 2012, «Bad habits die hard: The NOEC’s persistence reflects poorly on ecotoxicology», *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 31, n° 2, doi :10.1002/etc.746, p. 228–229. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/etc.746>. 16
- JAGER, T., A. BARSÌ et V. DUCROT. 2013, «Hormesis on life-history traits : is there such thing as a free lunch?», *Ecotoxicology*, vol. 22, n° 2, doi :10.1007/s10646-012-1022-0, p. 263–270. URL <https://doi.org/10.1007/s10646-012-1022-0>. 163, 164
- KENDIG, E. L., H. H. LE et S. M. BELCHER. 2010, «Defining Hormesis : Evaluation of a Complex Concentration Response Phenomenon», *International Journal of Toxicology*, vol. 29, n° 3, doi : 10.1177/1091581810363012, p. 235–246. URL <https://doi.org/10.1177/1091581810363012>. 112
- KLAINE, S. J., G. P. COBB, R. L. DICKERSON, K. R. DIXON, R. J. KENDALL, E. E. SMITH et K. R. SOLOMON. 1996, «An ecological risk assessment for the use of the biocide, dibromonitropropionamide (DBNPA), in industrial cooling systems», *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 15, n° 1, doi :10.1002/etc.5620150104, p. 21–30. URL <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/etc.5620150104>. 33

- KON KAM KING, G. 2015, *La SSD revisitée : modéliser la variabilité des espèces pour protéger les communautés*, Thèse de doctorat, Université Claude Bernard-Lyon I. URL <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01281470/>. 33
- KON KAM KING, G., F. LARRAS, S. CHARLES et M. L. DELIGNETTE-MULLER. 2015, «Hierarchical modelling of species sensitivity distribution : development and application to the case of diatoms exposed to several herbicides», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, doi :10.1016/j.ecoenv.2015.01.022. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651315000329>. 159, 161, 162
- KOOIJMAN, S. 1987, «A safety factor for LC50 values allowing for differences in sensitivity among species», *Water Research*, vol. 21, n° 3, doi :10.1016/0043-1354(87)90205-3, p. 269–276. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0043135487902053>. 26, 161
- LARRAS, F., E. BILLOIR, V. BAILLARD, A. SIBERCHICOT, S. SCHOLZ, T. WUBET, M. TARKKA, M. SCHMITT-JANSEN et M.-L. DELIGNETTE-MULLER. 2018, «DRomics: A Turnkey Tool to Support the Use of the Dose–Response Framework for Omics Data in Ecological Risk Assessment», *Environmental Science & Technology*, vol. 52, n° 24, doi :10.1021/acs.est.8b04752, p. 14 461–14 468. URL <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.est.8b04752>. 17, 19, 111, 158
- LARRAS, F., B. MONTUELLE, F. RIMET, N. CHÈVRE et A. BOUCHEZ. 2014, «Seasonal shift in the sensitivity of a natural benthic microalgal community to a herbicide mixture : impact on the protective level of thresholds derived from species sensitivity distributions», *Ecotoxicology*, vol. 23, n° 6, doi :10.1007/s10646-014-1254-2, p. 1109–1123. URL <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1254-2>. 41
- LEBOULANGER, C., F. RIMET, M. H. DE LACOTTE et A. BÉRARD. 2001, «Effects of atrazine and nicosulfuron on freshwater microalgae», *Environment international*, vol. 26, n° 3, doi :10.1016/S0160-4120(00)00100-8, p. 131–135. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016041200001008>. 35
- LEUNG, K. M. 2018, «Joining the dots between omics and environmental management», *Integrated Environmental Assessment and Management*, vol. 14, n° 2, doi :10.1002/ieam.2007, p. 169–173. URL <http://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ieam.2007>. 160
- MALTBY, L., N. BLAKE, T. BROCK et P. J. VAN DEN BRINK. 2005, «Insecticide species sensitivity distributions : importance of test species selection and relevance to aquatic ecosystems», *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 24, n° 2, doi :10.1897/04-025R.1, p. 379–388. URL <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1897/04-025R.1>. 34
- MCGEE, C. F., N. CLIPSON et E. DOYLE. 2020, «Exploring the Influence of Raising Soil pH on the Ecotoxicological Effects of Silver Nanoparticles and Micron Particles on Soil Microbial Communities», *Water, Air, & Soil Pollution*, vol. 231, n° 4, doi :10.1007/s11270-020-04540-y, p. 174. URL <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04540-y>. 41
- METROPOLIS, N., A. W. ROSENBLUTH, M. N. ROSENBLUTH, A. H. TELLER et E. TELLER. 1953, «Equation of state calculations by fast computing machines», *The journal of chemical physics*, vol. 21, n° 6, doi :10.1063/1.1699114, p. 1087–1092. URL <https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.1699114>, publisher : American Institute of Physics. 120
- MOREIRA, R. A., A. D. S. MANSANO, L. C. D. SILVA et O. ROCHA. 2014, «A comparative study of the acute toxicity of the herbicide atrazine to cladocerans *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia silvestrii* and *Macrothrix flabelligera*», *Acta Limnologica Brasiliensia*, vol. 26, n° 1, doi :10.1590/S2179-975X2014000100002, p. 1–8. URL http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2179-975X2014000100002&lng=en&nrm=iso&tlng=en. 35

- MURALIKRISHNA, I. V. et V. MANICKAM. 2017, «Chapter Eight - Environmental Risk Assessment», dans *Environmental Management*, édité par I. V. Muralikrishna et V. Manickam, Butterworth-Heinemann, ISBN 978-0-12-811989-1, p. 135–152, doi :10.1016/B978-0-12-811989-1.00008-7. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128119891000087>. 6
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL STAFF, NATIONAL RESEARCH COUNCIL (U.S.) et COMMITTEE ON THE INSTITUTIONAL MEANS FOR ASSESSMENT OF RISKS TO PUBLIC HEALTH. 1983, *Risk assessment in the federal government managing the process*, National Academy Press, Washington, D.C., ISBN 978-0-309-59880-4 978-0-585-02477-6. URL <http://www.vlebooks.com/vleweb/product/openreader?id=none&isbn=9780309598804>. 8
- NEWMAN, M. C., D. R. OWNBY, L. C. MEZIN, D. C. POWELL, T. R. CHRISTENSEN, S. B. LERBERG et B.-A. ANDERSON. 2000, «Applying species-sensitivity distributions in ecological risk assessment : assumptions of distribution type and sufficient numbers of species», *Environmental toxicology and chemistry*, vol. 19, n° 2, doi :10.1002/etc.5620190233, p. 508–515. URL <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/etc.5620190233>. 33, 35, 36
- PEREIRA, C. M., D. DERUYTTER, R. BLUST et K. A. DE SCHAMPHELAERE. 2017, «Effect of temperature on chronic toxicity of copper, zinc, and nickel to daphnia magna», *Environmental toxicology and chemistry*, vol. 36, n° 7, doi :10.1002/etc.3714, p. 1909–1916. URL <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/etc.3714>. 28
- PICADO, A., S. CHANKOVA, A. FERNANDES, F. SIMÕES, D. LEVERETT, I. JOHNSON, R. HERNAN, A. M. PIRES et J. MATOS. 2007, «Genetic variability in Daphnia magna and ecotoxicological evaluation», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 67, n° 3, doi :10.1016/j.ecoenv.2006.10.004, p. 406–410. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651306020004>. 40
- PLUMMER, M. 2003, *JAGS : A program for analysis of Bayesian graphical models using Gibbs sampling*. URL <https://www.r-project.org/conferences/DSC-2003/Proceedings/Plummer.pdf>. 122
- PLUMMER, M. 2018, *rjags : Bayesian Graphical Models using MCMC*. URL <https://CRAN.R-project.org/package=rjags>. 122
- POSTHUMA, L., G. W. SUTER II et T. P. TRAAS. 2001, *Species sensitivity distributions in ecotoxicology*, CRC press, ISBN 9781566705783. 25, 26, 29, 37
- RAIMONDO, S., C. R. LILAVOIS, L. LEE, T. AUGSPURGER, N. WANG, C. G. INGERSOLL, C. BAUER, E. HAMMER et M. G. BARRON. 2016, «Assessing variability in chemical acute toxicity of unionid mussels : Influence of intra-and interlaboratory testing, life stage, and species», *Environmental toxicology and chemistry*, vol. 35, n° 3, doi :10.1002/etc.3245, p. 750–758. URL <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/etc.3245>. 165, 166
- RAMADE, F. 1977, *Ecotoxicologie*, Masson Paris, ISBN 9782225455308. 2
- RITZ, C., F. BATY, J. C. STREIBIG et D. GERHARD. 2015, «Dose-Response Analysis Using R», *PLOS ONE*, vol. 10, n° 12, doi :10.1371/journal.pone.0146021, p. e0146021. URL <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0146021>. 72, 155
- ROUBEAU DUMONT, E., C. LARUE, S. LORBER, H. GRYTA, E. BILLOIR, E. M. GROSS et A. ELGER. 2019, «Does intraspecific variability matter in ecological risk assessment? Investigation of genotypic variations in three macrophyte species exposed to copper», *Aquatic Toxicology*, vol. 211, doi :10.1016/j.aquatox.2019.03.012, p. 29–37. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X1830972X>. 3, 28, 40, 44, 45

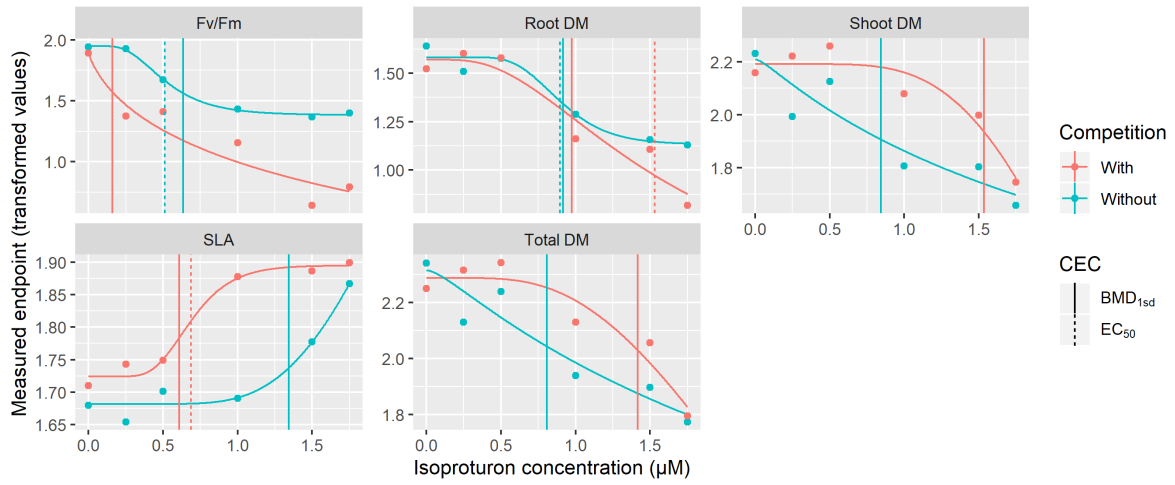
- SMETANOVÁ, S., L. BLÁHA, M. LIESS, R. SCHÄFER et M. BEKETOV. 2014, «Do predictions from Species Sensitivity Distributions match with field data?», *Environmental Pollution*, vol. 189, doi : 10.1016/j.envpol.2014.03.002, p. 126–133. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749114000876>. 37
- TARAZONA, J. V., M. A. SOBANSKA, R. CESNAITIS, T. SOBANSKI, V. BONNOMET, B. Versonnen et W. DE COEN. 2014, «Analysis of the ecotoxicity data submitted within the framework of the REACH Regulation. Part 2. Experimental aquatic toxicity assays», *Science of The Total Environment*, vol. 472, doi :10.1016/j.scitotenv.2013.10.073, p. 137–145. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969713012175>. 14
- TOUMI, H., M. BOUMAIZA, M. MILLET, C. M. RADETSKI, B. I. CAMARA, V. FELTEN et J.-F. FERARD. 2015, «Investigation of differences in sensitivity between 3 strains of *Daphnia magna* (crustacean Cladocera) exposed to malathion (organophosphorous pesticide)», *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, vol. 50, n° 1, doi :10.1080/03601234.2015.965617, p. 34–44. URL <https://doi.org/10.1080/03601234.2015.965617>. 40
- VIAENE, K. P. J., F. DE LAENDER, A. RICO, P. J. VAN DEN BRINK, A. DI GUARDO, M. MORSELLI et C. R. JANSSEN. 2015, «Species interactions and chemical stress: Combined effects of intraspecific and interspecific interactions and pyrene on *Daphnia magna* population dynamics: Combined effect of species interactions and pyrene», *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 34, n° 8, doi :10.1002/etc.2973, p. 1751–1759. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/etc.2973>. 41
- VIOLLE, C., B. J. ENQUIST, B. J. MCGILL, L. JIANG, C. H. ALBERT, C. HULSHOF, V. JUNG et J. MESSIER. 2012, «The return of the variance : intraspecific variability in community ecology», *Trends in ecology & evolution*, vol. 27, n° 4, doi :10.1016/j.tree.2011.11.014, p. 244–252. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0169534711003375>. 165
- WATSON-LEUNG, T., M. OKE, M. MCELROY, M. STUART, M. RENDAS, M. RABY et K. MAHON. 2016, «Interlaboratory evaluation of the assessment of arsenic bioaccumulation from field collected sediments using hexagenia spp», *Environmental toxicology and chemistry*, vol. 35, n° 10, doi : 10.1002/etc.3518, p. 2448–2455. URL <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/etc.3518>. 28
- WIGGER, H., D. KAWECKI, B. NOWACK et V. ADAM. 2020, «Systematic Consideration of Parameter Uncertainty and Variability in Probabilistic Species Sensitivity Distributions», *Integrated Environmental Assessment and Management*, vol. 16, n° 2, doi :10.1002/ieam.4214, p. 211–222. URL <http://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ieam.4214>. 161, 162
- WIKIPÉDIA. 2020, *Catastrophe environnementale*. URL https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Catastrophe_environmentale&oldid=166452164. 9
- ZAJDLIK, B., D. DIXON et G. STEPHENSON. 2009, «Estimating water quality guidelines for environmental contaminants using multimodal species sensitivity distributions : A case study with atrazine», *Human and Ecological Risk Assessment*, vol. 15, n° 3, doi :10.1080/10807030902892539, p. 554–564. URL <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10807030902892539>. 36

Annexe A

***Supplementary information* des articles intégrés au manuscrit**

**A.1 *Supplementary information* de l'article sur l'approche classique
paru dans *Ecotoxicology and Environmental Safety* en Section [3.2.2](#)**

Supporting information A: Models fitted for the different endpoints selected for *L. multiflorum*. On each graph, the points represent the mean of data for each concentration and the curves the fitted models. In blue are the data without competition and in red the data with competition. The dashed vertical lines represent the EC₅₀ levels and the plain vertical lines the BMD_{1sd} levels. EC₁₀ and BMD_{2sd} are not displayed here to avoid overloading the figure.

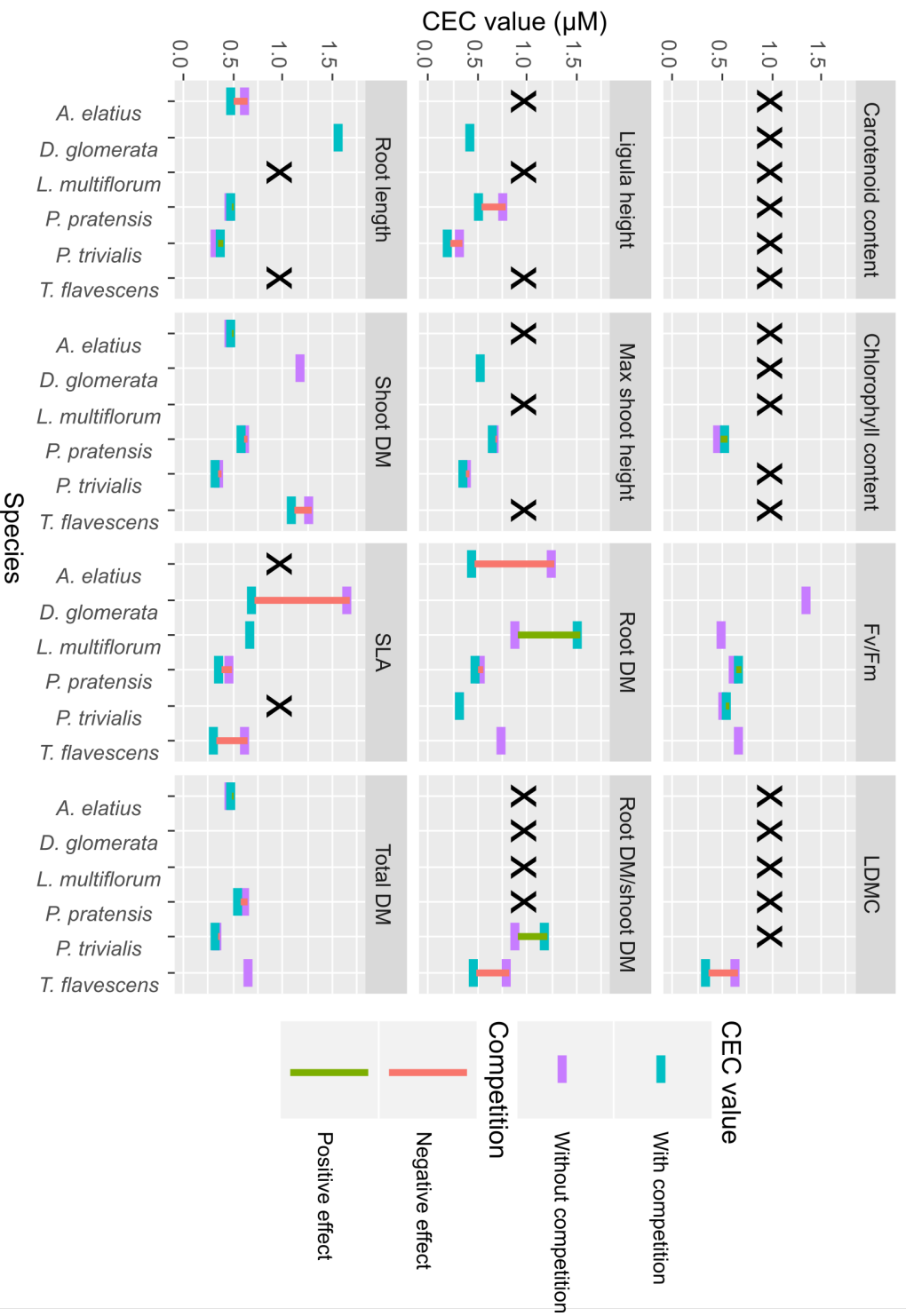


Supporting information B: Responsive endpoints for the different tested species and the corresponding CEC values (in µM) calculated. For each endpoint, species and CEC combination, the value before the slash is the one calculated using the data without competition and the one after the slash is calculated using the data with competition. The NAs indicate the cases where the value could not be calculated or was above the maximum tested concentration.

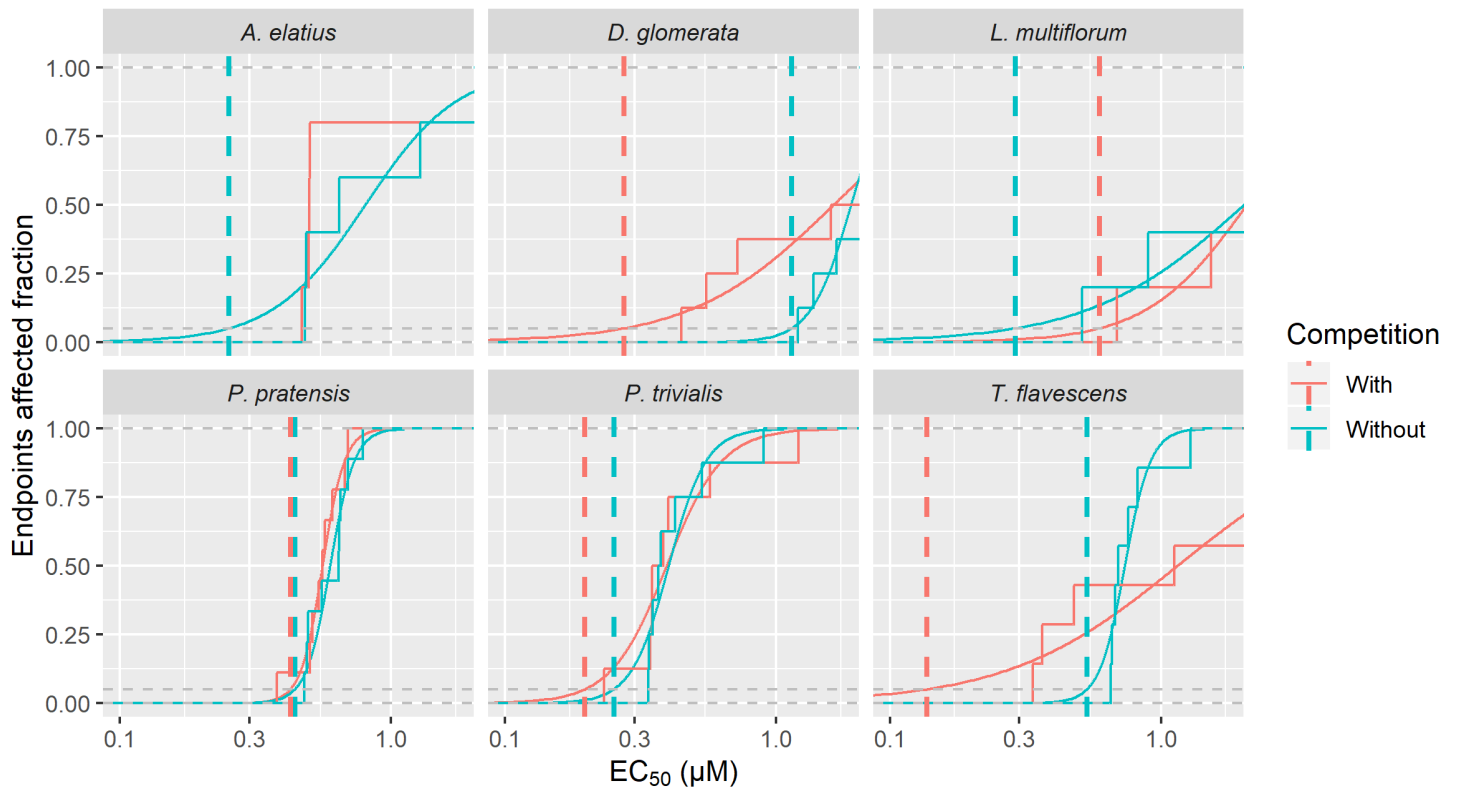
Species	CEC	<i>P. trivialis</i>	<i>P. pratensis</i>	<i>T. flavescens</i>	<i>A. elatius</i>	<i>L. multiflorum</i>	<i>D. glomerata</i>
Ligula height	EC ₁₀	0.17/0.09	0.51/0.23				0.78/0.33
	EC ₅₀	0.34/0.23	0.79/0.54				NA/0.45
	BMD _{1sd}	0.24/0.17	0.60/0.31				1.53/0.50
	BMD _{2sd}	0.35/0.31	0.73/0.46				NA/NA
Max shoot height	EC ₁₀	0.19/0.19	0.49/0.38				0.72/0.25
	EC ₅₀	0.42/0.38	0.69/0.68				NA/0.55
	BMD _{1sd}	0.30/0.31	0.64/0.49				1.66/0.72
	BMD _{2sd}	0.46/0.50	0.85/0.66				NA/NA
Root length	EC ₁₀	0.21/0.27	0.29/0.39		0.36/0.38		1.05/0.15
	EC ₅₀	0.35/0.40	0.49/0.51		0.64/0.50		NA/1.59
	BMD _{1sd}	0.28/0.36	0.39/0.49		0.85/0.48		1.43/0.52
	BMD _{2sd}	0.38/0.49	0.51/0.65		NA/0.63		NA/NA

LDMC	EC ₁₀			0.40/0.21			
	EC ₅₀			0.66/0.36			
	BMD _{1sd}			0.64/0.31			
	BMD _{2sd}			1.16/0.45			
SLA	EC ₁₀		0.36/0.20	0.33/0.18		1.68/0.46	0.94/0.03
	EC ₅₀		0.48/0.38	0.65/0.34		NA/0.69	1.67/0.72
	BMD _{1sd}		0.45/0.30	0.49/0.25		1.34/0.61	1.41/0.20
	BMD _{2sd}		0.58/0.45	0.73/0.36		1.55/0.81	NA/1.27
Fv/Fm	EC ₁₀	0.42/0.20	0.46/0.40	0.43/0.11	NA/1.09	0.29/0.16	1.15/NA
	EC ₅₀	0.53/0.57	0.64/0.69	0.69/NA	NA/NA	0.51/NA	1.38/NA
	BMD _{1sd}	0.51/0.30	0.61/0.61	0.53/0.13	1.03/0.65	0.64/0.16	1.35/1.12
	BMD _{2sd}	0.62/0.48	0.84/0.95	0.68/0.39	1.59/1.27	NA/0.50	1.63/1.68
Chlorophyll	EC ₁₀		0.38/0.46				
	EC ₅₀		0.49/0.56				
	BMD _{1sd}		0.57/0.60				
	BMD _{2sd}		NA/NA				
Carotenoid	EC ₁₀						
	EC ₅₀						
	BMD _{1sd}						
	BMD _{2sd}						
Root DM	EC ₁₀	0.17/0.15	0.30/0.40	0.58/0.10	0.33/0.33	0.62/0.66	0.78/0.25
	EC ₅₀	0.34/0.34	0.56/0.50	0.76/NA	1.28/0.47	0.90/1.53	NA/NA
	BMD _{1sd}	0.23/0.21	0.35/0.44	0.74/0.14	0.71/0.40	0.92/0.98	0.88/0.43
	BMD _{2sd}	0.32/0.32	0.45/0.49	0.99/0.57	1.57/0.50	NA/1.52	1.49/1.10
Shoots DM	EC ₁₀	0.17/0.13	0.41/0.32	0.14/0.06	0.38/0.38	0.46/NA	1.02/0.54
	EC ₅₀	0.38/0.35	0.65/0.61	1.29/1.12	0.48/0.50	NA/NA	1.21/NA
	BMD _{1sd}	0.21/0.16	0.46/0.37	0.42/0.22	0.51/0.44	0.84/1.53	1.21/0.52
	BMD _{2sd}	0.31/0.24	0.55/0.48	1.37/0.98	NA/0.52	NA/NA	NA/1.12
Total DM	EC ₁₀	0.17/0.15	0.39/0.33	0.22/0.12	0.37/0.37	0.57/1.54	1.22/0.55
	EC ₅₀	0.37/0.35	0.64/0.57	0.68/NA	0.49/0.50	NA/NA	NA/NA
	BMD _{1sd}	0.22/0.18	0.43/0.37	0.44/0.18	0.51/0.43	0.81/1.42	1.00/0.49
	BMD _{2sd}	0.30/0.26	0.53/0.47	0.88/0.63	NA/0.51	NA/NA	1.56/1.05
Root DM/shoots DM	EC ₁₀	0.23/0.27		0.66/0.01			
	EC ₅₀	0.90/1.21		0.82/0.48			
	BMD _{1sd}	0.60/0.69		0.95/0.33			
	BMD _{2sd}	1.58/NA		NA/NA			
Total selected		8	9	7	5	5	8

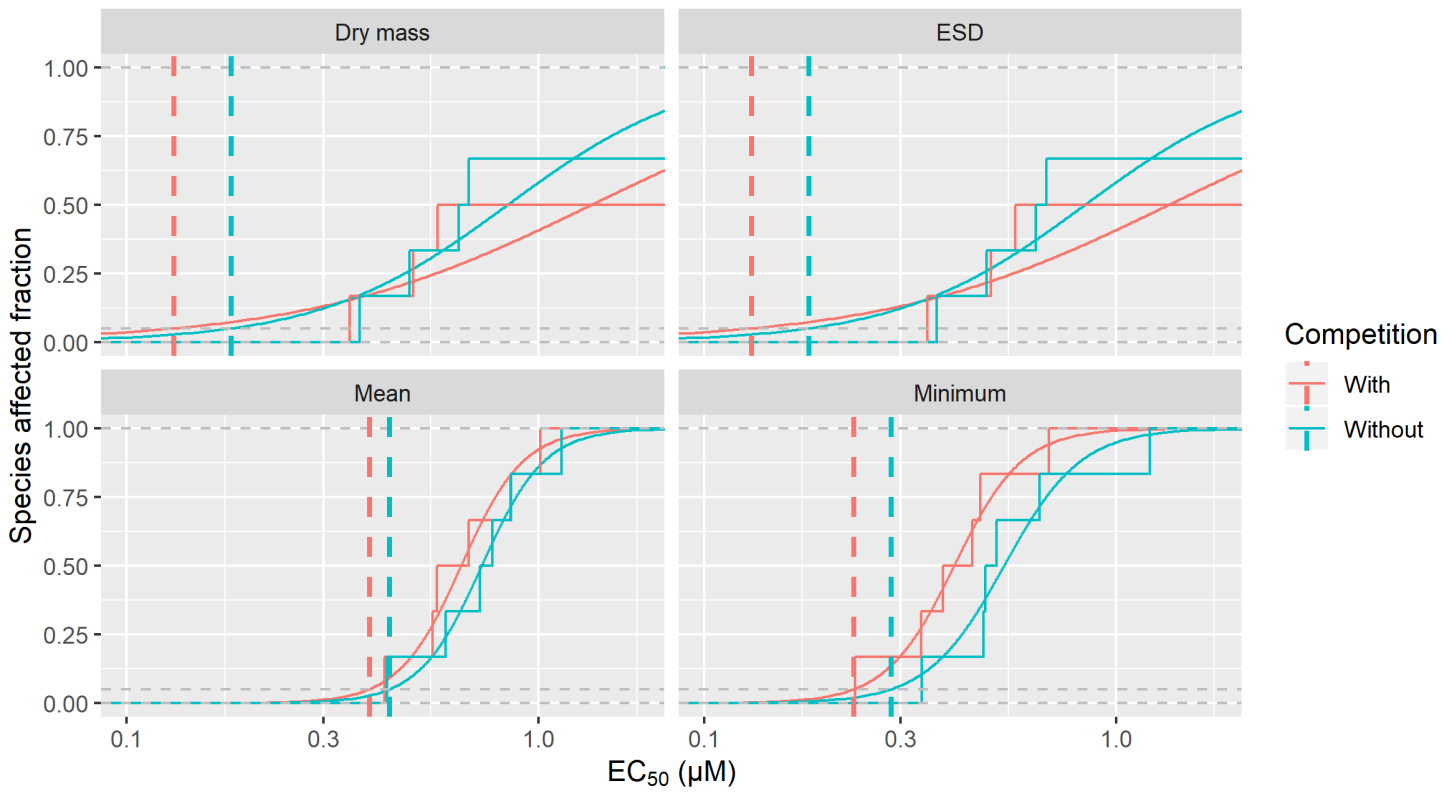
Supporting information C: EC₅₀ values for the different species and endpoints. A black "X" indicates that the endpoint is not selected for the considered species and that no CEC values were calculated. The purple marks are the CEC values without competition and the blue ones the values with competition. The lines linking those two marks for a given species and endpoints combination are red when competition had a negative effect on organisms tolerance (CEC with competition lower than CEC without competition) and are green when competition had a positive effect on organisms tolerance (CEC with competition higher than CEC without competition).



Supporting information D: ESD produced for the different species and EC_{50} . The stairs represents the data used to model the ESDs and the curves the ESDs themselves. In blue are the data without competition and in red the data with competition. The vertical dashed lines represent the HC_5 levels.



Supporting information E: SSD produced for EC_{50} . On each figure, A is the SSD produced using the mean value for each species, B is the SSD produced using the minimum value for each species, C is the SSD produced using the total dry mass for each species and D the SSD produced using the 5th percentile from "ESD" of each species. The stairs represents the data used to model the SSDs and the curves the SSDs themselves. In blue are the data without competition and in red the data with competition. The vertical dashed lines represent the HC_5 levels.



A.2 *Supplementary information* de l'article sur l'approche hiérarchique soumis dans *Environmental Science and Technology* en Section 3.3

Supporting information: How does interspecific competition modify the response of herbaceous plants against chemical stress? A hierarchical concentration-response approach.

Vincent BAILLARD^{a,*}, Marie Laure DELIGNETTE-MULLER^b, Cécile SULMON^c, Anne-Kristel BITTEBIERE^d, Cendrine MONY^c, Ivan COUEE^c, Gwenola GOUESBET^c, Simon DEVIN^a, Elise BILLOIR^a

^a *Université de Lorraine, CNRS, LIEC, F-57000 Metz, France*

^b *Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, VetAgro Sup, UMR 5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, 69622 Villeurbanne, France*

^c *Univ Rennes, CNRS, ECOBIO [(Ecosystèmes, biodiversité, évolution)] - UMR 6553, F-35000 Rennes, France*

^d *Université de Lyon 1, CNRS, UMR 5023 LEHNA, 43 Boulevard du 11 novembre 1918, Villeurbanne Cedex, 69622, France*

*Corresponding author

Email address: vincent.baillard@univ-lorraine.fr (Vincent BAILLARD)

Supporting information A: Bibliographical information on chosen endpoint response to both studied stress.

Endpoint	Chemical stress effect	Competition effect
Carotenoid content	Yes: [1, 2]	Yes: [3]
Chlorophyll content	Yes: [1, 2]	Yes: [4], No: [5, 3]
Fv/Fm	Yes: [6, 2]	Yes: [4, 7, 8]
LDMC	No information found	Yes: [9], No: [10]
Ligula height	Yes: [11]	Yes: [12]
Max shoot height	Yes: [1, 13]	Yes: [10, 14, 9]
Root DM	Yes: [15, 16, 17, 18]	Yes: [19]
Root length	Yes: [1, 13]	Yes: [10, 20]
Shoot DM	Yes: [15, 16, 17, 18]	Yes: [19]
SLA	Yes: [21]	Yes: [10, 9, 14]
Total DM	Yes: [15, 16, 17, 18]	Yes: [19, 22, 23]

Table S1: Publications considering the different endpoints as relevant (Yes) or not (No) to track the effects of chemical stress and competition.

References

- [1] A.-A. Serra, I. Couée, D. Renault, G. Gouesbet, C. Sulmon, Metabolic profiling of *Lolium perenne* shows functional integration of metabolic responses to diverse subtoxic conditions of chemical stress, *Journal of Experimental Botany* 66 (7) (2015) 1801–1816. doi:10.1093/jxb/eru518.
URL <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/eru518>
- [2] F. Ramel, C. Sulmon, G. Gouesbet, I. Couée, Natural variation reveals relationships between pre-stress carbohydrate nutritional status and subsequent responses to xenobiotic and oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*, *Annals of Botany* 104 (7) (2009) 1323–1337. doi:10.1093/aob/mcp243.

URL <https://academic.oup.com/aob/article-lookup/doi/10.1093/aob/mcp243>

- [3] M. P. Esquivias, M. Zunzunegui, M. C. Díaz Barradas, L. Álvarez-Cansino, Competitive effect of a native-invasive species on a threatened shrub in a Mediterranean dune system, *Oecologia* 177 (1) (2015) 133–146. doi: 10.1007/s00442-014-3106-4.
URL <http://link.springer.com/10.1007/s00442-014-3106-4>
- [4] M. E. Loik, K. D. Holl, Photosynthetic responses of tree seedlings in grass and under shrubs in early-successional tropical old fields, Costa Rica, *Oecologia* 127 (1) (2001) 40–50. doi:10.1007/s004420000566.
URL <http://link.springer.com/10.1007/s004420000566>
- [5] Q. Guo, H. Song, J. Kang, H. Korpelainen, C. Li, Different responses in leaf-level physiology to competition and facilitation under different soil types and N fertilization, *Environmental and Experimental Botany* 150 (2018) 69–78. doi:10.1016/j.envexpbot.2018.03.006.
URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098847218300790>
- [6] D. Alberto, I. Couée, C. Sulmon, G. Gouesbet, Root-level exposure reveals multiple physiological toxicity of triazine xenobiotics in *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Plant Physiology* 212 (2017) 105–114. doi:10.1016/j.jplph.2017.01.013.
URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0176161717300494>
- [7] S. Niu, Y. Zhang, Z. Yuan, W. Liu, J. Huang, S. Wan, Effects of interspecific competition and nitrogen seasonality on the photosynthetic characteristics of C3 and C4 grasses, *Environmental and Experimental Botany* 57 (3) (2006) 270–277. doi:10.1016/j.envexpbot.2005.06.004.
URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098847205000948>

- [8] M. Pollastrini, V. Holland, W. Brüggemann, J. Koricheva, I. Jussila, M. Scherer-Lorenzen, S. Berger, F. Bussotti, Interactions and competition processes among tree species in young experimental mixed forests, assessed with chlorophyll fluorescence and leaf morphology, *Plant Biology* 16 (2) (2014) 323–331. doi:10.1111/plb.12068.
URL <http://doi.wiley.com/10.1111/plb.12068>
- [9] A.-K. Bittebiere, C. Mony, Plant traits respond to the competitive neighbourhood at different spatial and temporal scales, *Annals of Botany* 115 (1) (2015) 117–126. doi:10.1093/aob/mcu206.
URL <https://academic.oup.com/aob/article-lookup/doi/10.1093/aob/mcu206>
- [10] J. H. C. Cornelissen, S. Lavorel, E. Garnier, S. Díaz, N. Buchmann, D. E. Gurvich, P. B. Reich, H. t. Steege, H. D. Morgan, M. G. A. v. d. Heijden, J. G. Pausas, H. Poorter, A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide, *Australian Journal of Botany* 51 (4) (2003) 335. doi:10.1071/BT02124.
URL <http://www.publish.csiro.au/?paper=BT02124>
- [11] G. Saladin, C. Magné, C. Clément, Impact of flumioxazin herbicide on growth and carbohydrate physiology in *Vitis vinifera* L., *Plant Cell Reports* 21 (2003) 821–827. doi:10.1007/s00299-003-0590-0.
- [12] H. Nagashima, K. Hikosaka, Plants in a crowded stand regulate their height growth so as to maintain similar heights to neighbours even when they have potential advantages in height growth, *Annals of Botany* 108 (1) (2011) 207–214. doi:10.1093/aob/mcr109.
URL <https://academic.oup.com/aob/article-lookup/doi/10.1093/aob/mcr109>
- [13] A.-A. Serra, A. Miqueau, F. Ramel, I. Couée, C. Sulmon, G. Gouesbet, Species- and organ-specific responses of agri-environmental plants to residual agricultural pollutants, *Science of The Total Environment* 694

(2019) 133661. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.133661.

URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969719335879>

- [14] A.-K. Bittebiere, N. Renaud, B. Clément, C. Mony, Morphological response to competition for light in the clonal *Trifolium repens* (Fabaceae), American Journal of Botany 99 (4) (2012) 646–654. doi:10.3732/ajb.1100487. URL <http://doi.wiley.com/10.3732/ajb.1100487>
- [15] R. Chhokar, R. Sharma, G. Jat, A. Pundir, M. Gathala, Effect of tillage and herbicides on weeds and productivity of wheat under rice–wheat growing system, Crop Protection 26 (11) (2007) 1689–1696. doi:10.1016/j.cropro.2007.01.010. URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S026121940700066X>
- [16] J. Kumar, K. Nisar, N. A. Shakil, R. Sharma, Residue and Bio-Efficacy Evaluation of Controlled Release Formulations of Metribuzin Against Weeds in Wheat, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 85 (3) (2010) 357–361. doi:10.1007/s00128-010-0091-0. URL <http://link.springer.com/10.1007/s00128-010-0091-0>
- [17] D. E. Robinson, N. Soltani, P. H. Sikkema, Response of Four Market Classes of Dry Bean (*Phaseolus vulgaris*) to Foramsulfuron, Isoxaflutole, and Isoxaflutole plus Atrazine Applied in Previous Years, Weed Technology 20 (3) (2006) 558–563. doi:10.1614/WT-05-075R.1. URL https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0890037X00018650/type/journal_article
- [18] M. T. Wu, B. Singh, D. K. Salunkhe, Influence of Foliar Application of *S*-Triazine Compounds on Fresh Weight, Dry Weight, Chemical Composition, and Enzymatic Activity of Pea and Sweet Corn Seedlings, Journal of Experimental Botany 23 (3) (1972) 793–800. doi:10.1093/jxb/23.3.793.

URL <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/23.3.793>

- [19] D. Robinson, H. Davidson, C. Trinder, R. Brooker, Root–shoot growth responses during interspecific competition quantified using allometric modelling, *Annals of Botany* 106 (6) (2010) 921–926. doi:10.1093/aob/mcq186.

URL <https://academic.oup.com/aob/article-lookup/doi/10.1093/aob/mcq186>

- [20] R. M. Callaway, S. C. Pennings, C. L. Richards, PHENOTYPIC PLASTICITY AND INTERACTIONS AMONG PLANTS, *Ecology* 84 (5) (2003) 1115–1128. doi:10.1890/0012-9658(2003)084[1115:PPAIAP]2.0.CO;2.

URL [http://doi.wiley.com/10.1890/0012-9658\(2003\)084\[1115:PPAIAP\]2.0.CO;2](http://doi.wiley.com/10.1890/0012-9658(2003)084[1115:PPAIAP]2.0.CO;2)

- [21] L. Pellissier, M. S. Wisz, B. Strandberg, C. Damgaard, Herbicide and fertilizers promote analogous phylogenetic responses but opposite functional responses in plant communities, *Environmental Research Letters* 9 (2) (2014) 024016. doi:10.1088/1748-9326/9/2/024016.

URL <http://stacks.iop.org/1748-9326/9/i=2/a=024016?key=crossref.124c92b498bcab22411db946199f7abb>

- [22] D. E. Goldberg, L. Fleetwood, Competitive Effect and Response in Four Annual Plants, *The Journal of Ecology* 75 (4) (1987) 1131. doi:10.2307/2260318.

URL <https://www.jstor.org/stable/2260318?origin=crossref>

- [23] D. E. Goldberg, Neighborhood Competition in an Old-Field Plant Community, *Ecology* 68 (5) (1987) 1211–1223. doi:10.2307/1939205.

URL <http://doi.wiley.com/10.2307/1939205>

- [24] A. Gelman, Prior distributions for variance parameters in hierarchical models (comment on article by Browne and Draper), *Bayesian Analysis* 1 (3)

(2006) 515-534. doi:10.1214/06-BA117A.

URL <https://projecteuclid.org/euclid.ba/1340371048>

[25] N. G. Polson, J. G. Scott, On the half-Cauchy prior for a global scale parameter, arXiv:1104.4937 [stat]ArXiv: 1104.4937 (Sep. 2011).

URL <http://arxiv.org/abs/1104.4937>

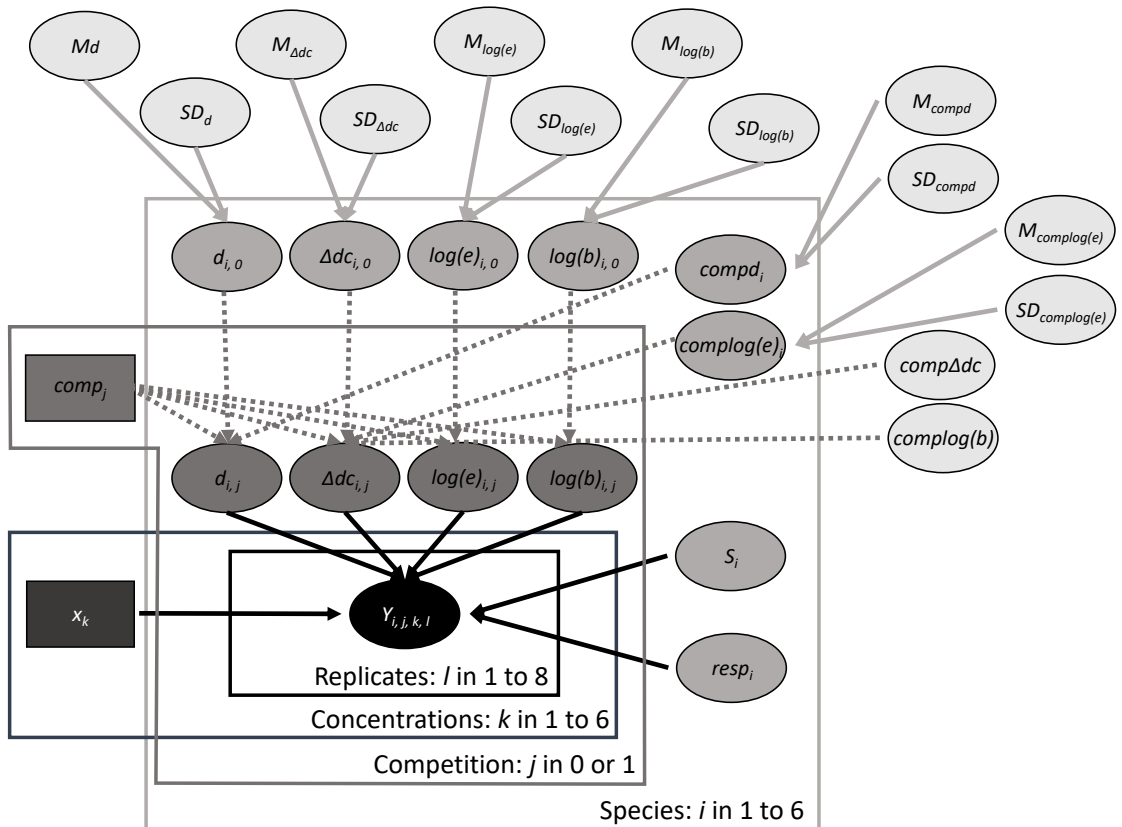
Supporting information B: Summary of the defined nodes and their definitions (Table S2) and example of a probabilistic Directed Acyclic Graph (DAG) corresponding to a fixed effect on $comp\Delta dc$ and $complogb$ and a random effect on $compd_i$ and $comploge_i$ (Figure S1). The respective means of the $\theta_{i,0}$ parameter Normal laws were noted M_d , $M_{\Delta dc}$, M_{loge} and M_{logb} and their respective standard deviations SD_d , $SD_{\Delta dc}$, SD_{loge} and SD_{logb} . Respectively, the ones of the $comp\theta_i$ parameters were noted M_{compd} , $M_{comp\Delta dc}$, $M_{comploge}$ and $M_{complogb}$ for the means and SD_{compd} , $SD_{comp\Delta dc}$, $SD_{comploge}$ and $SD_{complogb}$ for the standard deviations.

For each endpoint, the entirety of responses were thus described by the following set of hyperparameters: M_d , SD_d , $M_{\Delta dc}$, $SD_{\Delta dc}$, M_{loge} , SD_{loge} , M_{logb} , SD_{logb} , $resp_i$, S_i and a combination of competition effect hyperparameters with fixed effect (*i.e.* $comp\theta$ parameters) and/or random effect (*i.e.* M_{compd} , SD_{compd} , $M_{comp\Delta dc}$, $SD_{comp\Delta dc}$, $M_{comploge}$, $SD_{comploge}$, $M_{complogb}$, $SD_{complogb}$).

Category	Node	Type	Definition
Without competition ($\theta_{i,0}$)	$d_{i,0}$	Stochastic	$\mathcal{N}(M_d, SD_d)$
	$\Delta dc_{i,0}$	Stochastic	$\mathcal{N}(M_{\Delta dc}, SD_{\Delta dc})$
	$loge_{i,0}$	Stochastic	$\mathcal{N}(M_{loge}, SD_{loge})$
	$logb_{i,0}$	Stochastic	$\mathcal{N}(M_{logb}, SD_{logb})$
With competition ($\theta_{i,1}$)	$d_{i,1}$	Logic	$d_{i,0} + (compd \text{ or } compd_i)$
	$\Delta dc_{i,1}$	Logic	$\Delta dc_{i,0} + (comp\Delta dc \text{ or } comp\Delta dc_i)$
	$loge_{i,1}$	Logic	$loge_{i,0} + (comploge \text{ or } comploge_i)$
	$logb_{i,1}$	Logic	$logb_{i,0} + (complogb \text{ or } complogb_i)$
Competition parameters ($comp\theta_i$) in the case where the effect is assumed random	$compd_i$	Stochastic	$\mathcal{N}(M_{compd}, SD_{compd})$
	$comp\Delta dc_i$	Stochastic	$\mathcal{N}(M_{comp\Delta dc}, SD_{comp\Delta dc})$
	$comploge_i$	Stochastic	$\mathcal{N}(M_{comploge}, SD_{comploge})$
	$complogb_i$	Stochastic	$\mathcal{N}(M_{complogb}, SD_{complogb})$
Final parameters	$\mu_{i,j,k}$	Logic	$d_{i,j} - \Delta dc_{i,j} * \phi\left(\frac{\log(x_k/e_{i,j})}{b_{i,j}}\right) * resp_i$
	$y_{i,j,k,l}$	Stochastic	$\mathcal{N}(\mu_{i,j,k}, S_i)$

Table S2: Summary of nodes that can be used in the different models, their type (logic or stochastic) and their definition. An example of Directed Acyclic Graph with a fixed effect on $comp\Delta dc$ and $complogb$ and a random effect on $compd_i$ and $comploge_i$ can be found in Figure S1.

Figure S1: Example of Directed Acyclic Graph with a fixed effect on $comp\Delta dc$ and $complogb$ and a random effect on $compd$ and $comploge$. Ellipses represent variables, rectangles represent covariables, solid lines represent stochastic links and dashed lines represent deterministic links. The different frames represent the organisation level of the data and at which scale is defined each node. The definition of the different nodes can be found in Table S2.



Supporting information C: Details on the prior distributions (Table S3) and the explanation of these choices. $xmin$ and $xmax$ were respectively defined as the lowest non-zero and the highest tested concentrations ($xrange$ being the difference between $xmin$ and $xmax$) and $ymin$ and $ymax$ were respectively defined as the minimum and maximum values measured for a given endpoint for all species ($yrange$ being the difference between $ymin$ and $ymax$).

Means of Normal distributions used for $\theta_{i,0}$ parameters were defined following uniform laws:

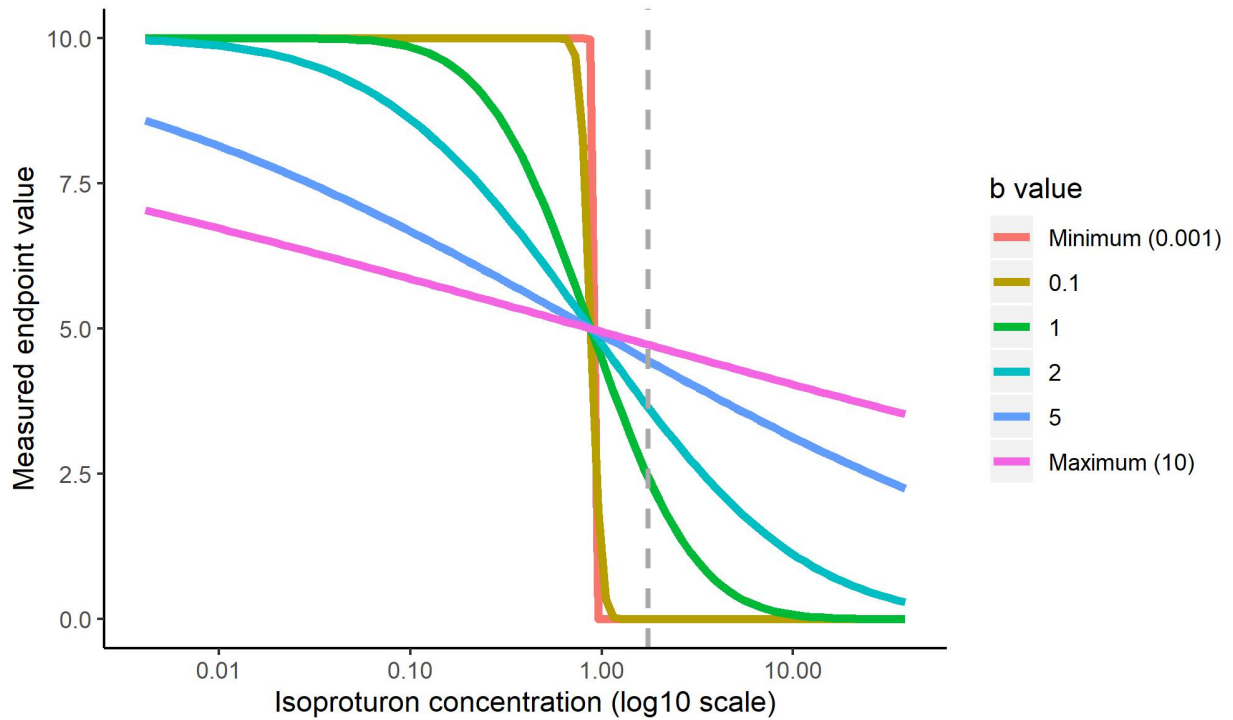
- M_d was defined as $\mathcal{U}(ymin, ymax)$ to be comprised in the range of responses as it is the response value at the control.
- $M_{\Delta dc}$ was defined as $\mathcal{U}(0, xrange)$ to be comprised between zero and the amplitude of response as this parameter traduces the amplitude of variation of the data. It is however defined as $\mathcal{U}(-yrange, 0)$ for SLA as this endpoint is the only one to have an increasing value with increasing isoproturon concentration.
- M_{loge} was defined as $\mathcal{U}(\log(xmin), \log(xmax))$ to be comprised in the range of tested concentrations.
- M_{logb} was defined as $\mathcal{U}(-3, 1)$ to have a great amplitude as the b parameter is the standard deviation of log-probit model gaussian part. The -3 and 1 values for M_{logb} were chosen because this range of values give a b value between $10^{(-3)}$ and 10 and thus a model horizontal amplitude (the concentration range containing the 95% CI of response range) between $4 * 10^{(-3)}$ and 40 as the 95% CI amplitude of a Normal law is equal to about four times its standard deviation. Figure S2 shows how the value of the b parameter affects the shape of the produced curves.

For standard deviation values of $\theta_{i,0}$ parameters, half-Cauchy laws (only the positive part of Cauchy laws centered on zero) were used as advised in [24, 25], with a large scale parameter equal each time to the possible amplitude of the associated $\theta_{i,0}$ parameter:

Parameter	Prior distribution
M_d	$\mathcal{U}(ymin, ymax)$
SD_d	$Half - Cauchy(0, (yrange / 4))$
$M_{\Delta dc}$	$\mathcal{U}(-yrange, 0)$ for SLA, $\mathcal{U}(0, yrange)$ for the other endpoints
$SD_{\Delta dc}$	$Half - Cauchy(0, (yrange / 4))$
M_{loge}	$\mathcal{U}(\log(xmin), \log(xmax))$
SD_{loge}	$Half - Cauchy(0, (\log(xrange) / 4))$
M_{logb}	$\mathcal{U}(-3, 1)$
SD_{logb}	$Half - Cauchy(0, 1)$
S_i	$\mathcal{U}(0, yrange)$
$resp_i$	$Bern(0.5)$
$compd$ (if fixed)	$\mathcal{N}(0, (yrange / 4))$
$comp\Delta dc$ (if fixed)	$\mathcal{N}(0, (yrange / 4))$
$comploge$ (if fixed)	$\mathcal{N}(0, (\log(xrange) / 4))$
$complogb$ (if fixed)	$\mathcal{N}(0, 1)$
M_{compd} (if $compd$ random)	$\mathcal{N}(0, (yrange / 4))$
SD_{compd} (if $compd$ random)	$Half - Cauchy(0, (yrange / 4))$
$M_{comp\Delta dc}$ (if $comp\Delta dc$ random)	$\mathcal{U}(-yrange, 0)$ for SLA, $\mathcal{U}(0, yrange)$ for the other endpoints
$SD_{comp\Delta dc}$ (if $comp\Delta dc$ random)	$Half - Cauchy(0, (yrange / 4))$
$M_{comploge}$ (if $comploge$ random)	$\mathcal{U}(\log(xmin), \log(xmax))$
$SD_{comploge}$ (if $comploge$ random)	$Half - Cauchy(0, (\log(xrange) / 4))$
$M_{complogb}$ (if $complogb$ random)	$\mathcal{U}(-3, 1)$
$SD_{complogb}$ (if $complogb$ random)	$Half - Cauchy(0, 1)$

Table S3: List of entering nodes that can be used in the different models, and their prior definition. Normal laws are parameterized with their mean and standard deviation, Half-Cauchy laws are parameterized with their position and scale, Bernoulli law with its probability and Uniform laws with their minimum and maximum. Values for the SLA endpoint are sometimes different as this endpoint is the only one which value is increasing with isoproturon concentration.

Figure S2: Scheme of the effect of b parameter value on the shape of produced CRC. The values for other parameters stay unchanged between the different curves with $d = 10$, $\Delta dc = 10$ and $e = 1$. Abscissa is expressed in \log_{10} scale. The vertical grey dashed line represents the maximum isotroturon concentration tested in the experiments.



- For SD_d , the range of responses ($yrange$) as d is the level of response at the control and its value is necessarily comprised in the response range giving $Half - Cauchy(0, (yrange / 4))$ for SD_d ,
- For $SD_{\Delta dc}$, the range of responses as Δdc is the vertical amplitude of the concentration-response and its value is necessarily comprised in the response range, giving $Half - Cauchy(0, (yrange / 4))$ for $SD_{\Delta dc}$,
- For $SD_{\log e}$, the range of tested concentrations as e is equal to the inflexion point of the CRC and should be present in the range of tested

concentrations), giving *Half – Cauchy*(0, ($\log(xrange) / 4$)) for SD_{loge}

- For SD_{logb} , *Half – Cauchy*(0, 1) because of the way b is defined in the precedent paragraph (1 being here equal to $(1 - (-3))/4$).

The prior distribution of S_i (the standard deviation of the CRC) was defined as $\mathcal{U}(0, yrange)$ to limit the residual standard deviation of the dose-response curve in the range of responses. For $resp_i$ (the parameter determining if the model should be constant or not), we had no hypothesis on its state, so we chose *Bernoulli*(0.5) to have the same *a priori* probability for the CRC to be constant or not.

For parameters traducing a competition effect, in the case of a fixed effect (*i.e.* for $compd$, $comp\Delta dc$, $comploge$ and $complogb$), a Normal law centered on zero was chosen because we made no hypothesis on the effect direction. Standard deviations for those Normal laws were defined the same way that for the scale parameters in the Half-Cauchy laws defining the standard deviation of the log-probit parameters, *i.e.* SD_d (respectively $SD_{\Delta dc}$, SD_{loge} or SD_{logb}) for SD_{compd} (respectively $SD_{comp\Delta dc}$, $SD_{comploge}$ or $SD_{complogb}$). In the case of a random effect, M_{compd} (respectively $M_{comp\Delta dc}$, $M_{comploge}$ or $M_{complogb}$) was defined the same way than $compd$ (respectively $comp\Delta dc$, $comploge$ or $complogb$). Standard deviation for those competition parameters are defined the same way than standard deviations for the log-probit parameters, *i.e.* SD_{compd} (respectively $SD_{comp\Delta dc}$, $SD_{comploge}$ or $SD_{complogb}$) the same than SD_d (respectively $SD_{\Delta dc}$, SD_{loge} or SD_{logb}). Those choices were made to ensure that those competition effect parameters are consistent with the values of the log-probit model parameters.

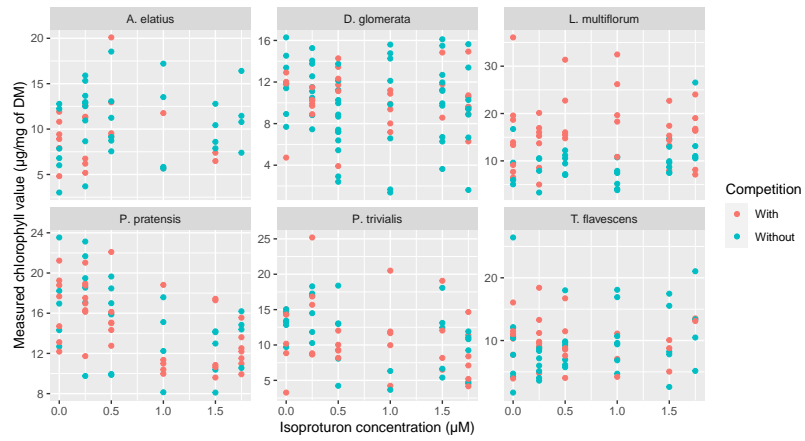
Supporting information D: Precise procedure used to get final used number of iterations, thin number and burn-in number in MCMC simulations.

To have a final chain length of 4,000 for every models, the number of iterations was set, for each endpoint, as the first 4,000 multiple superior to the maximum estimated number for the one given for the different parameters. The thin value was then fixed as the chosen number of iterations divided by 4,000. Besides those iterations, a three thousand iteration burn-in phase were applied. This chosen burn-in value was higher than the highest ones according to the Raftery and Lewis diagnostics for the different parameters to be sure that our models converged. For example, if the diagnostic gave an advised iteration number of 197,000, we realized 200,000 iterations and applied a thin of fifty (equal to $197,000/4000$) to finally get three 4000 iteration-long chains.

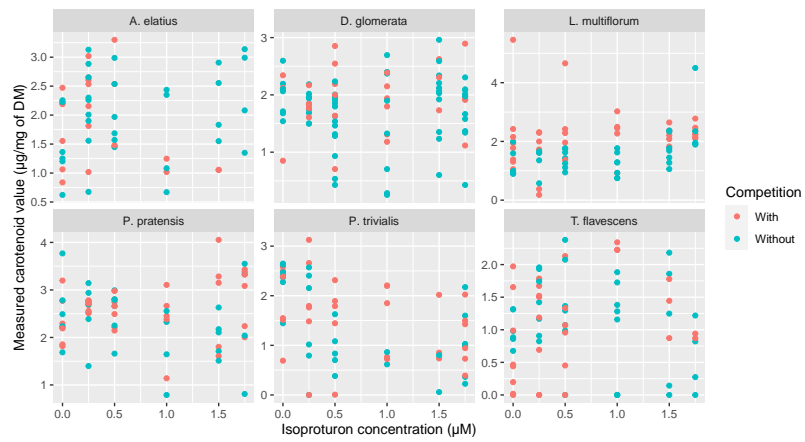
Endpoint	Applied number of iterations		
	Iteration	Thin	Burn-in
Fv/Fm	344,000	86	3000
LDMC	300,000	75	3000
Ligula height	520,000	130	3000
Max shoot height	580,000	145	3000
Root DM	260,000	65	3000
Root length	328,000	82	3000
Shoot DM	248,000	62	3000
SLA	284,000	71	3000
Total DM	276,000	69	3000

Table S4: Recapitulative table of the applied parameters used to estimate MCMC simulations.

Supporting information E: Raw data concentration-response plots for chlorophyll and carotenoid contents, the two non-kept endpoints.



(a) Raw data concentration-response plots for chlorophyll content. In red are the data without competition and in blue the data with competition.



(b) Raw data concentration-response plots for carotenoid content. In red are the data without competition and in blue the data with competition.

Supporting information F: Results obtained from the Gelman and Rubin diagnostic of MCMC convergence for the different estimated parameters and the different endpoints.

Parameter	Species	Fv/Fm	LDMC	Ligula height	Max shoot height	Root DM	Root length	Shoot DM	SLA	Total DM
d	<i>T. flavescens</i>	1,00145	1,00154	1,00107	1,00029	0,99987	1,00299	1,0001	1,00218	1,00049
d	<i>P. trivialis</i>	1,0005	1,00086	1,00186	1,00013	1,00063	1,00019	1,0033	1,00273	1,00141
d	<i>P. pratensis</i>	1,00026	1,00068	1,0016	1,00099	1,00053	1,0006	1,0008	1,00104	1,00088
d	<i>D. glomerata</i>	1,00009	0,99999	1,00062	1,00067	1,00003	0,9999	1,0016	1,00165	1,00063
d	<i>A. elatius</i>	1,00012	1,00093	0,99981	1,00162	1,00048	1,00113	1,0009	1,00374	1,00055
d	<i>L. multiflorum</i>	1,00028	1,0005	1,0012	1,00091	1,00021	1,00068	1,0013	1,00272	1,0001
deltadc	<i>T. flavescens</i>	1,0014	1,00106	1,00291	1,00356	1,00495	1,00236	1,0066	1,00134	1,00354
deltadc	<i>P. trivialis</i>	1,00058	1,00071	1,00537	1,0005	1,00123	1,00079	1,0044	1,00637	1,00185
deltadc	<i>P. pratensis</i>	1,00223	1,00061	1,00659	1,0019	0,99997	0,99988	1,0054	1,00244	0,99988
deltadc	<i>D. glomerata</i>	1,00369	1,00062	1,00135	1,00654	1,00081	1,00434	1,003	1,00208	1,00346
deltadc	<i>A. elatius</i>	1,0012	1,00345	1,00248	1,00242	1,00486	1,00388	1,0014	1,00187	1,00032
deltadc	<i>L. multiflorum</i>	1,00684	1,005	1,00645	1,00438	1,00258	1,00877	1,0012	1,00236	1,00024
log10(e)	<i>T. flavescens</i>	1,00043	1,00175	1,01016	1,01706	1,00454	1,00506	1,0162	1,00258	1,00405
log10(e)	<i>P. trivialis</i>	1,00007	1,00841	1,00149	1,02584	1,00004	1,00156	1,0003	1,00258	1,0045
log10(e)	<i>P. pratensis</i>	1,00419	1,0117	1,00648	1,00256	1,00113	1,00023	1,0043	1,00814	1,0012
log10(e)	<i>D. glomerata</i>	1,00496	1,00526	1,00556	1,00215	1,0001	1,00183	1,0045	1,00427	1,00584
log10(e)	<i>A. elatius</i>	1,00119	1,00116	1,00883	1,00245	1,00457	1,00066	1,0024	1,00379	1,00114
log10(e)	<i>L. multiflorum</i>	1,00342	1,01225	1,00143	1,00837	1,00084	1,01564	1,0012	1,00079	1,01155
log10(b)	<i>T. flavescens</i>	1,00199	1,00363	1,00084	1,00044	1,00683	1,00023	1,0022	1,00876	1,0034
log10(b)	<i>P. trivialis</i>	1,00099	1,00092	1,00314	1,00116	1,00257	1,00442	1,0051	1,0031	1,00029
log10(b)	<i>P. pratensis</i>	0,99989	1,0002	1,00612	1,00349	1,0022	1,00246	1,0041	1,00271	1,0017
log10(b)	<i>D. glomerata</i>	1,00084	1,00269	1,00332	1,00095	1,00123	1,00091	1,0017	1,00071	1,00297
log10(b)	<i>A. elatius</i>	1,00098	1,0001	1,00051	1,00198	1,00106	1,00219	1,0007	1,00359	1,013
log10(b)	<i>L. multiflorum</i>	1,00112	1,00252	1,0015	1,99999	1,00646	1,00313	1,0009	1,00044	1,00258
moy_d	All	0,99996	1,00297	1,00326	1,00404	1,00026	1,00265	1,0004	1,00029	0,99989
moy_deltadc	All	1,00274	1,00388	1,00233	1,00379	1,00082	1,00009	1,0007	1,00377	1,0016
moy_log10(e)	All	1,00071	1,00049	1,0013	1,00442	1,00047	1,00088	1,001	1,00514	1,00043
moy_log10(b)	All	1,00033	1,00089	1,00102	1,0012	1,00285	1,00021	1,0015	1,0031	1,00436
sd_d	All	1,00144	1,00669	1,00268	1,00153	1,00656	1,0009	1,0031	1,00172	1,00076
sd_deltadc	All	1,00046	1,00338	1,01022	1,00161	1,0015	1,99999	1,0407	1,004	1,00141
sd_log10(e)	All	1,00819	1,00681	1,01103	1,00013	1,00349	1,00088	1,0077	1,00242	1,00094
sd_log10(b)	All	1,00049	0,99995	1,00035	1,00067	1,00094	1,00247	1,0035	1,01321	1,00781
compd	All	NA	NA	NA	NA	1,00284	1,0014	NA	0,99998	NA
compd	<i>T. flavescens</i>	NA	NA	NA	1,00145	NA	NA	1,0025	NA	1,00064
compd	<i>P. trivialis</i>	NA	NA	NA	1,00139	NA	NA	1,0003	NA	1,00127
compd	<i>P. pratensis</i>	NA	NA	NA	1,00068	NA	NA	1,0012	NA	0,99998
compd	<i>D. glomerata</i>	NA	NA	NA	1,00147	NA	NA	1,0028	NA	1,00055
compd	<i>A. elatius</i>	NA	NA	NA	1,00185	NA	NA	1,0013	NA	1,00011
compd	<i>L. multiflorum</i>	NA	NA	NA	1,00231	NA	NA	1,0004	NA	1,00117
compdeltadc	All	NA	NA	1,00238	1,00049	NA	NA	NA	NA	NA
complog10(e)	All	NA	1,0026	1,00164	NA	NA	NA	1	NA	1,00038
complog10(e)	<i>T. flavescens</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1,00085	NA
complog10(e)	<i>P. trivialis</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1,01081	NA
complog10(e)	<i>P. pratensis</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1,00155	NA
complog10(e)	<i>D. glomerata</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1,0009	NA
complog10(e)	<i>A. elatius</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1,00081	NA
complog10(e)	<i>L. multiflorum</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1,00017	NA
complog10(b)	All	1,00043	1,00105	1,00502	NA	NA	NA	NA	NA	NA
S	<i>T. flavescens</i>	0,99989	1,00141	0,99992	1,0007	1,00072	1,00238	1,0002	1,00194	1,99993
S	<i>P. trivialis</i>	1,00066	1,00003	1,00062	1,00156	1,00011	1,99993	1,0038	1,00157	1,00082
S	<i>P. pratensis</i>	0,99989	1,00192	1,00078	1,00371	1,00026	1,00128	1,0015	1,00197	1,00126
S	<i>D. glomerata</i>	1,00227	0,99989	1,00044	1,00169	1,00144	1,00055	1,0003	1,0006	1,0007
S	<i>A. elatius</i>	1,00033	1,00076	1,00021	1,00056	1,00248	1,00239	1,0006	1,00066	1,00113
S	<i>L. multiflorum</i>	1,00057	1,00016	1,0001	1,00017	1,00123	1,00039	1,0002	1,00235	1,00116
moycompd	All	NA	NA	NA	1,00128	NA	NA	1,0017	NA	1,00205
sdcompd	All	NA	NA	NA	1,00402	NA	NA	1,0025	NA	0,99993
moycomplog10(e)	All	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1,00063	NA
sdcomplog10(e)	All	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1,00767	NA

Table S5: Table showing the results obtained from the Gelman and Rubin diagnostic of convergence for the different estimated parameters and the different endpoints. The values displayed are the upper bound of the 95% CI of the calculated value. The indicator is based on the ratio between the intra and the interchain variances: the more the calculated value is close to one, the more the parameter has attained convergence in the simulation process. NAs indicate the cases where the parameter was not used in the model for the given endpoint.

Supporting information G: Figures showing the concentration-response curves produced by the applied models. On each following graph, open circles represent the data points, plain circles represent the mean of data points for each concentration, the lines are the concentration-response curves drawn using the mean estimated value of each parameter and the vertical plain lines are the 95% CI of the predicted response at each tested concentration (abscissa values were modified for those lines not to superimpose on the data points). In red are the data without competition and in blue the data with competition.

Figure S4: Concentration-response curves produced using parameters of the model built for the Fv/Fm endpoint.

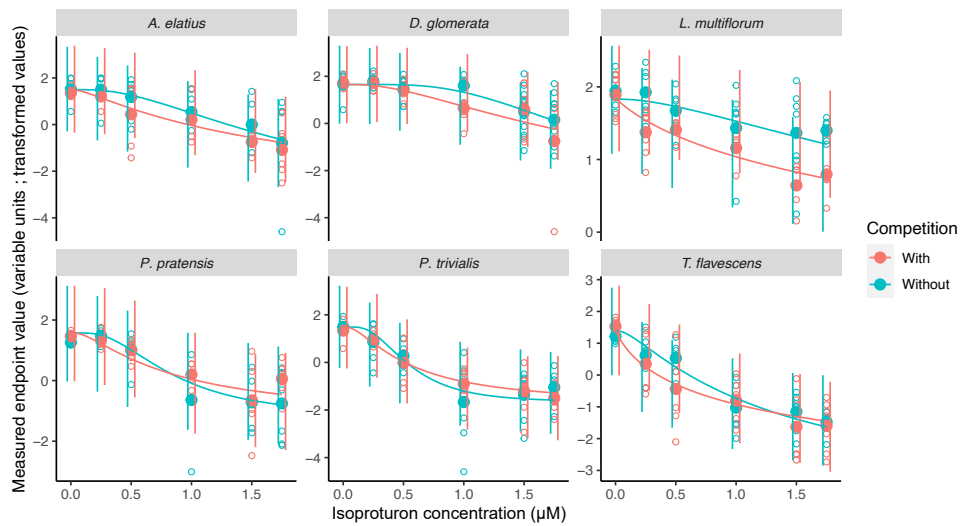


Figure S5: Concentration-response curves produced using parameters of the model built for the ligula height endpoint.

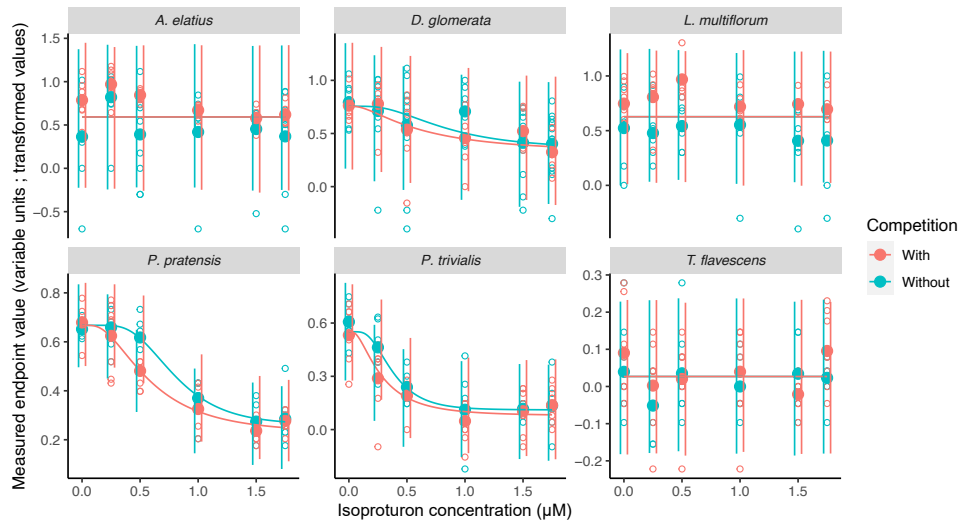


Figure S6: Concentration-response curves produced using parameters of the model built for the maximum shoot height endpoint.

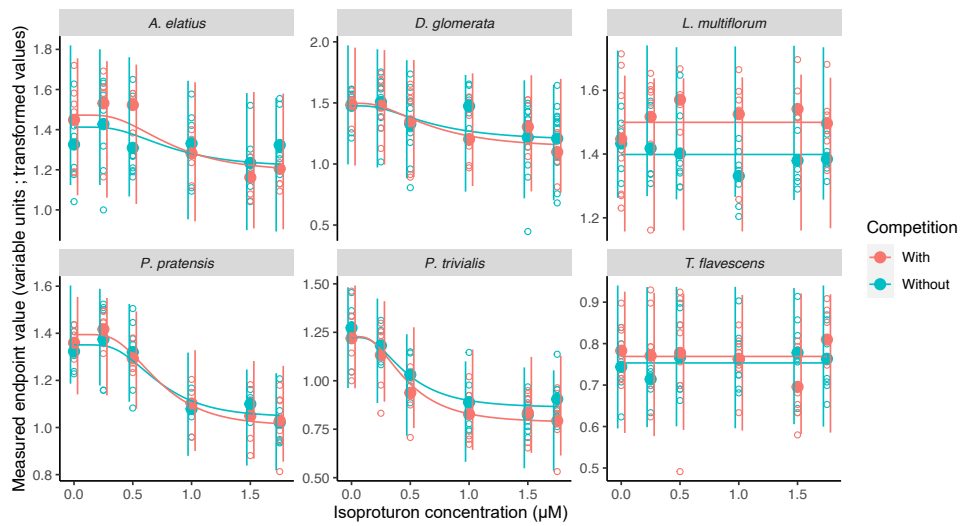


Figure S7: Concentration-response curves produced using parameters of the model built for the LDMC endpoint.

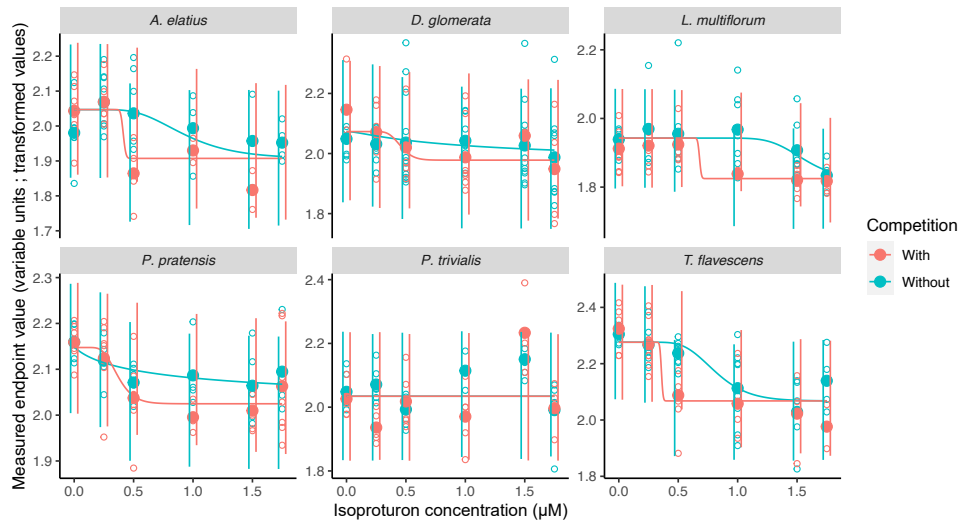


Figure S8: Concentration-response curves produced using parameters of the model built for the root length endpoint.

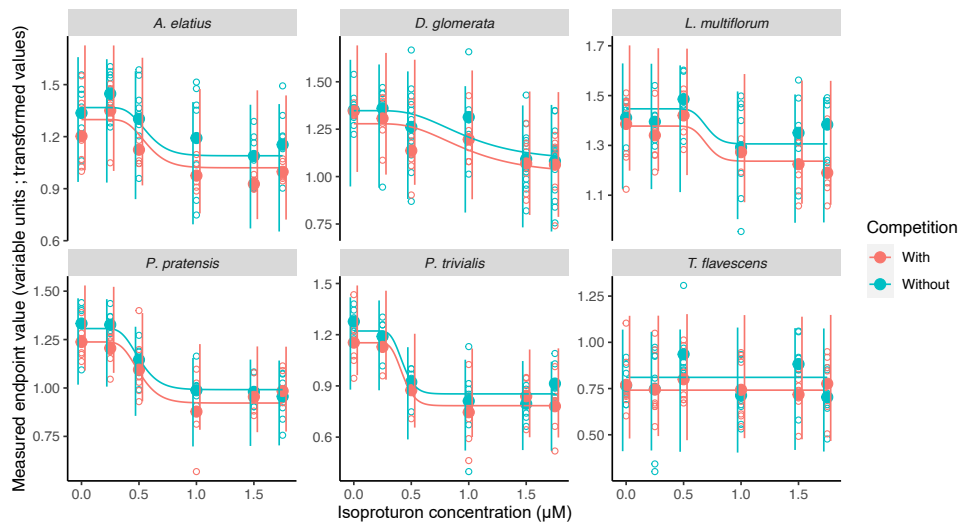


Figure S9: Concentration-response curves produced using parameters of the model built for the shoot DM endpoint.

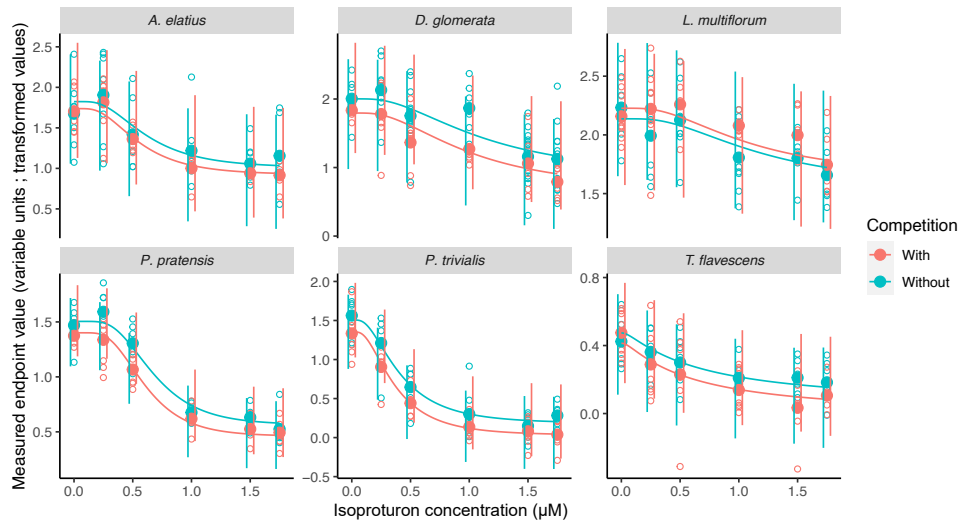
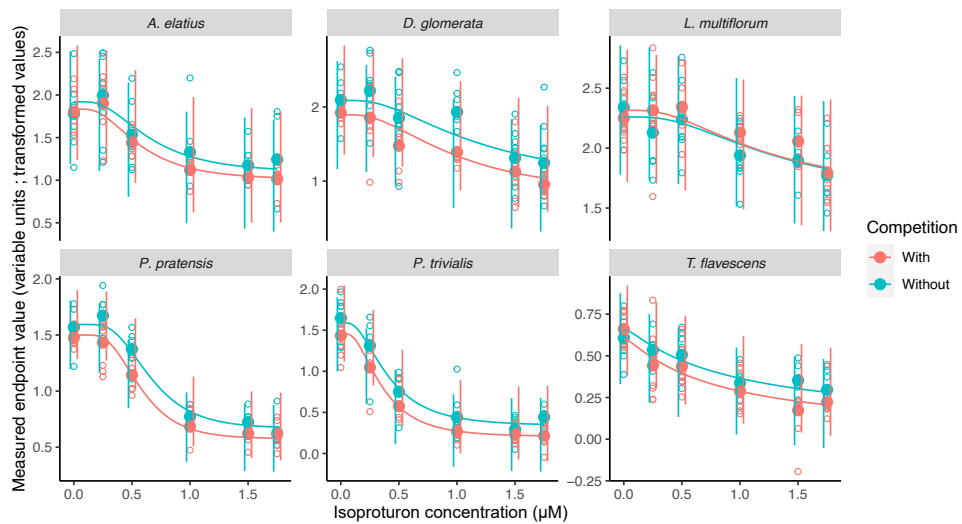


Figure S10: Concentration-response curves produced using parameters of the model built for the total DM endpoint.



Résumé en français

Les activités humaines ont de nombreux effets sur les écosystèmes. Elles peuvent se traduire par exemple par le déversement ou la fuite de contaminants dans les écosystèmes, comme lors de l'épandage de pesticides dans une zone agricole. L'évaluation du risque environnemental permet de caractériser et de quantifier ces effets afin de les maintenir à un niveau considéré acceptable. Cette évaluation se fait le plus souvent à partir de bioessais monospécifiques, mais les relations concentration-réponse ainsi décrites peuvent ensuite être intégrées au sein d'une distribution de sensibilité des espèces (ou SSD pour *Species Sensitivity Distribution*). Ces SSD, largement utilisées en évaluation du risque environnemental, permettent alors de définir une concentration n'ayant d'effets que sur une petite fraction des espèces présentes dans un écosystème (le plus souvent 5% donnant ainsi des concentrations dangereuses pour 5% des espèces). L'un des problèmes importants de ce type d'approches reste cependant une représentativité environnementale encore limitée. En effet, les bioessais monospécifiques fournissant l'information de base pour produire ces SSD sont le plus souvent réalisés dans des conditions non réalistes (organismes isolés et donc non soumis aux interactions biotiques, conditions expérimentales éloignées de la réalité environnementale, obtention d'une valeur de sensibilité unique pour une espèce alors que cette sensibilité peut être variable d'une population à l'autre...). Ce manque de réalisme est compensé par l'application d'un facteur de sécurité venant diviser la valeur finale par une valeur d'autant plus grande que l'estimation réalisée est éloignée de la réalité environnementale, donnant ainsi des valeurs d'autant plus basses et donc considérées plus protectrices.

Les travaux présentés ici ont cherché à intégrer (i) l'effet de la variabilité intraspécifique sur les paramètres des courbes SSD, et notamment la concentration dangereuse pour 5% des espèces et (ii) l'effet combiné d'un herbicide et de la compétition interspécifique sur les communautés végétales des bandes enherbées, en adoptant plusieurs démarches de modélisation, à chaque étape du processus d'analyse de données. Les résultats mettent en évidence l'importance d'intégrer toute cette complexité biologique dans les démarches d'évaluation du risque environnemental, ainsi que le risque de sous-estimation des facteurs de sécurité généralement appliqués sur les résultats issus d'une modélisation SSD.

Résumé en anglais

Human activities have numerous effects on ecosystems. They can for example result in spillage or leakage of contaminants in ecosystems as during spreading of pesticides in agricultural lands. Environmental risk assessment allows to characterize those effects to maintain them at a level considered acceptable. This assessment is usually based on monospecific bioassays, but concentration-response relationships thus described can then be included in Species Sensitivity Distributions (SSD). Those SSD, widely used in environmental risk assessment, then allows to define a concentration that only have an effect on a small fraction of the species found in an ecosystem (usually 5%, leading to hazardous concentrations for 5% of species). One of the most important problems of this kind of approaches is that it still lacks environmental relevance. Monospecific bioassays indeed providing the information to model SSD are usually realised in non realist conditions (organisms isolated and thus not subject to biotic interactions, experimental conditions far from environmental reality, obtention of a unique sensitivity value for a species whereas this sensibility can be variable from one population to another...). This lack of realism is compensated by the application of an assessment factor which divides the final value by a value that increases as the realised estimation is distant from environmental reality, thus giving lower values that are considered more protectives.

The work presented here sought to integrate (i) the effect of intraspecific variability on SSD curves parameters, in particular on hazardous concentrations for 5% of species and (ii) the combined effect of an herbicide and interspecific competition on the vegetal communities that are grass stripes following several modeling approaches for each data processing step. Results show the importance of the integration of all this biological complexity in environmental risk assessment procedures as well as the risk of underestimation of assessment factors usually applied on results from SSD modeling.