



**HAL**  
open science

# La modélisation pour comprendre les mécanismes d'effet de stress environnementaux

Elise Billoir

► **To cite this version:**

Elise Billoir. La modélisation pour comprendre les mécanismes d'effet de stress environnementaux. Biodiversité et Ecologie. Université de Lorraine, 2023. tel-04353166

**HAL Id: tel-04353166**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-04353166v1>**

Submitted on 19 Dec 2023

**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.



Mémoire d'Habilitation à Diriger des Recherches

Spécialité : "Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes"

# La modélisation pour comprendre les mécanismes d'effet de stress environnementaux

Elise Billoir

UMR 7360 Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux

Université de Lorraine, UFR Sciences Fondamentales et Appliquées

Campus Bridoux, 8 rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

Soutenance prévue le 7 décembre 2023 devant la commission d'examen formée de :

M. Rémy Beaudouin, Chercheur HDR Ineris, Verneuil-en-Halatte	Rapporteur
M. Arnaud Chaumot, DR INRAe, UR RiverLy, Villeurbanne	Rapporteur
Mme Claudia Wiegand, PR, Ecobio, Université de Rennes	Rapporteuse
Mme Aurélie Cébron, DR CNRS, LIEC, Université de Lorraine	Examinatrice
M. Simon Devin, PR, LIEC, Université de Lorraine	Parrain scientifique







## Remerciements

Les remerciements sont la partie la plus importante de cette HDR, tant je suis redevable à mes brillants collègues.

Tout d'abord, je remercie le LIEC et ses équipes de direction successives, pour leur accueil dans ce nouvel environnement et leur confiance dans ma capacité à m'y intégrer et m'y épanouir.

Je remercie les membres du jury : Rémy Beaudouin, Arnaud Chaumot, Claudia Wiegand et Aurélie Cébron, d'avoir accepté d'en faire partie, en espérant que la lecture de ce document leur sera profitable.

Je remercie Simon Devin, à plus d'un titre : parrain de mon HDR, responsable d'équipe, directeur HDR de mon 1<sup>er</sup> doctorant, directeur HDR (pour l'instant) de mon 3<sup>ème</sup> doctorant, co-biostatisticien du LIEC. Merci pour tous les échanges et services rendus, toujours avec humour, recul et pertinence.

Je remercie Philippe Usseglio-Polatera (aka PUP), pour sa disponibilité sans faille, son calme contagieux et sa générosité, tant dans le partage de ses légendaires connaissances que pour payer un coup. Quand on passe le voir, on ne sait jamais quand va se terminer la discussion mais, ce qui est certain, c'est qu'on va passer un bon moment et apprendre plein de choses.

Je remercie Marie Laure Delignette-Muller, dont les compétences en biostatistique n'ont d'égal que sa gentillesse. Exigeante, juste, pédagogue : Marie Laure est LA référence en biostatistique. Ma référence, en tout cas. C'est une grande chance de travailler avec quelqu'un d'aussi efficace... et fortiche !

Je remercie Frédéric Alonzo, que je connais depuis mes tout débuts dans la recherche. Nous collaborons régulièrement, et j'admire ses capacités scientifiques. Expérimentation, modélisation, programmation, rien ne lui résiste. Je vais finir par ne plus rien avoir à lui apporter, mais c'est toujours un plaisir d'échanger.

Je remercie Vincent Felten : que ce soit au bureau, au labo, ou sur le terrain, son enthousiasme et son altruisme ne le quittent jamais. Je suis ravie de l'avoir embarqué dans le projet Chroco : les nuits blanches à surveiller les daphnies (et à feinter l'alarme) resteront dans les annales.

Je remercie Martin Laviale, co-cuculotin, de souvent passer nourrir mon chat ;) Merci pour tous nos échanges en général, et, en particulier, de m'avoir embarquée dans les collaborations avec les toulousaines du LEFE. Les microorganismes sont vraiment de chouettes modèles pour étudier les communautés expérimentalement !

Je remercie Florence Maunoury-Danger, pour toute sa sympathie depuis mon arrivée au LIEC, et ses beaux projets qui m'ont permis de découvrir l'écologie terrestre. Malheureusement, les tentatives DEB-diplopoies ne sont pas dans cette HDR, mais les missions d'échantillonnage de feuilles mortes avaient d'autres vertus.

Je remercie Michaël Danger, co-bureau, directeur de ma 2<sup>ème</sup> doctorante, pour la compagnie les jours ouvrables, professionnelle ou amicale, sans propriété intellectuelle ni frais de gestion. Ses idées et ses encouragements ont une très bonne influence sur moi. A ses côtés, je m'imprègne petit à petit d'écologie fonctionnelle, mais je crains qu'il ne progresse plus vite en statistiques.

Un merci particulier à Florence et Michaël pour l'incroyable aventure du congrès SFE<sup>2</sup>-GfÖ-EEF de 2022.

Je remercie Sophie Prud'homme pour toutes les idées partagées depuis son arrivée au LIEC : je pense pouvoir dire que nous nous sommes bien trouvées, avec des points de vue remarquablement complémentaires. Merci pour tout le travail engagé dans le cadre de Chroco, et autour de DRomics. Le meilleur reste à venir.

Je remercie Delphine Aran, pour son amitié tout simplement.

Je remercie tous les membres de l'équipe Ecologie du stress, en particulier Elisabeth Gross, qui en acceptant de suppléer à sa direction (en attendant mon HDR), a permis le démarrage de mon 4<sup>ème</sup> doctorant.

Je remercie Cécile Sulmon (Ecobio, Rennes) de m'avoir invitée à prendre part à ses projets. Notre première expérience de collaboration était très enrichissante et fructueuse, je suis ravie de poursuivre avec elle sur de nouvelles perspectives.

Je remercie Mechthild Schmitt-Jansen (UFZ, Leipzig, Allemagne) pour tous les échanges, l'accueil à Leipzig, et les encouragements dans le développement de DRomics et Floriane Larras pour tout le travail réalisé.

Je remercie les équipes des projets DEB-RAD (Frédéric à nouveau, mais aussi Marie Trijau et Antoine Alonzo), EndoMix (Aurélié à nouveau, mais aussi Lilian Gréau, Nicolas Gallois, Marie Le Jean, etc.) et DROMADERE/DRomics, en particulier Aurélié Siberchicot pour l'incalculable plus-value qu'elle apporte à DRomics en gérant les aspects informatiques, et Philippe Veber pour ses brillantes démonstrations.

Mes remerciements les plus sincères aux doctorants et postdoctorants, forces vives de la recherche.

Je commence par les postdoctorants avec qui j'ai travaillé dès mon arrivée au LIEC : Floriane Larras, Romain Coulaud, Albin Meyer, la belle équipe ! Et les suivants aussi : Olivier Dézérald, Benjamin Alric, Cédric Mondy (Philippe sait décidément bien choisir ses postdocs). Merci pour les innombrables réunions PUPettes, j'ai été impressionnée par vos capacités conceptuelles, techniques et rédactionnelles.

Je poursuis avec les doctorants que j'ai co-dirigés : merci à Vincent Baillard (1<sup>er</sup> doctorant, ce n'est pas rien), et Miriam Beck (2<sup>ème</sup> doctorante, plus rapide que son ombre). Ils ont produit de très beaux travaux que je suis fière de présenter ici. Je remercie également les doctorants que j'encadre actuellement : Jérémie Ohanessian (3<sup>ème</sup> doctorant), qui organise les manips de mains de maître, et Ellis Franklin (4<sup>ème</sup> doctorant), les galères administratives en valaient la peine ! Je suis enthousiasmée par les années à venir à leurs côtés.

Je remercie également tous les M2 et autres stagiaires que j'ai supervisés, certains apparaissent dans cette HDR.

Je n'oublie pas de remercier les personnels de soutien à la recherche, que ce soit les gestionnaires du LIEC, ou les techniciens et ingénieurs des Pôles.

Enfin, je remercie tous mes amis et toute ma famille, ma mère pour la relecture, Ulysse, Swann et Robinson pour leur joie de vivre, et Philippe, pour sa drôlerie quasi-constante.







## Table des matières

1	Présentation de la candidate .....	11
1.1	Activités pédagogiques .....	13
1.2	Activités de recherche et d'encadrement .....	16
1.3	Production scientifique .....	23
2	Introduction.....	35
2.1	Contexte.....	35
2.2	Eléments de vocabulaire des modèles.....	38
2.3	Présentation de quelques modèles de l'écologie et de l'écotoxicologie .....	39
3	Modélisation en écologie stœchiométrique des communautés.....	47
3.1	Contexte.....	47
3.2	Analyse d'un suivi de long terme (34 ans) sur un site de la Loire.....	48
3.3	Etude à large échelle spatiale en France métropolitaine .....	56
3.4	Bilan et perspectives .....	62
4	Modélisation en écotoxicologie des populations et des communautés .....	65
4.1	Contexte.....	65
4.2	Importance de la prise en compte d'interactions biotiques en évaluation des risques .....	66
4.3	Comment la compétition modifie-t-elle la réponse des plantes au stress chimique ? .....	77
4.4	Bilan et perspectives .....	85
5	Modélisation dose-réponse de données omiques .....	87
5.1	Contexte.....	87
5.2	Développement de DRomics .....	88
5.3	Réponse fonctionnelle de la microalgue <i>Scenedesmus vacuolatus</i> exposée au triclosan.....	97
5.4	Réponse de biofilms aquatiques au diuron et tolérance induite par une pré-exposition .....	106
5.5	Bilan et perspectives .....	113
6	Modélisation mécaniste en écotoxicologie transgénérationnelle .....	117
6.1	Contexte.....	117
6.2	Couplage de modèles TK-TD et de modèles de dynamique de population .....	119
6.3	Modèles DEBtox avec transmission de dommages transgénérationnels .....	128
6.4	Bilan et perspectives .....	137
7	Discussion générale.....	139
8	Projet.....	143



# 1 Présentation de la candidate

## Etat civil

**Elise Billoir** née le 26 Janvier 1983 aux Lilas (93), mariée, 3 enfants (2017, 2018, 2021). Nationalité française.

## Coordonnées professionnelles

Equipe Ecologie du Stress Environnemental (**EcoSE**)

Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (**LIEC**), UMR CNRS 7360

Campus Bridoux

Rue Claude Bernard

57070 Metz

[elise.billoir@univ-lorraine.fr](mailto:elise.billoir@univ-lorraine.fr)

<https://cv.archives-ouvertes.fr/elisebilloir?langChosen=fr>

## Etudes et diplômes

**2005-2008 : Doctorat de Biométrie** Université Claude Bernard (Lyon 1), Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive (LBBE, UMR CNRS 5558)

Titre : *Modélisation dynamique et inférence Bayésienne pour l'analyse de données écotoxicologiques*

Soutenue et obtenue le 26 septembre 2008 à Lyon, devant le Jury constitué de :

Sandrine Charles	Université Lyon 1	Directrice
Jean-François Féraud	Université de Metz	Rapporteur
Patrick Flammarion	ONEMA	Examineur
Pierre Joly	Université Lyon 1	Président du Jury
Eric Parent	ENGREF AgroParisTech	Rapporteur
Alexandre Péry	INERIS	Co-directeur

**2004-2005 : Master Recherche Approches Mathématiques et Informatiques du Vivant**, Université Lyon 1  
Parcours Méthodes en Epidémiologie et Recherche Clinique, mention TB

**2000-2005 : Coursus ingénieur de l'INSA de Lyon**, filière BioInformatique et Modélisation, INSA de Lyon

**2000 : Baccalauréat, Série S**, obtenu avec mention Bien, Lycée de Montgeron (91)

## Situation actuelle

Depuis Sept. 2014 : **Maître de Conférence à l'université de Lorraine**, LIEC UMR CNRS 7360

## Expérience professionnelle antérieure

**Nov. 2011-Mai 2014 : Ingénieur Biostatistiques et Modélisation**

**Plateforme de Recherche de Rovaltain** en Toxicologie environnementale et Ecotoxicologie

**Oct. 2009-Oct. 2011 : Postdoc** *Analyse quantitative des risques écotoxicologiques*, Université Lyon 1, LBBE

- développement de collaborations nationales et internationales

- 5 mois à l'Université de Melbourne (Australie) en tant que Visiting Scientist

- encadrement d'un stagiaire de M2

**Oct. 2008-Sep. 2009 : Postdoc** *Modélisation probabiliste en risque alimentaire*, INRA Jouy-en-Josas, MIA

**Oct. 2005-Sep. 2008 : Allocataire de recherche MENRT**, LBBE (UMR CNRS 5558), Ecole Doctorale E<sub>2</sub>M<sub>2</sub>, Université Lyon 1

**Oct. 2005-Sep. 2008 : Moniteur du CIES de Lyon**, Département de Biologie, Université Lyon 1

**2005-2014 : Enseignements de biostatistiques** (~300h au total) aux Universités Lyon 1, Grenoble 1 et de Lorraine, et en écoles d'ingénieurs INSA Lyon et AgroParisTech (Engref, site de Paris).

## Activités pédagogiques

Présentées en page 13

- Enseignements en biostatistiques, modélisation, logiciel R, dynamique des populations, du L2 au M2

- Module doctoral « Utilisation de R en biostatistiques »

## Activités d'encadrement et de recherche

Présentées en page 16

- En cours : 2 doctorants

- Passés : 2 doctorants, 2 post-doctorants, 8 stagiaires de M2

## Production scientifique

Liste complète des publications présentée en page 23

- 41 articles dans des revues internationales (dont 8 en premier auteur, 10 en deuxième et 6 en dernier auteur)

- 1 chapitre d'ouvrage

- Plus de 50 communications en congrès international, 14 en congrès national, 3 séminaires sur invitation

## 1.1 Activités pédagogiques

Lors de mon recrutement en 2014, je ne connaissais que très peu l'équipe pédagogique de l'UFR SciFA (Sciences Fondamentales et Appliquées) et je n'étais pas familière du contenu des formations. J'ai été recrutée pour apporter des compétences nouvelles (biostatistique et modélisation), que mes collègues m'ont aidée à intégrer progressivement aux formations. J'enseigne principalement la biostatistique, la modélisation, la pratique du logiciel R, la dynamique des populations et les bases de données. De par mon profil à l'interface biologie/mathématiques/statistique/informatique, ma démarche pédagogique est intrinsèquement interdisciplinaire. Les exemples/exercices d'application des méthodes enseignées sont toujours choisis dans le domaine des sciences de la vie et de l'environnement.

Depuis mon recrutement, j'ai assuré mon service d'enseignement statutaire (196 heures) (Tableau 1) sans beaucoup d'heures supplémentaires, incompatibles avec les décharges CRCT et les décharges pour congé maternité.

*Tableau 1 - Nombre d'heures d'enseignement par année universitaire depuis mon recrutement en tant que MCF. Ref signifie heures de référentiel.*

Année	Décharge	h eq. TD Total	h eq. TD Licence	h eq. TD Master	h eq. TD Module Doc/FC
2022-2023	-	211	69	116	26
2021-2022	3 <sup>ème</sup> Congé mat : 156 h	39 (+ 6 Ref.)	-	13	26
2020-2021	Report CRCT Covid : 36 h	153 (+ 8 Ref.)	59	64	30
2019-2020	CRCT : 96 h	96	37	33	26
2018-2019	Congé mat : 96 h	107.5	50.5	31	26
2017-2018	Congé mat : 96 h	102	32	43	27
2016-2017	-	199	96	83	20
2015-2016	-	222.5	143	63.5	16
2014-2015	-	202	155	47	-

### UE enseignées

Les heures d'enseignement que j'ai effectuées durant les années 2014-2015 à 2022-2023 en tant que MCF ont évolué au fil des années et des maquettes successives. A titre d'exemple, les enseignements de 2022-2023 sont synthétisés dans le Tableau 2. Ils sont majoritairement dispensés dans les filières de Biologie de l'UFR SciFA : licence SV (Sciences de la Vie), master GESTE (Gestion de l'Environnement) dans les parcours ETOX (Ecotoxicologie) et GEMAREC (Gestion des Milieux Aquatiques, Restauration et Conservation) et dans le cadre d'un module de formation de l'école doctorale SIRENa (Sciences et Ingénierie des Ressources Naturelles).

J'encadre ou je tutore également des TER (Travail d'Etude et de Recherche) et des stages aux niveaux L3, M1 et M2. Je participe également à des jurys de soutenance de stages M1 et M2 chaque année.

Tableau 2 - Enseignements en 2022-2023.

Filière	Intitulé de l'UE/EC	h CM	h TD (*nb gpes)	h TP (*nb gpes)	Total h eq. TD
L2 SV	Biostatistiques	2	2 (*3)		9
L3 SV	Dynamique des populations	8	4 (*1)	3 (*2)	22
M1 GESTE	Biostatistiques	4	1 (*2)	2 (*3)	14
M2 GESTE ETOX	Modélisation	15		6	28,5
M2 GESTE	Outils biblio et stats	5		20 (*2)	47,5
M2 GESTE GEMAREC	Diagnostic écologique des milieux aquatiques		1	8	9
L3 SV	Ressources internet	2		8 (*4)	35
M1 GESTE	Base de données	6	2 (*2)		13
Ecole Doc. SIRENa	Biostatistiques avec R	12	8		26

### Rédaction de documents pédagogiques et montage de nouveaux travaux pratiques

Mon service d'enseignement m'a conduit à préparer de nombreux documents pédagogiques (total d'un millier de diapositives pour les CM), et à monter de nouveaux travaux pratiques. Je prendrai ci-après quelques exemples pour décrire ces activités.

Pour l'UE de « Dynamique des Populations » de L3, j'ai préparé l'ensemble des documents pédagogiques pour le contenu des 8h de CM, 4h de TD et 3h de TP dispensé à chaque étudiant, soit environ 200 diapositives, 2 fiches d'exercices et une fiche de TP. J'ai pour cela effectué un travail de synthèse de plusieurs ouvrages.

Pour l'UE de « Biostatistiques » de M1, j'ai également préparé une centaine de diapositives afin d'aborder avec les étudiants des méthodes statistiques avancées (modèle mixte), qui n'étaient pas enseignées jusqu'alors. De même, pour les M2, dans le cadre de l'UE « Outils biblio et stat » j'ai préparé 3h de CM et 3h de TP sur les méthodes d'analyse multivariée.

Pour l'UE de « Modélisation en écotoxicologie » des M2, le sujet correspondant exactement à ma spécialité de recherche, j'ai conçu une partie des CM en visant à présenter l'état de l'art dans le domaine, afin que les étudiants aient une vision globale des possibilités de la modélisation appliquée en écotoxicologie. Une autre partie des CM s'est focalisée sur l'approfondissement d'approches spécifiques (modèles dose-réponse, modèles de toxicocinétique, etc.), avec des TP associés basés sur des exemples réels issus de mes travaux de recherche, afin de mettre en pratique les méthodes présentées en cours, et ce au moyen d'un outil moderne : le logiciel R. En Master, les étudiants proviennent de parcours variés et ont des expériences préalables hétérogènes, notamment quant à la pratique du logiciel R. J'ai donc également créé une série de 17h de TP pour une initiation à l'utilisation de R. Ces TP ont intégré l'UE « Outils biblio et stat » à partir de 2017.

### Module Doctoral et Formation Continue

J'ai monté un module doctoral et une formation continue « Biostatistiques avec le logiciel R » mettant à profit mon expertise dans le maniement du langage R. Ces formations permettent l'apprentissage de cet outil en plein essor, avec des exemples d'applications conçus à destination d'un public d'écologues, de biologistes et d'écotoxicologues.

### Responsabilités pédagogiques

Je suis responsable de 3 UE en L3, M1 et M2 :

- « Ressources internet » tronc commun L3 SV, environ 70 étudiants, depuis 2015
- « Bases de données » tronc commun M1 GESTE, environ 50 étudiants, depuis 2015
- « Modélisation en écotoxicologie » M2 parcours ETOX, environ 15 étudiants, depuis 2018

Je suis également responsable d'un module de formation de l'école doctorale SIRENa intitulé « Utilisation de R en biostatistique ». Je l'ai créé en 2016 et une session a eu lieu tous les ans depuis (sauf en 2017 pour cause de congé maternité). J'en suis la principale intervenante, parfois accompagnée de postdocs vacataires. Selon les étudiants inscrits, ce module est dispensé soit en français soit en anglais.

### Nouvelle maquette

Avec mes collègues du LIEC, nous préparons actuellement la prochaine maquette (2024-2029), qui est l'opportunité de faire évoluer nos pratiques. Au niveau L2, nous travaillons avec les collègues écologues à la création d'un enseignement en « Ecologie et biostatistique », qui intègre à la fois la planification expérimentale, la récolte des données, leur analyse et l'interprétation. Nous espérons ainsi mieux convaincre, dès ce niveau L2, de la nécessité des mathématiques et de la statistique pour les études en biologie et en écologie. Au niveau M2 ETOX, nous travaillons à la construction d'une nouvelle UE « Ecotoxicologie approfondie » afin de développer certaines notions transversales, de présenter des concepts communément utilisés dans la bibliographie du domaine, par exemple l'*Adverse Outcome Pathway*, les *Points of Departure/Benchmark Doses*, ou d'aborder les effets à long terme et à large échelle.



## 1.2 Activités de recherche et d'encadrement

### Activités d'encadrement

Total : 4 doctorants, 2 post-doctorants, 8 stagiaires de Master 2 ou DESU

#### **Encadrements en cours**

- Jérémie Ohanessian, **Doctorant**, (2022-2025) :

*Chronologie des effets et des réactions chez Daphnia magna exposée à un phtalate : de la modification de l'expression des gènes aux répercussions sur les traits d'histoire de vie des organismes.*

Co-encadrement avec Sophie Prud'homme (Co-direction), Vincent Felten et Simon Devin (Direction).

Financement : projet ANR JCJC Chroco

- Ellis Franklin, **Doctorant**, (2023-2026) :

*Outil d'analyse et clés d'interprétation toxicologique de réponses transcriptomiques temps-dose dépendantes : conception à partir de l'effet du di-n-butyl phtalate sur Daphnia magna et Danio rerio.*

Co-encadrement avec Elisabeth Gross (Direction), Sophie Prud'homme et Marie Laure Delignette-Muller (Co-direction).

Financement : ½ projet ANR JCJC Chroco, ½ bourse de thèse VetAgro Sup

#### **Encadrements passés**

- Miriam Beck, **Doctorante**, (2018-2021, thèse soutenue et obtenue le 06/12/2021) :

*Les traits stœchiométriques pour prédire les réponses des communautés aquatiques aux changements globaux*

Co-direction avec Michaël Danger (Direction)

Financement : Bourse LUE (Lorraine Université d'Excellence)

Production : 4 articles publiés en 2021, 2022, 2023 et 2023, 1 article à soumettre

Devenir : Postdoctorante au Laboratoire d'Océanographie de Villefranche-sur-Mer (LOV)

- Albin Meyer, **Post-doctorant**, (2018-2019) :

*Incertitude associée à l'évaluation de la qualité écologique des cours d'eau sur la base du compartiment macro-invertébrés.*

Co-supervision avec Philippe Usseglio-Polatera

Financement : Convention OFB-LIEC

Production : 1 article publié en 2022, 1 article soumis

Devenir : Postdoctorant à INRAe Bordeaux

- Vincent Baillard, **Doctorant**, (2017-2020, thèse soutenue et obtenue le 13/01/2021) :

*Modélisation de la variabilité de sensibilité des espèces pour la protection des communautés*

Co-direction avec Simon Devin (Direction)

Financement : ½ Bourse ministérielle et ½ Bourse région Lorraine

Bourses : bourse de mobilité du GDR Ecostat pour des séjours à Lyon en 2018 (supervision : Marie Laure Delignette-Muller, VetAgroSup Lyon), bourse universitaire de mobilité des doctorants (dispositif DREAM UL) pour un séjour de deux mois en Allemagne en 2019 (supervision : Floriane Larras et Mechthild Schmitt-Jansen, UFZ Leipzig)

Production : 4 articles publiés en 2018, 2020, 2021 et 2023

Devenir : Ingénieur analyse de données, Compagnie Nationale du Rhône

- Floriane Larras, **Post-doctorante**, (2016-2018) :

*Integrating molecular-based structural and functional microbial community responses in a new tool for environmental risk assessment of chemicals (MicroERA)*

Co-supervision avec Mechthild Schmitt-Jansen (UFZ Leipzig) et Marie Laure Delignette-Muller (VetAgroSup Lyon)

Financement : Bourse Marie Curie (MicroERA project, H2020-MSCA-IF-2015, Grant number: 705149)

Production : 3 articles publiés en 2018, 2020 et 2023, 1 article à soumettre

Devenir : Consultant & Ecotoxicologist, KREATiS

### **Encadrements de stagiaires**

- Titouan Dionet, stage de 6 mois niveau **M2** (2023). Intégration de la stœchiométrie dans la modélisation de la dynamique de population de *Gammarus fossarum* et conséquences sur la disponibilité des ressources élémentaires. Co-encadrement à 33%, avec Michaël Danger 33% et Mehdi Cherif (INRAe Bordeaux) 33%.

- Ellis Franklin, stage de 6 mois niveau **M2** (2023). From dose-response modeling of transcriptomic data to biological interpretation: application to embryonic exposure of zebrafish to DBP. Co-encadrement à 33%, avec Marie Laure Delignette-Muller (LBBE) 33% et Sophie Prud'homme 33%.

- Jérémie Ohanessian, stage de 6 mois niveau **M2** (2022). Évaluation des impacts intergénérationnels du Di-n-butyl phtalate sur les traits d'histoire de vie de *Daphnia magna*. Co-encadrement à 33%, avec Vincent Felten 33% et Sophie Prud'homme 33%.

- Laurine Malardier, stage de 2 mois niveau **M1** (2019). Importance de la variabilité intraspécifique de la polluosensibilité pour les évaluations du risque écotoxicologique basées sur l'approche SSD (*Species Sensitivity Distribution*). Co-encadrement à 25%, avec Vincent Baillard 75%.

- Antoine Alonzo, stage de 6 mois niveau **DESU** (post-M2) (2016-2017). Modélisation des effets multigénérationnels de l'Américium-241 chez *Daphnia magna*. Co-encadrement à 50%, avec Frédéric Alonzo (IRSN) 50%.
  
- Mélissa Reichart, stage de 6 mois niveau **M2** (2016). Incertitude sur l'état écologique via le compartiment des invertébrés aquatiques. Co-encadrement à 50%, avec Philippe Usseglio-Polatera 50%.
  
- Adrien Le Navenant, stage de 6 mois niveau **M2** (2016). Impacts de la qualité de la litière sur le taux de consommation d'un détritivore modèle, le diplopode *Glomeris marginata*. Co-encadrement à 25%, avec Florence Maunoury-Danger 50% et Vincent Felten 25%.
  
- Rolland Allard, stage de 2 mois niveau **L3** (2016). Modélisation des effets directs et indirects de polluants sur un écosystème aquatique simplifié. Co-encadrement à 75%, avec Elisabeth Maria Gross 25%.
  
- Edwige Gautreau, stage de 6 mois niveau **M2** (2015). La taille et les guildes écologiques des diatomées permettent-elles d'identifier les pressions anthropiques en cours d'eau ? Co-encadrement à 25%, avec Floriane Larras 50% et Philippe Usseglio-Polatera 25%.
  
- Pierre-Albin Biron, stage de 6 mois niveau **M2** (2011). Effets multigénérationnels de l'uranium chez *Daphnia magna*. Co-encadrement à 50%, avec Frédéric Alonzo (IRSN) 50%.

#### Responsabilités, tâches collectives

##### **Portage de projets financés**

###### **- Projet ANR JCJC 2022-2026**

Chronology of coping with a toxic stress: from omic to apical responses (Chroco)

Participants : LIEC (porteur E. Billoir)

###### **- Projet EC2CO 2019-2020**

Développement sous R d'outils de modélisation pour l'analyse de données omiques en vue de l'évaluation du risque écotoxicologique (DROMADERE)

Participants : LIEC (porteur E. Billoir), LBBE, UFZ Leipzig

###### **- Projet Région Lorraine 2015-2016**

Incertitude sur l'évaluation de l'état écologique via le compartiment des invertébrés aquatiques dans un contexte européen : implications à l'échelle du réseau hydrographique régional

Participants : LIEC (porteur. E. Billoir)

## **Participation à la conception, la rédaction et la mise en œuvre de projets financés**

### **- projet ANR PRC 2023-2027**

Ecological and evolutionary consequences of pesticide exposome on multitrophic systems of agricultural landscape refuge areas (PESTITROPHIC)

Participants : ECOBIO (coordinatrice C. Sulmon), EPOC, LIEC, IGEPP, ECOGENO

### **- projet Ecophyto 2023-2025**

Exposome des réseaux trophiques plante-phytophage-ennemi naturel aux produits phytopharmaceutiques dans les paysages agricoles : effets cascades sur les organismes, les communautés d'espèces et le service de régulation des insectes phytophages (EXPOTROPHIQ)

Participants : ECOBIO (coordinatrice C. Sulmon), EPOC, LIEC, IGEPP, Chambre d'Agriculture de Bretagne

### **- projet EC2CO 2023**

Les contaminations résiduelles de pesticides dans les paysages agricoles : un facteur d'adaptation des organismes aux produits phytosanitaires ? (RESI-ADAPT)

Participants : ECOBIO (responsable C. Sulmon), EPOC, LIEC, IGEPP

### **- projet ANR PRC 2020-2024**

Role of plant-endophyte (bacteria and fungi) associations in polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation (EndoMix)

Participants : LIEC (coordinatrice A. Cébron), CEA Li2D, IBMP, INRA IAM

### **- projet EC2CO 2021-2022**

Résilience fonctionnelle de communautés microbiennes – vers la définition de patterns généraux pour des perturbations répétées (ReFMic)

Participants : EcoLab (responsable S. Boulêtreau), LIEC

### **- projet ANR JCJC 2018-2022**

Stoichiometric traits of microbial species and communities for predicting freshwater ecosystem responses to global changes (StoichioMic)

Participants : LIEC (porteur M. Danger), EcoLab

### **- projet LUE 2018-2021**

Stoichiometric traits as predictors of aquatic community and ecosystem responses to global changes (SPACE)

Participants : LIEC (porteur M. Danger)

### **- Convention OFB/CNRS/LIEC 2013-2016 puis 2016-2019**

Finalisation I2M2, Diagnostic multi-EQB et développement d'un indice pour les grands cours d'eau

Participants : LIEC (coordinateur P. Usseglio-Polatera)

**- projet Marie Curie Actions Individual Fellowships (H2020-MSCA-IF-2015) 2016-2018**

Ecological sensitivity distribution: integrating molecular-based structural and functional microbial community responses in a new tool for environmental risk assessment of chemicals (MicroERA)

Participants : porteur F. Larras, Host Institution : UFZ Leipzig (responsable M. Schmitt-Jansen), Second Attachment : LIEC (responsable E. Billoir)

**- projet NEEDS 2016-2017 puis 2017-2018**

Analyse bayésienne des effets transgénérationnels de l'uranium appauvri et des radiations ionisantes à l'aide du budget énergétique dynamique (DEB-RAD)

Participants : IRSN LECO (PRP-ENV / SERIS) (responsable F. Alonzo) et LIEC (responsable E. Billoir)

**- projet EC2CO 2017-2018**

Variabilité intraspécifique de la réponse des macrophytes aquatiques aux contaminations chimiques (VIRMA)

Participants : EcoLab (responsable A. Elger), LIEC, EDB, CESBIO, MIAT, ESFR

**- projet EC2CO 2017-2018**

Effets de la CONTamination du sol et des litières produites sur le BIOta du Sol (ECoBioS)

Participants : LIEC (responsable F. Maunoury-Danger), LSE, CEFE

**- projet EC2CO 2015-2016**

Ecologie expérimentale de la structuration des communautés végétales sous stress chimique

Participants : ECOBIO (responsable C. Sulmon), LEHNA, LIEC

**Participation à des jurys ou comités**

Membre du Comité Scientifique de l'Action Thématique DYCOVI de l'appel à projet EC2CO (à partir de septembre 2023)

Participation à un jury de recrutement de 3 Chargés de Recherche INRAE « Modélisation écophysiological et écotoxicologique » (2021)

Participation à un jury de recrutement de MCF section 67 « Analyse des données écologiques et statistiques spatiales » à l'IMBE de Marseille (2017)

Participation aux jurys de recrutement d'ATER « Biostatistiques » au LIEC (2020, 2021, 2022, 2023)

Participation à cinq jurys de thèses externes à l'UL en tant qu'examinateur (Delphine Plaire 2013, Florian Parisot 2015, Viviane David 2019, Aude Ratier 2019, Corentin Mit, 2023)

Participation à sept comités de pilotage de thèse depuis 2008 dont quatre en externe (Sandrine Massarin, Carole Forfait, Delphine Plaire, Laurent Mariani, Guillaume Kon Kam King, Vinita Vijayaraj, Ophélie Gestin)

## **Expertise**

Appréciation de sujets de thèse pour l'école doctorale ABIES (2015, 2019, 2023)

Appréciation de sujets de thèse pour l'IRSN (2021)

Rapports d'évaluation RIPEC pour l'Université de Lorraine (2022, 2023)

## **Participation à l'organisation de conférences**

Membre du comité d'organisation local et du comité scientifique

International Congress of Ecology and Evolution (SFE<sup>2</sup>-GfÖ-EEF joint congress)

"Ecology and Evolution: new perspectives and societal challenges"

21-25 Nov 2022, Metz, France

<https://sfe2gfomeeting.sciencesconf.org/>

Membre du comité scientifique

Colloque annuel de la SEFA

30 Juin – 1<sup>er</sup> juillet 2022, Metz, France

<https://sefa2022metz.event.univ-lorraine.fr>

## **Autres responsabilités collectives**

Co-organisation (en tant que co-présidente, avec David Fox et Wayne Landis) d'une session scientifique (Advanced Statistical Methods in ecotoxicology) lors du congrès SETAC World 2012 (Berlin, Allemagne).

Co-organisation (en tant que co-instructeur, avec David Fox) d'un short course (Bayesian statistical methods in ecotoxicology) d'une journée au congrès SETAC Europe 2011 (Milan, Italie).

Responsabilité d'organisation (en tant qu'instructeur principal, avec Sandrine Charles et Marie Laure Delignette-Muller) d'une nouvelle version de ce short course (Bayesian statistical methods in ecotoxicology) aux congrès SETAC World 2012 (Berlin, Allemagne) et SETAC Europe 2013 (Glasgow, Ecosse).

Co-instructeur à l'école d'été "Ecotoxicology and predictive modelling (PREDITOX)", labellisée SETAC et CNRS, Lyon 2014.

Co-instructeur lors du short course international, « Statistical methods in ecotoxicology using R » (organisé par Christian Ritz), au congrès SETAC Europe 2016 (Nantes, France).

Présidente de jury de Baccalauréat en 2018.

Responsable d'UEs aux niveaux L3, M1 et M2.

Conception et responsabilité d'un module doctoral, « Utilisation de R en biostatistiques », créé en 2016 et reconduit tous les ans depuis. Également sous forme de formation continue proposée au catalogue de l'Université de Lorraine. Première session en novembre 2016.

Conception et organisation de sessions de formation à l'utilisation de DRomics, avec M. L. Delignette-Muller. Depuis 2020 nous avons dispensé 8 séances de formation dont 2 en anglais, sous l'égide de la Fondation Rovaltain, de H2O'Lyon ou en marge des congrès SEFA (2021, 2022, 2023).

### 1.3 Production scientifique

#### Liste de publications scientifiques soumises ou en préparation (doc/postdocs encadrés/aidés)

F. Alonzo, M. Trijau, D. plaire, **E. Billoir**. A toxicokinetic–toxicodynamic model with a transgenerational damage to explain toxicity changes over generations (in *Daphnia magna* exposed to depleted uranium) Soumis à *Science of the Total Environment*.

M. Beck ... Effects of stream water nutrient concentrations on macroinvertebrate community stoichiometry: a large-scale study.

F. Larras, S. Lips, P. Veber, S. Schreiber, **E. Billoir**, M.L. Delignette-Muller, M. Schmitt-Jansen. Meta-transcriptomics reveals stress adaptation processes in microbial communities differing in exposure history.

A. Meyer, **E. Billoir**, V. Archaimbault, C. P. Mondy, P. Usseglio-Polatera. A certain uncertainty: evaluating the effect of index construction methodology and inter-operator variability on invertebrate-based stream ecological assessment.

L. Gréau, D. Blaudez, M. Le Jean, T. Beguiristain, **E. Billoir**, C. Paysan-Payoux, E. Delannoy, A. Cébron. Concentration-dependent transcriptomic response of poplar to phenanthrene.

C. Courcoul, S. Boulêtreau, J. Ferriol, V. Baillard, M. Laviale, **E. Billoir**, J. Leflaive. The time-dependency of interactions between successive disturbances is driven by the nature and intensity of events.

F. Maunoury-Danger, A. Le Navenant, D. Aran, Q. Bachelet, **E. Billoir**, A. Cébron, S. Coq, A. Janus, E. Marchand, J. Nahmani, V. Felten. Linking decomposer responses to soil and leaf litter metal contamination from physiological to ecosystem scales.

V. Baillard, A. Elger, E. Roubeau-Dumont, L. Malardier, S. Devin, **E. Billoir**. Impact of intergenotypic variability on Species Sensitivity Distributions - a simulation-based approach.

#### Liste de publications scientifiques dans des revues internationales (doc/postdocs encadrés/aidés)

[41] M.L. Delignette-Muller, A. Siberchicot, F. Larras, **E. Billoir**. DRomics, a workflow to exploit dose-response omics data in ecotoxicology. *PCI Journal*, 3, e90, doi:10.24072/pcjournal.325

[40] M. Rollin, R. Coulaud, B. Rocher, **E. Billoir**, O. Geffard, A. Dufлот, C. Fromont, C. Boulangé-Lecomte, F. Le Foll and B. Xuereb. Effects of chemical compounds on the activity of the N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase of the marine prawn, *Palaemon serratus*: screening in vitro. 2023. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 42(4), 846-858, doi:10.1002/etc.5567

[39] C. Courcoul, M. Laviale, V. Baillard, **E. Billoir**, J. Leflaive, S. Bouletreau. Disentangling the effects of microalgal diversity and thermal history on freshwater phototrophic biofilms facing heat stress: A thermal dose approach. 2023. *Journal of Ecology*, 111, 773-786, doi:10.1111/1365-2745.14058

[38] M. Beck, **E. Billoir**, M. Floury, P. Usseglio-Polatera, M. Danger. A 34-year survey under phosphorous decline and warming: Consequences on stoichiometry and functional trait composition of freshwater macroinvertebrate communities. 2023. *Science of the Total Environment*, 858, 159786, doi:10.1016/j.scitotenv.2022.159786



- [37] M. Beck, **E. Billoir**, V. Felten, A. Meyer, P. Usseglio-Polatera, M. Danger. Lessons from linking bio- and ecological traits to stoichiometric traits in stream macroinvertebrates. 2022. *Ecology & Evolution*, 12(12), e9605, doi:10.1002/ece3.9605
- [36] M. Seder-Colomina, A. Mangeret, P. Bauda, J. Brest, L. Stetten, P. Merrot, A. Julien, O. Diez, E. Barker, **E. Billoir**, P. Poupin, A. Thouvenot, C. Cazala, G. Morin. 2022. Influence of microorganisms on uranium release from mining-impacted lake sediments under various oxygenation conditions. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 24, 1830-1843, doi:10.1039/D2EM00104G
- [35] A. Meyer, B. Alric, O. Dézerald, **E. Billoir**, R. Coulaud, F. Larras, C. P. Mondy, P. Usseglio-Polatera. Linking micropollutants to trait syndromes across freshwater diatom, macroinvertebrate and fish assemblages. 2022. *Water*, 14(8), 1184, doi:10.3390/w14081184
- [34] M. Beck, **E. Billoir**, A. Meyer, F. Felten, P. Usseglio-Polatera and M. Danger. A database of West European headwater macroinvertebrate stoichiometric traits. 2022. *Global Ecology and Biogeography*, 31(1), 4-9, doi:10.1111/geb.13413
- [33] M. Beck, C. Mondy, M. Danger, **E. Billoir** and P. Usseglio-Polatera. Extending the Growth Rate Hypothesis to species development: Can stoichiometric traits help to explain the composition of macroinvertebrate communities? 2021. *Oikos*, 130(6), 879-892. doi: 10.1111/oik.08090
- [32] V. Baillard, M. L. Delignette-Muller, C. Sulmon, A.-K. Bittebière, C. Mony, I. Couée, G. Gouesbet, S. Devin and **E. Billoir**. How does interspecific competition modify the response of grass plants against herbicide treatment? A hierarchical concentration-response approach. 2021. *Science of the Total Environment*, 778, 146108. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.146108
- [31] B. Alric, O. Dezerald, A. Meyer, **E. Billoir**, R. Coulaud, F. Larras, C. Mondy and P. Usseglio-Polatera. How diatom-, invertebrate- and fish-based diagnostic tools can support the ecological assessment of rivers in a multi-pressure context: temporal trends over the past two decades in France. 2021. *Science of the Total Environment*, 762, 143915. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.143915
- [30] V. Baillard, C. Sulmon, A.-K. Bittebière, C. Mony, I. Couée, G. Gouesbet, M. L. Delignette-Muller, S. Devin and **E. Billoir**. Effect of interspecific competition on species sensitivity distribution models: analysis of plant responses to chemical stress. 2020. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 200, 110722. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.110722
- [29] F. Larras, **E. Billoir**, S. Scholz, M. Tarkka, T. Wubet, M. L. Delignette-Muller and M. Schmitt-Jansen. A multi-omics concentration-response framework uncovers novel understanding of triclosan effects in the chlorophyte *Scenedesmus vacuolatus*. 2020. *Journal of Hazardous Materials*. 397: 122727. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.122727
- [28] V. Felten, H. Toumi, J.F. Masfaraud, **E. Billoir**, B.I. Camara, J.F. Féraud. Microplastics enhance *Daphnia magna* sensitivity to the pyrethroid insecticide deltamethrin: effects on life history traits. 2020. *Science of the Total Environment*, 714, 136567. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.136567
- [27] K. Sanchez-Thirion, M. Danger, A. Bec, **E. Billoir**, S. Labaude, T. Rigaud, J.-N. Beisel and V. Felten. High food quality increases *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) infection by the acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis*. 2019. *International Journal for Parasitology*, 49(10), 805-817. doi: 10.1016/j.ijpara.2019.05.005
- [26] R. Béranger, **E. Billoir**, J.R. Nuckols, J. Blain, M. Millet, M.L. Bayle, B. Combourieu, T. Philip, J. Schüz and B. Fervers. Agricultural and domestic pesticides in house dust from different agricultural areas in France.

2019. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(19), 19632-19645. doi: 10.1007/s11356-019-05313-9

[25] E. Roubeau, C. Larue, S. Lorber, H. Gryta, **E. Billoir**, E. M. Gross and A. Elger. Does intraspecific variability matter in ecological risk assessment? Investigation of genotypic variations in three macrophyte species exposed to copper. 2019. *Aquatic Toxicology*. 211: 29-37. doi: 10.1016/j.aquatox.2019.03.012

[24] J. Arce-Funck, A. Bec, **E. Billoir**, F. Perrière, J. Leflaive, F. Guérol, V. Felten and M. Danger. High stoichiometric food quality increases moulting organism vulnerability to pollutant impacts: an experimental test with *Gammarus fossarum* (Crustacea: Amphipoda). 2018. *Science of the Total Environment*, 645, 1484-1495. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.07.227

[23] F. Larras, **E. Billoir**, V. Baillard, A. Siberchicot, S. Scholz, T. Wubet, M. Tarkka, M. Schmitt-Jansen, and M. L. Delignette-Muller. DRomics: A Turnkey Tool to Support the Use of the Dose-Response Framework for Omics Data in Ecological Risk Assessment. 2018 *Environmental Science and Technology*. 52: 14461-14468. doi: 10.1021/acs.est.8b04752

[22] C. Crenier, J. Arce-Funck, A. Bec, **E. Billoir**, F. Perrière, J. Leflaive, F. Guérol, V. Felten and M. Danger. Minor food sources can play a major role in secondary production in detritus-based ecosystems. 2017. *Freshwater Biology*, 62(7) : 1155-1167.

[21] F. Larras, R. Coulaud, E. Gautreau, **E. Billoir**, J. Rosebery and P. Usseglio-Polatera. Assessing anthropogenic pressures on streams: a random forest approach based on benthic diatom communities. 2017. *Science of the Total Environment*, 586 : 1101-1112.

[20] **E. Billoir**, V. Navratil and B. Blaise. Sample size calculation in metabolic phenotyping studies. 2015. *Briefings in bioinformatics*, 16(5) : 813-819 , doi: 10.1093/bib/bbu052.

[19] J. Cettier, M.L. Bayle, R. Béranger, **E. Billoir**, J.R. Nuckols, B. Combourieu and B. Fervers. Efficiency of wipe sampling on hard surfaces for pesticides and PCBs residues in dust. 2015. *Science of the Total Environment*, 505 : 11-21.

[18] N. Urien, E. Uher, **E. Billoir**, O. Geffard, L.C. Fechner and J.D. Lebrun. A biodynamic model predicting waterborne lead bioaccumulation in *Gammarus pulex*: influence of water chemistry and in situ validation. 2015. *Environmental Pollution*, 203 : 22-30.

[17] B. Blaise, C. Pontoizeau, **E. Billoir** and V. Navratil. SRV: an opensource toolbox to accelerate the recovery of metabolic biomarkers and correlations from metabolic phenotyping data sets. 2013. *Bioinformatics*, 29 (10): 1348-1349.

[16] D.R. Fox and **E. Billoir**. Time-dependent Species Sensitivity Distributions. 2013. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32: 378-383.

[15] D.R. Fox, **E. Billoir**, S. Charles, M.L. Delignette-Muller and C. Lopes. What to do with NOECs / NOELs: prohibition or innovation? 2012. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 8: 764-766.

[14] C. Forfait, S. Charles, **E. Billoir** and M.L. Delignette-Muller. Survival data analyses in ecotoxicology: Critical effect concentrations, methods and models. What should we use? 2012. *Ecotoxicology*, 21: 1072-1083.

[13] P.-A. Biron, S. Massarin, F. Alonzo, L. Garcia-Sanchez, S. Charles and **E. Billoir**. Population-level modeling to account for multigenerational effects of uranium in *Daphnia magna*. 2012. *Environmental Science and Technology*. 46: 1136-1143.

- [12] **E. Billoir**, H. Delhaye, C. Forfait, B. Clément, G. Triffault-Bouchet, S. Charles and M.L. Delignette-Muller. Comparison of bioassays with different exposure time pattern: the added value of dynamic modelling in predictive ecotoxicology. 2012. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 75: 80-86.
- [11] M.L. Delignette-Muller, C. Forfait, **E. Billoir** and S. Charles. A new perspective about the Dunnett procedure: filling the gap between LOEC/NOEC and ECx concepts. 2011. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30: 2888-2891.
- [10] L. van Oudenhove, **E. Billoir**, R. Boulay, X. Cerda and C. Bernstein. Temperature limits trail following behaviour through pheromone decay in ants. 2011. *Naturwissenschaften*, 98: 1009-1017.
- [9] D.R. Fox and **E. Billoir**. Individual versus population effects in concentration-response modeling. 2011. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 7: 501-502.
- [8] **E. Billoir**, H. Delhaye, B. Clément, M.L. Delignette-Muller and S. Charles. Bayesian modelling of daphnid responses to time-varying cadmium concentrations in laboratory aquatic microcosms. 2011. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 693-702.
- [7] M. Cornu, **E. Billoir**, H. Bergis, A. Beaufort and V. Zuliani. Modeling microbial competition in food: application to the behavior of *Listeria monocytogenes* and lactic acid flora in pork meat products. 2011. *Food Microbiology*, 28: 639-647.
- [6] **E. Billoir**, J.-B. Denis, N. Commeau, M. Cornu, and V. Zuliani. Probabilistic modeling of the fate of *Listeria monocytogenes* in diced bacon during the manufacturing process. 2011. *Risk Analysis*, 31(2): 237-254.
- [5] V. Ducrot, **E. Billoir**, A. Péry, J. Garric and S. Charles. From individual to population level effects of toxicants in the tubicifid *Branchiura sowerbyi* using threshold effect models in a Bayesian framework. 2010. *Environmental Science and Technology* 44(9): 3566-3571.
- [4] **E. Billoir**, A. da Silva Ferrao-Filho, M.L. Delignette-Muller and S. Charles. DEBtox theory and matrix population models as helpful tools in understanding the toxic cyanobacteria-zooplankton interaction. 2009. *Journal of Theoretical Biology* 258: 380-388.
- [3] **E. Billoir**, M.L. Delignette-Muller, A. Péry and S. Charles. A Bayesian approach to analyzing ecotoxicological data. 2008. *Environmental Science and Technology* 42(23): 8978-8984.
- [2] **E. Billoir**, M.L. Delignette-Muller, A. Péry, O. Geffard and S. Charles. Statistical cautions when estimating DEBtox parameters. 2008. *Journal of Theoretical Biology* 254: 55-64.
- [1] **E. Billoir**, A. Péry and S. Charles. Integrating the lethal and sublethal effects of toxic compounds into the population dynamics of *Daphnia magna*: a combination of the DEBtox and matrix population models. 2007. *Ecological Modelling* 203(3-4): 204-214.

## Chapitre d'ouvrage

S. Charles, **E. Billoir**, C. Lopes et A. Chaumot. Matrix population models as relevant tools in ecotoxicology. 2009. In J. Devillers ed., *Ecotoxicology Modeling*, Springer.

**Communications en congrès internationaux (O = Com. Orale) (P = Poster)**

- J. Ohanessian, S. Prud'homme, V. Felten, **E. Billoir**. Effects of di-n-butyl phthalate (DBP) on life history traits of *Daphnia magna*: comparison of two exposure windows. **(O)** SETAC YES, Landau, Germany, 2023.
- M. Laviale, C. Courcoul, L. Guyot, V. Baillard, **E. Billoir**, S. Boulêtreau, J. Leflaive, B. Jesus. Effect of heat stress on phototrophic biofilm photosynthesis in the context of climate change: a thermal dose approach. **(O)** 8th European Phycological Congress - EPC8, Brest, France, 2023.
- F. Larras, **E. Billoir**, S. Lips, S. Schreiber, P. Veber, M.L. Delignette-Muller 4, M. Schmitt-Jansen. Meta-transcriptomics reveals stress adaptation processes in microbial communities differing in exposure history. **(O)** SFE<sup>2</sup>-GfÖ-EEF joint meeting, Metz, France, 2022.
- M.L. Delignette-Muller, A. Siberchicot, F. Larras, P. Veber, O. Armant, E. Franklin, M. Schmitt-Jansen, **E. Billoir**. DRomics, a workflow to model and make sense of dose-response (multi-)omics data. **(O)** SFE<sup>2</sup>-GfÖ-EEF joint meeting, Metz, France, 2022.
- A. Meyer, B. Alric, O. Dezerald, **E. Billoir**, R. Coulaud, F. Larras, C.P. Mondy, P. Usseglio-Polatera. Linking trait syndromes from diatoms, fishes and invertebrates to micropollutants in streams: a way for identifying relevant model species. **(O)** SFE<sup>2</sup>-GfÖ-EEF joint meeting, Metz, France, 2022.
- C. Courcoul, S. Boulêtreau, V. Baillard, M. Laviale, **E. Billoir**, J. Leflaive. Can the functional resilience of microbial communities exposed to multiple disturbances of the same nature be predicted? **(O)** SFE<sup>2</sup>-GfÖ-EEF joint meeting, Metz, France, 2022.
- M. Beck, **E. Billoir**, M. Flourey, P. Usseglio-Polatera, M. Danger. A 34-year survey under phosphorous decline and warming: Consequences on stoichiometry and functional trait composition of freshwater macroinvertebrate communities. **(P)** SFE<sup>2</sup>-GfÖ-EEF joint meeting, Metz, France, 2022.
- F. Larras, S. Lips, P. Veber, S. Schreiber, **E. Billoir**, M.L. Delignette-Muller, M. Schmitt-Jansen. Multi-omics applications reveal stress adaptation processes in microbial communities differing in exposure history. **(O)** Ecotoxicomic, Montpellier, France, 2022.
- M. Beck, **E. Billoir**, M. Flourey, P. Usseglio-Polatera, M. Danger. 34 years of phosphorous decline in a river drives macroinvertebrate community stoichiometry and functional trait profiles. **(O)** BES, Edimburgh, Scotland, 2021.
- M. Beck, **E. Billoir**, V. Felten, A. Meyer, P. Usseglio-Polatera, M. Danger. Linking macroinvertebrate functional and stoichiometric traits. **(O)** SEFS Virtual, 2021.
- F. Larras, **E. Billoir**, S. Lips, M. L. Delignette-Muller, M. Schmitt-Jansen. The power of the dose-response framework to uncover molecular functional responses of micro-organisms to chemicals. **(O)** Ecotoxicomics Montpellier (Virtual), France, 2020.
- M L. Delignette-Muller, F. Larras, **E. Billoir**, A. Siberchicot, M. Schmitt-Jansen. DRomics: an R tool for modelling omics dose-response data. **(P)** UseR Toulouse, France, 2019.
- A. Meyer, **E. Billoir** [...] P. Usseglio-Polatera. Evaluating the uncertainty on stream ecological assessment by an invertebrate-based index: effects of index construction and operator skill level. **(O)** SEFS Zagreb, Croatia, 2019.

- M. Beck, C. Mondy, M Danger, **E Billoir**, P. Usseglio-Polatera. Stoichiometric traits predict the composition of macroinvertebrate communities: extending the growth rate hypothesis to species development. **(O)** SEFS Zagreb, Croatia, 2019.
- F. Alonzo, M. Trijau, **E. Billoir**. Molecular and metabolic mechanisms of transgenerational effects in *Daphnia* exposed to radionuclides. **(O)** DEB Symposium Brest, France, 2019.
- V. Baillard, C. Sulmon, A.K. Bittebiere, C. Mony, S. Devin, **E. Billoir**. SSD models used for assessing interspecific competition impact on organisms' tolerance against chemical stress. **(O)** SETAC YES Ghent, Belgium, 2019.
- F. Maunoury-Danger, D. Aran, A. Auclerc, Q. Bachelet, T. Beguiristain, **E. Billoir** [...] P. Usseglio-Polatera. Diversity-function relationships in contaminated soils – A functional trait approach. **(P)** SFE Rennes, France, 2018.
- V. Baillard, C. Sulmon, A.K. Bittebiere, C. Mony, S. Devin, **E. Billoir**. SSD models used for assessing interspecific competition impact on organisms' tolerance against chemical stress. **(P)** SFE Rennes, France, 2018.
- F. Larras, **E. Billoir**, S. Schloz, M. L. Delignette-Muller, M. Schmitt-Jansen. Implementing OMICs in risk assessment processing. **(P)** Biofilm Workshop Sven Lovén Centre, Sweden, 2018.
- 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. **(P)** SETAC Rome, Italy, 2018.
- V. Baillard, C. Sulmon, A.K. Bittebiere, C. Mony, S. Devin, **E. Billoir**. Interspecific competition impact on organism responses to chemical stress: an SSD-based approach. **(P)** SETAC Rome, Italy, 2018.
- F. Larras, **E. Billoir**, S. Schloz, M. L. Delignette-Muller, M. Schmitt-Jansen. How to implement functional responses of microalgae in risk assessment processing? **(O)** SETAC Rome, Italy, 2018.
- E. Billoir**, C. Lopes and S. Charles. Modelling of population dynamics and food webs together with biostatistics - Works undertaken in France. **(O)** SETAC Brussel, Belgium, 2017.
- E. Billoir**, J. Arce Funck, C. Crenier, P. Usseglio-Polatera, J. Bouquerel, V. Felten and M. Danger. Development of a mixed hierarchical multinomial model to analyze community composition. **(O)** ISEC Seattle, USA, 2016.
- F. Larras, E. Gautreau, **E. Billoir**, S. Morin, J. Rosebery, R. Coulaud, P. Usseglio-Polatera. Using benthic diatom life-history traits and taxonomy to assess stream impairment risk. **(O)** SEFS Geneva, Switzerland, 2015.
- E. Billoir**, R. Coulaud, F. Larras, V. Archaimbault, C. Mondy, P. Usseglio-Polatera. Uncertainty associated to the new French macroinvertebrate-based multimetric index (I2M2): towards a probabilistic ecological indicator. **(P)** SEFS Geneva 2015.
- R. Béranger, **E. Billoir**, J. Nuckols, J. Blain, ML Bayle, J. Schüz, B Combourieu, B. Fervers. SIGEXPO project: pesticides exposure level in the French context: burden of environmental exposures and domestic habits. **(O)** Environmental and Health - Bridging South, North, East and West, Basel, Switzerland, 2013.
- D.R. Fox, **E. Billoir**, S. Charles and M.L. Delignette-Muller. Statistical ecotoxicology - bright lines and dark alleyways. **(O)** SETAC World Congress, Berlin, Germany, 2012.

M.L. Delignette-Muller, C. Forfait, L. Mariani, **E. Billoir** and S. Charles. Statistical evaluation of statistical designs for modelling concentration-response functions in ecotoxicology. **(O)** SETAC World Congress, Berlin, Germany, 2012.

S. Charles, C. Lopes, **E. Billoir**, D. Fox, C. Forfait, L. Mariani and M.L. Delignette-Muller. Estimation of critical effect concentration: when choosing the right stochastic part matters. **(O)** SETAC World Congress, Berlin, Germany, 2012.

**E. Billoir**, D.R. Fox, M.L. Delignette-Muller and S. Charles. An interfaced R-package to fit SSDs. **(P)** SETAC World Congress, Berlin, Germany, 2012.

P.-A. Biron, **E. Billoir**, S. Massarin, F. Alonzo, and S. Charles. Effects of uranium in *Daphnia magna* exposed over three successive generations: extrapolation of DEBtox analyses to the population level. **(P)** DEB Symposium, Lisbon, Portugal, 2011.

**E. Billoir**, H. Delhay, C. Forfait, B. Clément, S. Charles and M.L. Delignette-Muller. Comparison of bioassays with different exposure patterns: the predictive potential of mechanistic modelling. **(O)** SETAC Congress, Milan, Italy, 2011.

C. Forfait, M.L. Delignette-Muller, **E. Billoir** and S. Charles. A review of methods for analysing standard data: is there a place for non-standard methods? **(O)** SETAC Congress, Milan, Italy, 2011.

**E. Billoir** and D.R. Fox. Time-dependent SSDs. **(P)** SETAC Congress, Milan, Italy, 2011.

M.L. Delignette-Muller, C. Forfait, **E. Billoir** and S. Charles. Another interpretation of classical multiple comparison procedures used in ecotoxicology. **(P)** SETAC Congress, Milan, Italy, 2011.

**E. Billoir** and D.R. Fox. Time-dependent SSDs. **(O)** EnviroTox, Darwin, Australia, 2011.

**E. Billoir**, V. Ducrot and S. Charles. Threshold Effect modelling: A Bayesian approach to assess and extrapolate parameter uncertainty in populations of benthic worms exposed to polluted sediments. **(P)** SETAC Congress, Seville, Spain, 2010.

C.D. Forfait, **E. Billoir**, M.L. Delignette-Muller, R. Manar and S. Charles. Survival data analyses in ecotoxicology. **(P)** SETAC Congress, Seville, Spain, 2010.

F. Alonzo, S. Massarin, **E. Billoir**, P.-A. Biron, S. Charles and J. Garnier-Laplace. Modelling individual and population dynamics of *Daphnia magna* exposed to uranium with multigenerational effects on physiology and life history. **(P)** SETAC Congress, Seville, Spain, 2010.

S. Charles, **E. Billoir**, C.D. Forfait, A. da Silva Ferrao-Filho, C. Lopes, J. Garric and M.L. Delignette-Muller. DEBtox and matrix population models coupled with Bayesian inference to analyse ecotoxicological data. **(P)** SETAC Congress, Seville, Spain, 2010.

S. Charles, **E. Billoir**, C.D. Forfait and M.L. Delignette-Muller. Use of Bayesian inference in ecotoxicology. **(O)** NCSC Congress, Lyon, France, 2010.

**E. Billoir**, H. Delhay, B. Clément, M. L. Delignette-Muller and S. Charles. Modelling of daphnids responses to cadmium in aquatic microcosms. **(O)** CMPD3 Congress, Bordeaux, France, 2010.

**E. Billoir**, S. Charles and V. Ducrot. From individual to population level effects of toxicants in the tubicifid *Branchiura sowerbyi* using threshold effect models in a Bayesian framework. **(O)** CMPD3 Congress, Bordeaux, France, 2010.

**E. Billoir**, J.-B. Denis, N. Commeau, M. Cornu, and V. Zuliani. Probabilistic modeling of *Listeria monocytogenes* behaviour in diced bacon along the manufacture process chain. (O) ICPMF Congress, Washington DC, United States, 2009.

M. Cornu, **E. Billoir**, H. Bergis, A. Beaufort and V. Zuliani. Modelling microbial competition in foods. Application to the behaviour of *Listeria monocytogenes* and lactic acid flora in diced bacon. (O) ICPMF Congress, Washington DC, United States, 2009.

N. Commeau, E. Parent, **E. Billoir**, V. Zuliani and M. Cornu. Sampling plan optimisation: application to French diced bacon industry and *Listeria monocytogenes*. (P) ICPMF Congress, Washington DC, United States, 2009.

S. Charles, **E. Billoir**, C. Lopes, M. Teixeira-Alves and M.L. Delignette-Muller. New insights in analysing ecotoxicological data using DEBtox and matrix population models: the benefits offered by bayesian inference. (O) ISTA Congress, Metz, France, 2009.

C. Lopes, M. Teixeira-Alves, **E. Billoir**, J. Garric and S. Charles. A combination of DEBtox and Leslie models to quantify ivermectin impacts on cladoceran species. (O) DEB Symposium, Brest, France, 2009.

**E. Billoir**, M.L. Delignette-Muller, A. Péry and S. Charles. Improving the analysis of routine ecotoxicological data. (P) SETAC Congress, Sydney, Australia, 2008.

**E. Billoir**, A. da Silva Ferrao-Filho, M.L. Delignette-Muller and S. Charles. DEBtox theory and matrix population models as helpful tools in understanding the toxic cyanobacteria-zooplankton interaction. (P) SETAC Congress, Sydney, Australia, 2008.

**E. Billoir**, M.L. Delignette-Muller, A. Péry and S. Charles. On the use of bayesian inference to improve routine ecotoxicological data analysis. (P) IBC Congress, Dublin, Ireland, 2008.

**E. Billoir**, A. da Silva Ferrao-Filho, M.L. Delignette-Muller and S. Charles. The ecotoxicology of the zooplankton-cyanobacteria interaction. (O) CMPD2 Congress, Campinas, Brazil, 2007.

**E. Billoir**, M.L. Delignette-Muller, A. Péry and S. Charles. On the use of bayesian inference to estimate DEBtox parameters. (O) SETAC Congress, Porto, Portugal, 2007.

S. Charles, **E. Billoir** and A. Péry. Could we reduce toxicity tests duration? (O) QSAR Congress, Lyon, France, 2006.

**E. Billoir**, A. Péry and S. Charles. Integrating the lethal and sublethal effects of toxic compounds into the population dynamics of *Daphnia magna*: a combination of the DEBtox and matrix population models. (P) SETAC Congress, The Hague, The Netherland, 2006.

**E. Billoir**, A. Péry and S. Charles. Integrating both lethal and sublethal effects of toxic compounds into the population dynamics of *Daphnia magna*. (O) DEB Workshop, Marseille, France, 2005.

#### **Séminaires internationaux sur invitation**

E. Billoir. Comparison of daphnid responses to Cd under different exposure time-courses: the added value of dynamic modelling. Department System Analysis, Integrated Assessment and Modelling, Eawag, Dübendorf, Switzerland, 2015. (Invitation tous frais payés)

E. Billoir. Bayesian modelling of daphnid responses to various cadmium exposure patterns in laboratory aquatic microcosms. Statistics group, Department of Life Sciences, University of Copenhagen, Denmark, 2011. (Invitation tous frais payés)

E. Billoir, A. da Silva Ferrao-Filho and S. Charles. Dynamic Energy Budgets Theory applied to ecotoxicology. Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, 2006. (Dans le cadre d'un voyage professionnel au Brésil)

#### **Communications en congrès nationaux (O = Com. Orale) (P = Poster)**

C. Courcoul, S. Boulêtreau, J. Ferriol, V. Baillard, M. Laviale, **E. Billoir**, J. Leflaive. Résilience fonctionnelle de biofilms exposés à des perturbations répétées : influence de la nature, intensité et fréquence des perturbations. **(P)** AFEM Carqueiranne, 2023.

C. Courcoul, M. Laviale, V. Baillard, **E. Billoir**, J. Leflaive, S. Boulêtreau. La réponse des biofilms phototrophes au stress thermique dépend-elle de leur complexité, de leur histoire thermique, ou des deux ? **(O)** ADLaF Besançon, France, 2023.

J. Ohanessian, S. Prud'homme, V. Felten, **E. Billoir**. Effets du di-n-butyl phtalate (DBP) sur les traits d'histoire de vie de *Daphnia magna* : comparaison de deux fenêtres d'exposition. **(O)** SEFA Le Havre, 2023.

E. Franklin, **E. Billoir**, M. L. Delignette-Muller, S. Prud'homme. Méthodologie d'interprétation biologique de la modélisation dose-réponse de données omiques. **(O)** SEFA Le Havre, 2023.

A. Meyer, B. Alric, O. Dezerald, **E. Billoir**, R. Coulaud, F. Larras, C. Mondy, P. Usseglio-Polatera. Etude des liens entre micropolluants et syndromes de traits fonctionnels pour trois compartiments biologiques (poissons, diatomees et macroinvertébrés) : comment identifier de potentielles nouvelles espèces sentinelles ? **(O)** SEFA Le Havre, 2023.

T. Dionet, M. Cherif, **E. Billoir**, V. Felten, R. Coulaud, V. Goncalves, M. Danger. Intégration de la stœchiométrie dans la modélisation de la dynamique de population de *Gammarus fossarum* et conséquences sur la disponibilité des ressources élémentaires. **(P)** SEFA Le Havre, 2023.

**E. Billoir**, B. Sohm, C. Cossu-Leguille, S. Prud'homme. Effet dose-dépendant du Di-N-Butyl Phtalate (DBP) sur le développement embryo-larvaire du poisson zèbre (*Danio rerio*) : intérêt de l'intégration de gradients de concentrations dans les analyses transcriptomiques. **(P)** SEFA Metz, 2022.

J. Ohanessian, M. Houin, S. Prud'homme, V. Felten, **E. Billoir**. Evaluation des effets chroniques du Di-N-Butyl Phtalate (DBP) sur les traits d'histoire de vie de *Daphnia magna* et sa descendance. **(P)** SEFA Metz, 2022.

**E. Billoir**, B. Sohm, C. Cossu-Leguille, S. M. Prud'homme. Effet dose-dépendant du di-n-butyl phtalate sur le développement embryo-larvaire du poisson zèbre (*Danio rerio*) : Intérêt de l'intégration de gradients de concentration dans les analyses transcriptomiques. **(P)** Ecobim Namur, Belgique, 2022.

**E. Billoir**, M. L. Delignette-Muller. Modelling for risk assessment. **(O)** Journées du LIEC, Metz, 2020.

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). **(O)** ADLaF Metz, 2019.



- A. Meyer, **E. Billoir**, P. Usseglio-Polatera. Une certaine incertitude : précision et confiance en bio-indication. L'exemple des diatomées et des macro-invertébrés. (O) ADLaF Metz, 2019.
- V. Baillard, C. Sulmon, A.K. Bittebiere, C. Mony, S. Devin, **E. Billoir**. Approche de modélisation hiérarchique pour la description de l'effet de la compétition sur la tolérance chimique d'herbacées. (O) SEFA Lyon, 2019.
- M L. Delignette-Muller, F. Larras, **E. Billoir**, A. Siberchicot, M. Schmitt-Jansen. Utilisation de DRomics pour modéliser les données omiques de type dose-réponse dans le cadre de l'appréciation du risque environnemental. (O) SEFA Lyon, 2019.
- M L. Delignette-Muller, F. Larras, **E. Billoir**, A. Siberchicot, M. Schmitt-Jansen. Modelling of omics dose-response data for ecological risk assessment. (O) Journées EcoStat Grenoble, 2018.
- E. Billoir**, J. Arce Funck, C. Crenier, P. Usseglio-Polatera, J. Bouquerel, V. Felten and M. Danger. Modèle mixte hiérarchisé pour analyser la composition de communautés. (O) Journées EcoStat Lyon, 2015.
- R. Béranger, J. Blain, **E. Billoir**, V. Chasles, J. Schüz, B. Combourieu, B. Fervers. SIGEXPO: Geographic Information System validation using indoor dust samples. (O) 8th Cancer Scientific Forum of the Cancéropôle CLARA, Lyon, 2013.
- E. Billoir**, H. Delhayé, B. Clément, M.L. Delignette-Muller and S. Charles. Comparaison de bioessais avec exposition au cadmium variable ou constante : valeur ajoutée de la modélisation. (O) Atelier modélisation du Cluster Rhône-Alpes Environnement, Lyon, 2010.
- S. Charles, **E. Billoir**, C.D. Forfait and M.L. Delignette-Muller. Toxique, oui... mais écologique ! (O) Colloque d'Ecologie Scientifique, Montpellier, 2010.
- E. Billoir**, H. Delhayé, B. Clément, M.L. Delignette-Muller and S. Charles. Effets du cadmium sur *Daphnia magna* en microcosme aquatique. (O) Journées Santé-Environnement du Cluster Rhône-Alpes Environnement, Lyon, 2010.
- C. Lopes, M. Teixeira-Alves, **E. Billoir**, J. Garric, S. Charles. (2009). Couplage de modèles DEBtox et Leslie pour quantifier l'impact de l'ivermectine sur des cladocères. (O) Journée d'échanges Etudiants-Chercheurs du Cluster Santé-Environnement, Grenoble, 2009.

### Séminaires nationaux

- E. Billoir**, Animation scientifique LIEC, Metz, 2018. DRomics: Dose Response for Omics.
- E. Billoir**, F. Larras, R. Coulaud, P. Usseglio-Polatera. Outils de bioindication pour l'évaluation écologique de la qualité des petits cours d'eau en France. LBBE, Lyon, 2016.
- E. Billoir**. Modélisation des effets du cadmium sur *Daphnia magna* en microcosme. ENTPE LSE, Vaulx-en-Velin, 2010.
- E. Billoir**. Modèles DEBtox, modèles matriciels de population et inférence bayésienne pour l'analyse de données écotoxicologiques. IRSN LRE/LME, Cadarache, 2010.
- E. Billoir**. Modélisation dynamique et inférence bayésienne pour l'analyse de données écotoxicologiques. INRA MIA, Jouy en Josas, 2009.

**E. Billoir**, M.L. Delignette-Muller, A. Péry and S. Charles. Analyse de données écotoxicologiques par inférence Bayésienne. AppliBUGS meeting, Paris, 2007.

**E. Billoir**, M.L. Delignette-Muller, A. Péry and S. Charles. On the use of Bayesian inference to estimate DEBtox parameters. SéMoVi, Lyon, 2007.

## **Pédagogie**

**E. Billoir\***, C. Lemaitre\* et S. Charles. La modélisation des réseaux de gènes : une situation-problème pour l'apprentissage de méthodes mathématiques avancées. 2008. *Res Academica* (actes du congrès AIPU).

**E. Billoir\***, C. Lemaitre\* et S. Charles. La modélisation des réseaux de gènes : une situation-problème pour l'apprentissage de méthodes mathématiques avancées. Poster. Congrès AIPU, Montpellier, France, 2008.

\* contribution égale des deux premiers auteurs

## **Logiciel**

### **DRomics (package R)**

Manuel du package DRomics :

DRomics: Dose Response for Omics, M.L. Delignette-Muller, E. Billoir, F. Larras, A. Siberchicot.

<https://cran.r-project.org/web/packages/DRomics/DRomics.pdf>

Vignette du package DRomics :

Overview of the DRomics package. M. L. Delignette-Muller, A. Siberchicot, E. Billoir, F. Larras.

[https://cran.r-project.org/web/packages/DRomics/vignettes/DRomics\\_vignette.html](https://cran.r-project.org/web/packages/DRomics/vignettes/DRomics_vignette.html)

Toutes les sources du package DRomics sont disponibles à l'adresse <https://aursiber.github.io/DRomics/>



## 2 Introduction

### 2.1 Contexte

Science qui étudie le devenir et les effets des composés toxiques, d'origine anthropique ou naturelle, dans les écosystèmes (Lamy et al., 2022), l'écotoxicologie est à la croisée entre la compréhension de mécanismes fondamentaux et de forts enjeux sociétaux d'évaluation des risques environnementaux. Elle est le petit poucet de la recherche en écologie sur le thème du changement global (Sigmund et al., 2023, Sylvester et al., 2023), alors que la pollution est listée parmi les principales causes de la perte de biodiversité actuelle et à venir (IPBES, 2019). La production globale de produits chimiques a augmenté d'un facteur 50 depuis les années 1950 et pourrait encore tripler de 2010 à 2050 (Persson, 2022).

L'objectif des procédures d'évaluation des risques environnementaux est de protéger les milieux naturels et leur biote, mais comment faire ? En écotoxicologie, deux approches sont employées de manière complémentaire : l'approche *a posteriori*, rétrospective, qui s'appuie sur des suivis du biote sur le terrain, et l'approche *a priori*, prospective, qui met en œuvre des tests en conditions contrôlées. L'approche terrain intègre *de facto* des conditions environnementales réalistes, au regard des facteurs abiotiques et des interactions biologiques, mais au prix d'une grande complexité d'interprétation. A l'inverse, les tests en conditions contrôlées, appelés bioessais, permettent d'isoler l'effet d'un (ou de quelques) facteur(s) d'intérêt, mais sont limités par leur pertinence écologique. Des outils intermédiaires ont également été développés tels que des dispositifs multi-espèces appelés micro- ou mésocosme, ou des encagements *in situ* pour suivre des organismes dans des conditions réalistes.

L'idéal serait d'arriver à comprendre, dans le but d'ensuite prédire, comment les composés toxiques affectent les individus, les populations, les communautés, les écosystèmes. Le cadre conceptuel de l'AOP (Adverse Outcome Pathway, Ankley et al., 2010, chemin d'effet néfaste) propose aux scientifiques un schéma, ou plutôt un axe, pour décrire les mécanismes d'action des polluants à chaque échelle, et leur possible propagation au gré des niveaux d'organisation biologique. Cependant, ce cadre, bien que séduisant, n'explique pas une composante importante qui vient encore compliquer encore l'ampleur de la tâche : les enjeux de l'écotoxicologie doivent inclure la prise en compte des aspects temporels de l'exposition des organismes. A chaque échelle biologique, on peut étudier des effets aigus sur le court terme, des effets chroniques sur le long terme (relativement à la durée de vie des espèces), ou encore des effets transgénérationnels, que la fenêtre d'exposition soit transitoire ou continue.

La Figure 1 représente les trois axes : niveau d'organisation biologique, espace, et temps. J'ai tenté d'y positionner les différents travaux présentés dans cette HDR.

- Dans le **Chapitre 3**, la réponse structurelle et fonctionnelle de la communauté de macro-invertébrés aquatiques vis-à-vis d'un gradient de phosphore est étudiée sur le terrain dans les cours d'eau (à l'échelle d'un site ou à l'échelle de la France métropolitaine) et sur le long terme (dizaine d'années).
- Dans le **Chapitre 4**, les réponses face à une exposition chronique à l'isoproturon de six poacées représentatives des espèces peuplant les communautés des bandes enherbées sont étudiées en conditions contrôlées, en absence ou présence de compétiteur.
- Dans le **Chapitre 5**, les réponses transcriptomique et métabolomique d'une population d'algues ou d'une communauté microbienne de biofilm aquatique sont analysées suite à une exposition aigue à des pesticides en conditions contrôlées.
- Enfin, dans le **Chapitre 6**, les traits d'histoire de vie de *Daphnia magna* sont suivis, en conditions contrôlées, pour différentes concentrations d'exposition en uranium appauvri lors de trois générations successives. Ces réponses sont ensuite analysées à l'échelle de l'organisme et projetées à l'échelle de la population.

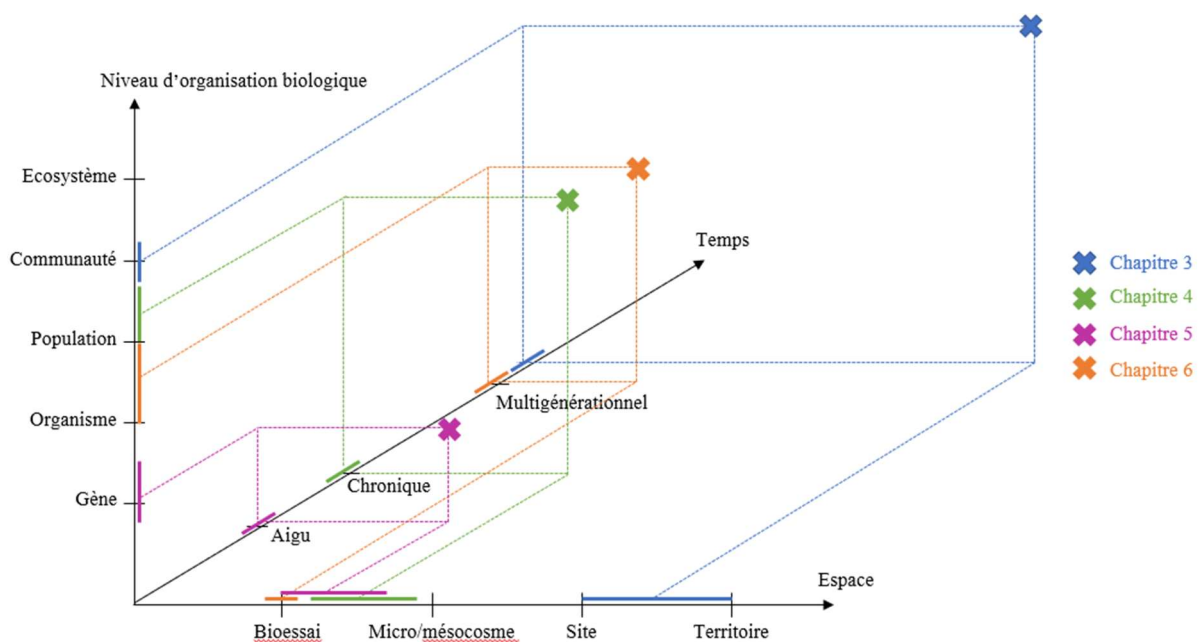


Figure 1 - Représentation schématique des axes temporel (durée d'exposition), spatial (échelle de représentativité) et niveau d'organisation considéré (pertinence écologique). Adapté d'après Lamy et al. (2022).

Le Tableau 3 complète la Figure 1 et apporte davantage de détails sur la variété des jeux de données traités : du laboratoire au terrain, de l'exposition aigue au très long terme, du modèle biologique mono-spécifique à la communauté, des communautés microbiennes aquatiques aux plantes terrestres, de l'expression des gènes au caractéristiques des communautés, en passant par des traits mesurés à l'échelle des organismes. Les facteurs de stress sont également divers : des pesticides, un radionucléide, et le phosphore qui n'est généralement pas considéré comme un polluant puisqu'il est un élément essentiel à la constitution des organismes vivants, mais qui constitue un facteur de stress s'il est présent en trop faible ou trop forte quantité.

Tableau 3 – Objet et contexte d'étude dans les différents chapitres.

	Modèle biologique	Facteur de stress	Réponse analysée	Durée d'exposition	Echelle spatiale
Chapitre 3	Communauté de macroinvertébrés aquatiques (plusieurs dizaines à plusieurs centaines de taxons)	Nutriments (carbone, azote, phosphore), en particulier phosphore	Structure, composition élémentaire (C, N, P) et fonctions évaluées <i>via</i> des traits éco-biologiques théoriques	De nombreuses générations	Un site sur la Loire
					Plus de 1300 sites en France
Chapitre 5	Une espèce d'algues vertes	Triclosan, pesticide perturbant la biosynthèse des lipides	Transcriptomique, métabolomique	Aigue	Laboratoire
	Biofilm aquatique, communauté composée de micro-organismes (diatomées, algues, etc.)	Diuron, herbicide inhibiteur de la photosynthèse	Méta-transcriptomique	Chronique puis aigu	
Chapitre 4	Six espèces de poacées (graminées) peuplant les bandes enherbées, aussi appelées marges herbeuses	Isoproturon, herbicide inhibiteur de la photosynthèse	Traits morphologiques et fonctionnels	Chronique	Laboratoire
Chapitre 6	L'espèce cladocère <i>Daphnia magna</i>	Uranium appauvri	Traits d'histoire de vie	Trois générations	Laboratoire

Quel est le point commun entre toutes les études présentées dans mon HDR ? Le développement d'approches de modélisation, dans mes domaines d'application de prédilection que sont l'écotoxicologie et l'écologie. Mon travail est associé à des réflexions communes avec des collègues spécialistes de la biologie. Je m'efforce de développer chaque modèle au service d'une question biologique pour tenter de comprendre le mode d'action des contaminants, aux différentes échelles. Les approches sont conçues pour être génériques, c'est-à-dire applicables à différents modèles biologiques. C'est pourquoi, dans les différents chapitres, je ne décrirai que brièvement les modèles biologiques, sauf quand cela est nécessaire à la compréhension de la modélisation.

## 2.2 Éléments de vocabulaire des modèles

En sciences, un modèle est « une représentation simplifiée, souvent formalisée, d'un processus, d'un système » (<https://dictionnaire.lerobert.com/definition/modele>). Le formalisme peut s'exprimer sous forme de schémas, de phrases, de représentations graphiques, d'équations, qui définissent le cadre du modèle, c'est-à-dire les hypothèses sous-jacentes à la simplification proposée. Les variables d'un modèle sont les quantités dont la variation est décrite en fonction de covariables. Les paramètres d'un modèle sont les lettres dans les équations qui ne sont ni des variables ni des covariables.

Les modèles peuvent être qualifiés de descriptifs ou de mécanistes. Dans le premier cas, ils décrivent de manière empirique une relation observée entre des variables. Dans le deuxième, ils décrivent explicitement des mécanismes, qui sont souvent biologiques, biochimiques, biophysiques ou écologiques dans notre contexte (par exemple, des flux entre compartiments biologiques).

On parle de modèle théorique dans le cas où le modèle est exploré sans être ajusté à des données. Par exemple, les modèles (mécanistes) d'interaction entre deux espèces, tels que le modèle proies-prédateurs de Lotka-Volterra (du nom de deux pionniers des biomathématiques qui l'on proposé indépendamment dans les années 1920), peuvent être étudiés analytiquement, c'est-à-dire que des points d'équilibre, et leurs conditions d'existence et de stabilité sont recherchés. Ainsi il est possible de montrer mathématiquement que ces modèles prévoient, pour certaines valeurs de paramètres, la coexistence entre proies et prédateurs, avec des solutions périodiques où les densités de proies et de prédateurs oscillent, le pic de densité des prédateurs suivant celui des proies. De telles fluctuations au cours du temps ont été observées dans des populations naturelles, le cas le plus célèbre étant les effectifs de lynx et de lièvres des neiges au Canada (Elton et Nicholson, 1942), issus des registres de la Compagnie de la baie d'Hudson, qui faisait commerce de fourrures.

D'autres modèles sont d'emblée pensés pour être ajustés à des jeux de données, et non pour être explorés globalement. Ils sont calibrés pour une situation donnée, et leurs paramètres sont estimés par inférence statistique, selon une méthode fréquentiste ou Bayésienne. L'approche fréquentiste se base sur la vraisemblance des données, elle cherche les valeurs de paramètres du modèle qui maximisent la probabilité d'observation d'un jeu de données. L'approche Bayésienne, quant à elle, considère les paramètres comme des variables aléatoires et estime leur distribution de probabilité, compte tenu des données observées et des *a priori* connus sur les valeurs des paramètres. En pratique, l'une ou l'autre des méthodes peut s'avérer plus compliquée à mettre en œuvre, selon le modèle et selon la nature des données. Quelle que soit la méthode d'inférence utilisée, un principe important associé à la démarche de modélisation est le principe de parcimonie : c'est le fait de choisir, entre deux modèles, le plus simple (moins de paramètres) quand le plus complexe ne décrit pas significativement mieux les données.

Enfin, les modèles de changement d'échelle, comme leur nom l'indique, ont pour but de permettre le passage d'un niveau d'organisation biologique à un autre, par exemple des organismes aux populations dans le cas des modèles matriciels de dynamique des populations (cf Partie 2.3.5) ou des espèces aux communautés dans le cas des *Species Sensitivity Distributions* (SSD) qui extrapolent la sensibilité d'une communauté à partir des sensibilités des organismes de différentes espèces (cf Partie 2.3.6).

## 2.3 Présentation de quelques modèles de l'écologie et de l'écotoxicologie

La remarquable revue de littérature publiée par Larras et al. (2022) inventorie les différentes catégories de modèles utilisés en évaluation du risque écologique lié aux contaminants. Je ne vais pas re-synthétiser cet état de l'art, mais simplement introduire ci-après les modèles utilisés dans la suite de ce mémoire.

### 2.3.1 Modèles linéaires

La régression linéaire simple est un incontournable de la statistique. Par une relation linéaire, elle modélise une variable quantitative observée (aussi appelée variable dépendante, ou à expliquer) en fonction d'une variable quantitative contrôlée (aussi appelée variable indépendante, potentiellement explicative de la réponse). La relation linéaire constitue la partie déterministe du modèle, tandis qu'une partie stochastique du modèle (aussi appelée modèle d'erreur) vient décrire la distribution des observations. En régression linéaire ordinaire, la distribution des données est supposée suivre une loi normale (loi de Gauss), comme sur la Figure 2. L'examen des résidus du modèle (écarts entre observations et modèle déterministe) permet de juger du respect de cette hypothèse. Lorsqu'il est impossible de se conformer à ce modèle Gaussien, on se tourne vers les modèles linéaires généralisés qui permettent de considérer d'autres lois de distribution pour la partie stochastique.

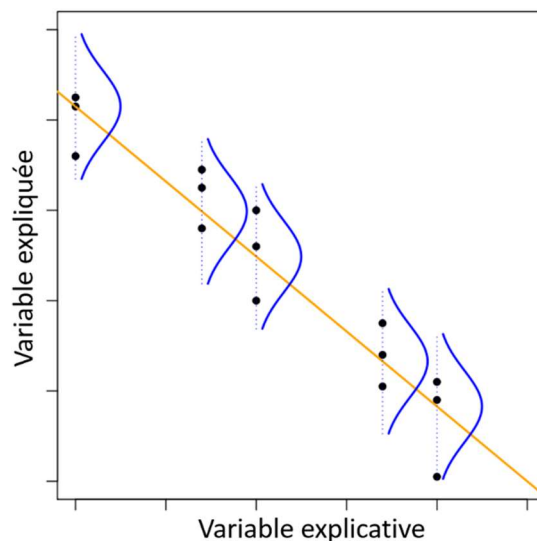


Figure 2 - Régression linéaire simple : en jaune la partie déterministe du modèle, en bleu la partie stochastique du modèle. D'après Delignette-Muller, cours de biostatistique.

Il est ensuite possible de calculer un intervalle de confiance sur la pente du modèle, et de tester si elle est significativement différente de zéro. Le cas échéant, cela indique qu'il y a un effet significatif de la variable contrôlée (explicative) sur la variable observée. En régression linéaire simple, on ne considère qu'une variable explicative, la régression linéaire multiple permet d'en prendre en compte plusieurs. Le cadre théorique du modèle linéaire peut également être utilisé dans le cas où la variable explicative est qualitative, situation traitée de manière équivalente par l'ANOVA à un facteur. Dans le cas de deux variables explicatives, une quantitative et une qualitative, on parle d'ANCOVA.



### 2.3.2 Méthodes d'analyse multivariée

Les analyses multivariées sont des méthodes descriptives qui font partie de la panoplie des écologues. Elles ont pour objectif de permettre l'analyse de jeux de données multivariés, c'est-à-dire constitués de plusieurs variables observées (traditionnellement organisées en colonnes) pour un même objet (avec un objet par ligne). Par exemple, en écologie, des mesures physico-chimiques sur des stations étudiées (décrivant ainsi l'environnement), ou des abondances de taxons sur ces stations (décrivant ainsi la composition des communautés).

Lorsque l'on étudie un petit nombre de variables, il est possible de représenter le nuage de points formé par les objets mesurés. Mais pour  $n$  variables ( $n > 3$ ), il n'est plus possible de visualiser le nuage de points (au-delà de la 3D). On emploie alors des méthodes d'ordination, qui extraient les principales tendances dans un jeu de données. Elles calculent les axes « principaux », orthogonaux entre eux, qui, par ordre décroissant, permettent de visualiser le maximum de variabilité des données. Si notre nuage de point a une forme de dragée (ellipsoïde), le premier axe principal est la longueur de la dragée, le deuxième axe principal est la largeur de la dragée, etc. (reste à s'imaginer une dragée en dimension  $n$ ). On visualise ensuite les objets et les variables projetés dans le(s) plan(s) formé(s) par les deux (ou quelques) axes principaux, ce qui permet de décrire les principales tendances en termes de proximité entre objets, corrélation entre variables et associations entre objets et variables.

Les principales méthodes d'analyse multivariée sont l'Analyse en Composantes Principales (PCA) et l'analyse des correspondances (CA), la différence entre les deux étant la manière de calculer la distance entre objets (pour simplifier). Les deux méthodes pré-citées sont dédiées à l'analyse d'un tableau. Il existe aussi des méthodes qui permettent le couplage de  $k$  tableaux ( $k > 1$ ), portant sur les mêmes objets (en lignes) : soit en considérant les variables d'un tableau comme potentiellement explicatives des variables d'un autre tableau (Analyse des Redondances, RDA, Analyse Canonique des Correspondances, CCA), par exemple pour explorer comment les variables environnementales peuvent expliquer les patrons de composition des communautés à travers différentes stations, soit en donnant le même rôle aux  $k$  tableaux : on parle alors d'analyses de co-inertie (CoIA).

### 2.3.3 Modèles dose-réponse

Un modèle dose-réponse décrit la relation, souvent non linéaire, entre l'intensité d'une pression et un effet engendré. Il est l'outil de base en écotoxicologie, et permet d'analyser les résultats de bioessais, où des organismes sont exposés à quelques concentrations le long d'un gradient, et une réponse biologique est mesurée en fin d'essai.

Traditionnellement, des modèles monotones de forme sigmoïde sont utilisés pour décrire des relations dose-réponse, par exemple des modèles log-logistique (également appelés modèles de Hill) ou des modèles de Weibull. Néanmoins, dans certains cas les relations dose-réponse ne sont pas monotones, mais biphasiques. En particulier, le phénomène d'hormèse, correspondant à une stimulation de la réponse à faible dose avant une inhibition à plus forte dose, a fait l'objet de développements de modèles dédiés, voir Nweke et Ogbonna (2017) pour une revue de littérature. L'émergence des données moléculaires de type omiques en (éco)toxicologie a également mis en évidence une diversité de relations dose-réponse, avec des relations monotones sigmoïdes, mais aussi linéaires et exponentielles, et des courbes non monotones en forme de cloche ou de U (Figure 3), ce qui a nécessité le développement de nouveaux modèles dose-réponse (Smetanova et al., 2015, Larras et al., 2018).

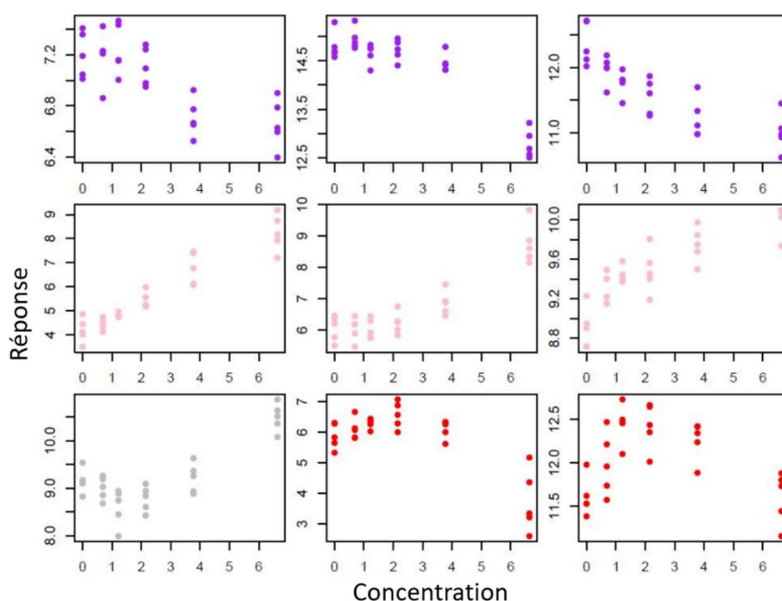


Figure 3 - Exemples de relations concentration-réponse observées sur des données transcriptomiques. On distingue des formes décroissantes (en violet), des formes croissantes (en rose), des formes en U (en gris) et des formes en cloche (en rouge).

Les modèles dose-réponse ont pour mission de décrire les données mais aussi de permettre l'estimation de « concentrations d'effet critique » (CEC). Des traditionnels modèles sigmoïdes, sont dérivées les traditionnelles  $EC_x$  (*Effective Concentrations*, concentrations efficaces à x%), c'est-à-dire les concentrations correspondant à x% de l'effet maximal observé, souvent avec x égal à 10% ou 50% (Figure 4, en haut). Cependant, les  $EC_x$  ainsi définies ne sont pas calculables pour des courbes dose-réponse n'ayant pas d'asymptotes horizontales.

Pour déterminer des concentrations d'effet critique, l'US EPA (1994, 2012) et l'EFSA (2018, 2022) préconisent désormais l'approche *Benchmark Dose* (BMD - ou dose repère en français). La BMD est la dose (ou concentration) qui entraîne une réponse limitée pré-définie appelée *Benchmark Response* (BMR) (Crump, 1984, 1995). La  $BMD_{zSD}$ , la version de la BMD la plus recommandée (EFSA, 2018), est définie comme la dose qui mène à une BMR correspondant à un écart à la réponse chez le témoin de z fois l'écart-type résiduel SD (*Standard Deviation* selon la formulation anglaise) du modèle dose-réponse (souvent avec  $z = 1$ , ou  $z = 2$ , EFSA, 2018) (Figure 4, en bas). Les BMD ainsi définies sont calculables quelle que soit la forme de la courbe dose-réponse.

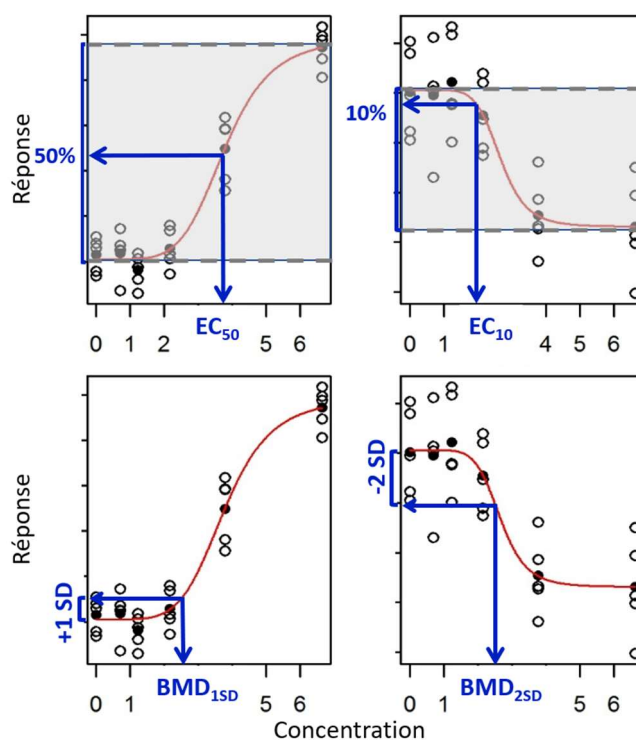


Figure 4 - Exemples de calcul de concentrations d'effet critique (CEC).

### 2.3.4 Modèles TKTD et DEBtox

Les modèles TKTD décrivent les effets toxiques au cours du temps, en couplant un modèle toxicocinétique (TK), qui porte sur l'internalisation d'un contaminant dans des organismes et un modèle toxicodynamique (TD), qui explique comment la concentration internalisée se traduit en termes d'effets toxiques. Ces effets altèrent la survie des organismes dans les modèles GUTS (Jager et al., 2011), ou leur budget énergétique dans les modèles DEBtox (Kooijman et Bedaux, 1996).

Un budget énergétique décrit de manière formalisée et simplifiée comment un organisme acquiert son énergie à partir de nourriture et l'alloue aux fonctions métaboliques majeures, que sont la maintenance, la croissance et la reproduction (Jager et Zimmer, 2012). La théorie *Dynamic Energy Budget* (DEB, Budget énergétique dynamique, Kooijman, 2000) fournit un cadre conceptuel mécaniste pour interpréter les effets de contaminants sur les fonctions vitales des organismes ectothermes et leur chronologie. Elle décrit comment le métabolisme est modulé au cours du cycle de vie, avec trois stades pris en compte : le stade embryonnaire, caractérisé par l'absence de nutrition, le stade juvénile, avec le démarrage de la nutrition et la maturation, et le stade adulte, après la puberté, marqué par l'arrêt de la maturation et le début la production de descendance. La théorie DEB quantifie, sur la base d'hypothèses biologiques, biophysiques et physico-chimiques, les flux d'énergie entre des processus clés (voir l'HDR de Frédéric Alonzo (2019) pour une description particulièrement abordable). Par exemple, l'ingestion est supposée proportionnelle à une surface corporelle, les coûts de croissance et de maintenance sont supposés proportionnels à un volume corporel (les organismes doivent croître/se maintenir en trois dimensions), etc. La théorie DEB fournit des équations différentielles décrivant la dynamique de la réserve d'énergie et son allocation à la croissance et à la reproduction.

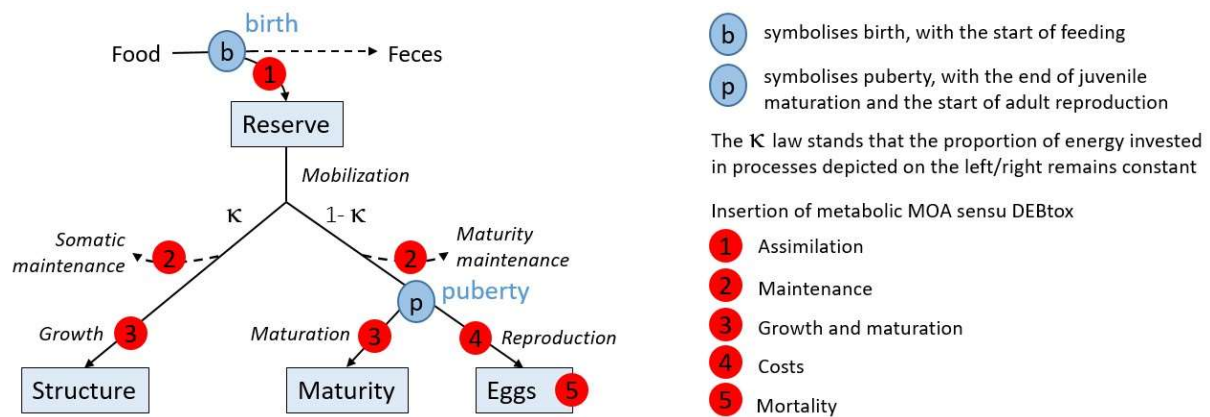


Figure 5 - Diagramme conceptuel des flux métaboliques au niveau individuel selon la théorie DEBtox. Adapté de Jager et Zimmer (2012) et de Alonzo (2019).

Les modèles DEBtox (modèles DEB appliqués à la toxicologie) décrivent comment la toxicité va opérer en perturbant différents processus métaboliques. Suivant le principe de conservation de la masse et de l'énergie, tout coût métabolique additionnel affectant un processus va avoir des répercussions sur les autres processus. En particulier, cela va avoir des conséquences sur les traits d'histoire de vie des organismes, avec une croissance et/ou une reproduction retardée ou réduite. Ainsi, il est possible d'inférer, à partir des traits d'histoire de vie mesurés au cours du temps, quel est le mécanisme métabolique sous-jacent. Les cinq modes d'action métaboliques proposés dans le DEBtox sont 1) une réduction de l'assimilation, 2) une augmentation des coûts de maintenance somatique et de la maturité, 3) une augmentation des coûts de croissance et de maturation, 4) une augmentation des coûts de production des œufs et 5) une augmentation de la mortalité durant l'ovogénèse. La Figure 5 représente les flux métaboliques clés considérés par la théorie DEBtox et comment ils peuvent être perturbés selon les hypothèses DEBtox.

Depuis les premiers développements (Kooijman et Bedaux, 1996), la modélisation DEBtox a été appliquée dans nombre d'études, pour analyser les effets de contaminants variés (métaux, pesticides, radionucléides,

etc.) chez divers groupes taxonomiques, principalement invertébrés mais aussi des poissons (Klok et al., 1997, Péry et al., 2003, Jager et al., 2007, Augustine et al., 2012, pour n'en citer que quelques uns). Dans la plupart des applications, le challenge est d'identifier le principal mode d'action métabolique sous-jacent à l'apparition d'effets au niveau des traits d'histoire de vie. La modélisation DEBtox a aussi été utilisée pour comparer les effets observés sous différents scénarios d'exposition (exposition pulsée ou constante, Pieters et al., 2006, Billoir et al., 2012), ou pour aborder les effets de mélanges de contaminants (Baas et al., 2010, Jager et al., 2010). Enfin, le couplage de la modélisation DEBtox avec des modèles matriciels de population permet d'intégrer tous les effets délétères âge- ou stade-spécifiques en un indicateur populationnel (Klanjscek et al., 2006, Billoir et al., 2007).

### 2.3.5 Modèles matriciels de population

En écologie, la dynamique des populations a pour objet l'étude des variations au cours du temps des effectifs des populations et la compréhension des influences environnementales. En écotoxicologie, les modèles de dynamique des populations permettent notamment un changement d'échelle en extrapolant des effets toxiques évalués à l'échelle des organismes vers une échelle plus pertinente écologiquement (Forbes et al., 2008). Il existe trois principales catégories de modèles de population (Accolla et al., 2021) : les modèles de population non structurés, structurés, et les *Agent-Based Models* (ABM, Modèle agents-centrés). Dans les modèles non-structurés, il n'y a pas de distinction explicite entre tous les individus de la population. Au contraire, les modèles structurés prennent en compte une structuration de la population, définie par des classes d'âge, des classes de tailles ou des stades de développement. Enfin, dans les ABM, chaque individu est considéré et peut différer des autres individus.

Je vais ci-après présenter les modèles matriciels de population, qui sont ceux utilisés dans ce mémoire et qui font partie des modèles structurés. Dans ces modèles mécanistes en temps discret, introduits par Leslie (1945, 1948), la population est divisée en classes (ou stades), et les individus passent de l'une à l'autre à chaque pas de temps selon les taux de transition du graphe de cycle de vie considéré, dont un exemple est donné en Figure 6. Pour une population structurée en classes d'âge, les taux de transition sont : les taux de survie d'une classe  $i$  à la suivante, notés  $P_i$  et les taux de fécondité, notés  $F_i$ , c'est-à-dire le nombre de jeunes atteignant la première classe par femelle de la classe  $i$ .

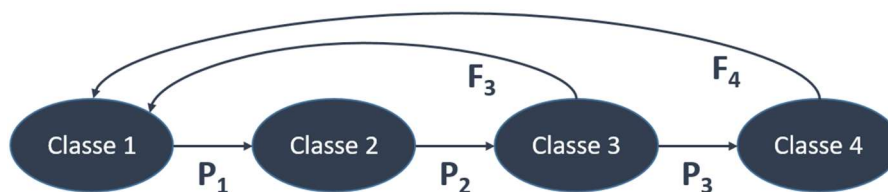


Figure 6 - Exemple de graphe de cycle de vie : cas d'une population structurée en quatre classes d'âge, dont les deux dernières sont capables de reproduction.

Soit  $\mathbf{N}(t)$  le vecteur représentant la population au temps  $t$ , les éléments de ce vecteur étant les effectifs de chaque classe  $i$ . Au temps  $t + 1$ , les effectifs de chaque classe sont calculés par le produit matriciel suivant :

$$\mathbf{N}(t + 1) = \mathbf{L} * \mathbf{N}(t) \quad (\text{Equation 2.1})$$

Avec  $\mathbf{L}$  la matrice de transition (aussi appelée matrice de projection ou matrice de Leslie), selon le graphe de cycle de vie. Les taux de survie  $P_i$  apparaissent sur la sous-diagonale et les taux de fécondité  $F_i$  sur la première ligne. Par exemple, pour le cycle de vie de la Figure 6, où la reproduction démarre dans la troisième classe d'âge :

$$\mathbf{L} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & F_3 & F_4 \\ P_1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & P_2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & P_3 & 0 \end{bmatrix} \quad (\text{Equation 2.2})$$

Les matrices de Leslie sont établies à partir de données démographiques, toutes leurs composantes sont donc positives ou nulles. Le théorème de Perron-Frobenius nous assure de l'ergodicité du système (c'est-à-dire qu'un état asymptotique sera atteint par le modèle indépendamment des conditions initiales), et permet d'obtenir les caractéristiques de la population (Caswell, 2001). Il s'énonce comme suit :

*Théorème - Si  $\mathbf{L}$  est une matrice primitive ( $\mathbf{L}^k > 0$  pour  $k > 0$ ), alors il existe une valeur propre réelle  $\lambda$  strictement positive et supérieure à toutes les autres en module. Les vecteurs propres à droite  $\mathbf{w}$  et à gauche  $\mathbf{v}$  associés à  $\lambda$  sont eux aussi réels et strictement positifs.*

Ces objets mathématiques peuvent être interprétés en dynamique des populations comme suit :

- $\lambda$ , valeur propre dominante de  $\mathbf{L}$ , est le taux d'accroissement asymptotique de la population
- $\mathbf{w}$ , vecteur propre à droite de  $\mathbf{L}$  associé à  $\lambda$ , donne la distribution des classes en régime asymptotique
- $\mathbf{v}$ , vecteur propre à gauche de  $\mathbf{L}$  associé à  $\lambda$ , donne les valeurs reproductives en régime asymptotique

Ces indicateurs démographiques, obtenus par l'étude analytique des modèles matriciels, leur confèrent un caractère générique.

Les modèles matriciels ont été utilisés en écotoxicologie afin de comprendre les effets des contaminants observés lors de bioessais individuels sur la dynamique des populations (Caswell, 1996). De nombreuses études ont utilisé ces modèles pour proposer une interprétation des effets au niveau populationnel, parfois en les couplant avec des modèles TKTD (e.g. Lopes et al., 2005, Billoir et al., 2007, Charles et al., 2009, Mauritsson et al., 2022). Des analyses de sensibilité permettent en outre d'évaluer l'importance des différents taux de transition dans la dynamique de population.

### 2.3.6 SSD

Les *Species Sensitivity Distributions* (SSD, Distributions de sensibilité des espèces) sont des modèles descriptifs de la diversité interspécifique en termes de sensibilité à un contaminant. Elles sont utilisées en écotoxicologie pour extrapoler la sensibilité d'une communauté (ou d'un assemblage d'espèces) à partir des sensibilités des organismes de différentes espèces.

Formellement, une SSD est une fonction de répartition (*Cumulative Distribution Function* en anglais), la variable aléatoire considérée étant un indicateur de sensibilité d'une espèce parmi un assemblage d'intérêt. Une SSD modélise, pour un contaminant donné, la distribution des CEC obtenues pour plusieurs espèces (Figure 7). Ainsi il est possible d'estimer la concentration d'exposition à ne pas dépasser afin de préserver un fort pourcentage des espèces de l'assemblage, et de n'affecter qu'un faible pourcentage (x%, souvent fixé à 5%) d'espèces. Cette concentration est appelée *Hazardous Concentration* (HC, Concentration dangereuse) pour x% des espèces. A l'inverse, il est possible d'estimer la fraction d'espèces potentiellement affectées à une concentration d'exposition donnée (PAF, pour *Potentially Affected Fraction*).

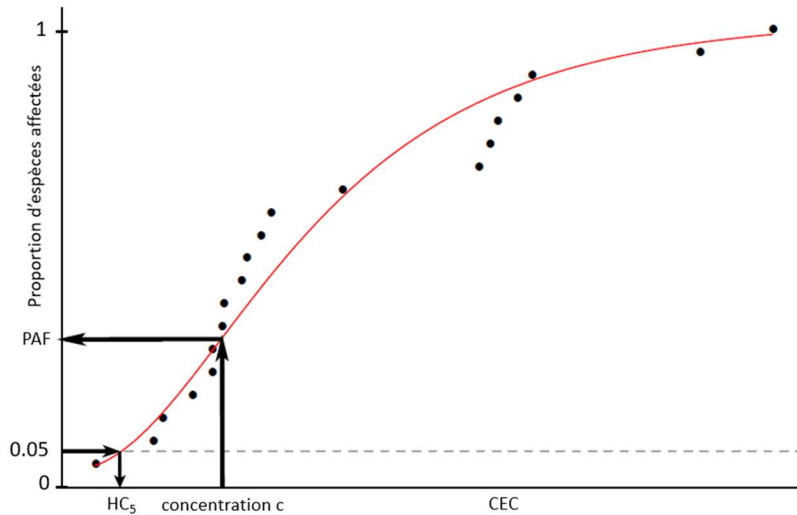


Figure 7 - Exemple de SSD ajustée (courbe rouge) à la distribution cumulée des concentrations d'effet critique (CEC) de 20 espèces (points noirs). D'après Baillard (2021).

L'utilisation du concept de SSD en écotoxicologie repose sur de nombreuses hypothèses (Forbes et Calow, 2002). Pour ne mentionner que quelques points théoriques relevant de l'écologie :

- Les interactions entre espèces n'influencent pas la SSD.
- La perte d'une espèce ou d'une autre est d'importance égale.
- La structure de la communauté, et non ses fonctions, est la cible de la protection.

L'utilisation du concept de SSD inclut également, implicitement, toutes les hypothèses inhérentes aux CEC et aux bioessais dont elles sont dérivées, notamment que la sensibilité d'une espèce, quantifiée au laboratoire, est représentative de sa sensibilité sur le terrain. Pour des détails sur l'historique, le concept et la méthodologie des SSD, l'état de l'art de la thèse de Vincent Baillard (2021) est une excellente ressource.

Les SSD n'ont pas les vertus des modèles mécanistes, à savoir la possibilité offerte d'explorer les mécanismes pris en compte. Néanmoins, cet outil est très utilisé en écotoxicologie, il est reconnu par de nombreuses instances réglementaires (US EPA, REACH, European Plant Protection Product Regulation, etc.). En effet, il est pratiquement le seul à disposition pour aborder l'échelle des communautés, qui est pourtant la cible des mesures de protection en évaluation du risque. Les processus d'interaction au sein de communautés sont tellement complexes que les développements de modèles mécanistes de communautés portent sur des systèmes simplifiés (par exemple, Lamonica et al., 2023) ou sont spécifiques à des situations particulières (cf Larras et al., 2022).



## 3 Modélisation en écologie stœchiométrique des communautés

### 3.1 Contexte

L'écologie des communautés étudie l'organisation entre différents taxons partageant un même espace, et l'influence des facteurs abiotiques. Elle a pour but de comprendre et idéalement de prédire comment une communauté répond à divers contextes environnementaux. Ce chapitre s'inscrit dans la lignée de « l'approche traits » développée au LIEC sous l'égide de Philippe Usseglio-Polatera. Les travaux menés pour comprendre la réponse des communautés face aux changements globaux étudient non seulement la structure des communautés mais également les fonctions qu'elles assurent. Ces fonctions sont évaluées au travers des traits bio-écologiques des taxons en présence. Une large base de données des traits dits « fonctionnels » des taxons de macro-invertébrés benthiques est d'ores et déjà disponible (Tachet et al., 2010). Des travaux engagés ces dernières années visent à y ajouter des traits dits « stœchiométriques », à savoir les compositions élémentaires en C, N et P (exprimées en %) et les ratios N:P, C:N et N:P des tissus corporels des organismes. C'est dans ce contexte, et en particulier dans le projet IUF (Institut Universitaire de France) de Michaël Danger « *Stoichiometric traits as Predictors of Aquatic Community and Ecosystem responses to global changes (SPACE)* » (2017-2022), que s'est intégrée la thèse de Miriam Beck (2018-2021, Direction Michaël Danger, Co-direction Elise Billoir), financée par Lorraine Université d'Excellence.

La Théorie de la Stœchiométrie Ecologique (EST, *Ecological Stoichiometry Theory*) offre un cadre conceptuel pour étudier l'équilibre et les flux d'éléments (i.e. de nutriments) entre les organismes et l'environnement. Les traits stœchiométriques ont pu être liés avec succès à la qualité des ressources ou à des traits fonctionnels des taxons, notamment le taux de croissance et le groupe trophique des organismes. Néanmoins, jusqu'à présent, la plupart des études n'ont pas dépassé le niveau du taxon et les liens explicites entre la structure des communautés, sa stœchiométrie et la disponibilité en nutriments restent rares.

L'objectif de la thèse de Miriam Beck était d'étudier si - et dans quelle mesure - l'intégration de traits stœchiométriques dans les analyses de communautés pouvait améliorer notre compréhension de leur réponse aux changements de concentrations en nutriments. En prenant pour communautés modèles les macroinvertébrés des cours d'eau, elle s'est appuyée sur trois types de données : des traits stœchiométriques (base de données construite dans le cadre de cette thèse), des traits fonctionnels et des listes faunistiques issues de prélèvements de communautés de macroinvertébrés en France.

J'ai choisi de présenter ici deux études parmi les nombreux travaux de Miriam. Ce chapitre est donc organisé en trois parties :

- Une étude large-échelle temporelle permise par le suivi durant 34 ans d'un site sur la Loire moyenne. La réduction des intrants phosphatés sur la période en fait un cas d'école pour étudier les liens entre stœchiométrie des communautés, traits fonctionnels et concentration en nutriments dans l'environnement.
- Une étude large-échelle spatiale à l'échelle de la France métropolitaine, cette fois en s'appuyant sur les suivis de routine dans le cadre de la DCE (Directive Cadre sur l'Eau).
- Une partie de bilan et perspectives.



## 3.2 Analyse d'un suivi de long terme (34 ans) sur un site de la Loire

### 3.2.1 Introduction

Dans de nombreux écosystèmes à travers le monde, les changements de concentration et d'abondance relative des nutriments (C, N, P, C:N, C:P, N:P) constituent un facteur de stress majeur (Penuelas et al., 2013, Battye et al., 2017). Mis à part les effets toxiques à très fortes concentrations, les effets sur les communautés de consommateurs sont surtout indirects, *via* le changement des ressources disponibles (Evans et Sanderson, 2018, Nessel et al., 2021).

Dans un environnement donné, les taxons sont sélectionnés sur la base de leurs préférences (par exemple pour des ressources alimentaires ou pour des habitats) et de leurs tolérances (par exemple vis-à-vis de pollutions). Sont favorisés les taxons pour lesquels le décalage entre les conditions environnementales et les besoins des individus est le plus faible. Des déséquilibres, par exemple entre qualité des ressources et demande nutritionnelle des organismes, peuvent apparaître dans des conditions environnementales changeantes en termes de concentrations en nutriments (N, P). Alors les taxons les moins adaptés disparaîtront, laissant la communauté évoluer vers des taxons plus tolérants aux nouvelles conditions (Ortiz et Puig, 2007, Friberg et al., 2010). Ainsi la Théorie de la Stœchiométrie Ecologique (EST) prévoit que les abondances de taxons riches en P augmentent avec le niveau de P dans l'environnement, aboutissant à une augmentation du contenu en P à l'échelle de la communauté (Singer et Battin, 2007, Teurlinckx et al., 2017). De même, en cas de réduction de la concentration en P dans l'environnement, la stœchiométrie de la communauté devrait suivre.

Dans le cadre de l'EST, une deuxième hypothèse est la *Growth Rate Hypothesis* (GRH) qui stipule que des conditions riches en P sont favorables aux organismes à croissance rapide (Elser et al., 1996). En effet, la GRH suppose que les besoins en P des organismes résultent principalement, et en particulier pour les invertébrés, de leur besoin en ARN ribosomal. De forts taux de croissance vont de paire avec une forte demande en ARN ribosomal, riche en P, essentiel pour la synthèse des protéines nécessaires à la croissance, c'est-à-dire l'augmentation de la taille et de la masse d'un organisme. Cela signifie que les organismes à croissance rapide vont avoir des ratios C:P et N:P plus faibles (%P plus élevé, relativement à %C et %N) que des organismes à croissance lente. Ce lien entre taux de croissance et stœchiométrie a été confirmé pour de nombreux organismes, des microbes aux crustacés (Elser et al., 2003, Acharya et al., 2004).

Dans un des chapitres de sa thèse, basé sur des données issues du suivi de six stations dans les Vosges, Miriam Beck a proposé d'étendre la GRH au taux « de développement » des espèces, en considérant des traits liés au développement tels que la durée de vie, le voltinisme (i.e. le nombre de générations par an), et le nombre de cycles de reproduction par individu. Ses résultats ont montré que l'hypothèse se vérifie : les conditions riches en P sont favorables aux taxons riches en P, qui s'avèrent être aussi des taxons à développement rapide (Beck et al., 2021), caractérisables notamment par une durée de vie courte (< 1 an), et un multivoltinisme.

En résumé, il existe des liens entre traits stœchiométriques (i.e. composition élémentaire en C, N et P des organismes) et traits fonctionnels des taxons, non seulement les traits de développement précédemment cités mais aussi des traits liés à l'alimentation ou à l'habitat (Beck et al., 2022). Cela souligne l'intérêt d'intégrer

la stœchiométrie aux études d'écologie des communautés pour mieux comprendre et prédire les réponses taxonomiques et fonctionnelles des communautés aux changements globaux.

La présente étude est basée sur un suivi de long terme d'un site de la Loire moyenne caractérisé par une réduction de la concentration en P dans l'eau au cours des décennies (1980-2013). Dans ce contexte, nous avons émis les hypothèses suivantes :

- La stœchiométrie à l'échelle de la communauté suit la tendance temporelle observée dans l'environnement, le %P à l'échelle de la communauté va donc réduire au cours du temps.
- Les modalités de traits liées à une croissance rapide et un développement rapide (tels qu'une petite taille maximum, une courte durée de vie, un grand nombre d'évènements de mue) sont associées à de forts %P dans les tissus (GRH), les deux étant positivement associés à la concentration en P dans l'eau.

### 3.2.2 Matériel et méthodes

#### Jeux de données

Le site d'étude est situé dans la section haute de la Loire moyenne en France. Les paramètres hydro-climatiques (température, débit) ont été mesurés à Dampierre-en-Burly (47.4°N ; 2.1°E) continument sur la période 1980-2013, du fait d'une surveillance règlementaire liée à la centrale nucléaire EDF positionnée en aval du site d'étude. Des informations sur la chimie de l'eau (NO<sub>3</sub>, PO<sub>4</sub>) ont été obtenues auprès de l'agence de l'eau Loire-Bretagne. Les concentrations en nutriments ont été mesurées tous les mois.

La communauté d'invertébrés a été échantillonnée à Dampierre-en-Burly quatre fois par an (sauf pour 2008 avec seulement trois échantillonnages), fournissant au total 135 prélèvements sur la période entre 1980 et 2013. La plupart des échantillonnages ont été conduits en été (entre juin et septembre), avec quelques exceptions s'étalant d'avril à novembre. Les invertébrés ont été échantillonnés selon le protocole IQBG (Indice de Qualité Biologique Globale) entre 1980 et 1994 et selon le protocole normalisé IBGN (Indice Biologique Global Normalisé) entre 1995 et 2013. Les taxons Bryozoa, Hydrozoa, Hydrachnidia, Nematoda, Oligochaeta et Porifera ont été exclus pour éviter les biais d'identification ou de quantification. Pour les autres groupes, la résolution taxonomique a été harmonisée à la famille, cette opération aboutissant à 108 taxons considérés dans l'étude. A noter que le jeu de données pour la période 1980-2008 avait déjà été exploité précédemment (Floury et al., 2013, 2017), par des analyses d'écologie des communautés classiques, sans considération de la stœchiométrie.

Les traits stœchiométriques ont été renseignés à partir de la base de données publiée dans Beck et al. (2022). Il s'agit des contenus massiques exprimés en %C, %N, %P et des ratios molaires C:N, C:P et N:P. La base fournit des mesures individuelles obtenues grâce à des échantillonnages sur le terrain, complétées par une recherche dans la littérature (n=1555). La base fournit également des valeurs moyennes calculées pour 188 taxons : 33 espèces, 96 genres, 9 tribus, 6 sous-familles, 42 familles, 1 ordre et 1 classe, selon le niveau d'identification des individus. Des données stœchiométriques sont disponibles pour 85% des effectifs, en moyenne, sur les 135 communautés échantillonnées.

Onze traits biologiques ont été extraits de la base de Tachet et al. (2010), et deux y ont été ajoutés tels que précédemment définis dans Beck et al. (2021). Les traits et leurs catégories sont présentés en Tableau 4. L'information est sous forme de codage flou : l'affinité de chaque taxon pour chaque modalité de trait est décrite par un score allant de 0 (= pas d'affinité) à 5 (= forte affinité). Ces scores sont ensuite transformés en fréquences relatives au sein de chaque trait. Ce codage flou permet de prendre en compte la variabilité pouvant exister au sein d'un taxon, intrinsèquement (par exemple, les ressources alimentaires utilisées peuvent être multiples), ou selon la phénologie (par exemple la taille maximum d'un taxon peut varier selon la saison).

Tableau 4 - Traits et catégories correspondantes.

Trait fonctionnel	Catégories
Stade(s) de vie aquatique	Œuf, larve, nymphe, adulte
Dispersion	Aquatique-actif, aquatique-passif, aérien-actif, aérien-passif
Comportement alimentaire	Collecteur actif, filtreur, perceur, parasite, racleur, déchiqueteur, avaleur/mâcheur
Ressource(s) alimentaire	Animal mort ( $\geq 1$ mm), végétal mort ( $\geq 1$ mm), détritits ( $< 1$ mm), macrophyte, microphyte, microinvertébrés, macroinvertébrés
Durée de vie	$\leq 1$ an, $> 1$ an
Locomotion	Attaché, fouisseur, rampant, interstitiel, nageur
Taille corporelle maximum	$\leq 0.5$ cm, $>0.5-1$ cm, $>1-2$ cm, $>2-4$ cm, $>4$ cm
Evènement(s) de mue	0 mue, 1 mue, 2-4 mues, 5-9 mues, 10-14 mues, 15-19 mues, $\geq 20$ mues
Forme de résistance	Œufs/statoblastes, cocons, diapause/dormance, aucune
Respiration	Tégument, branchies, plastron/spiracle
Cycle(s) de reproduction	1 cycle, 2 cycles, $>2-6$ cycles, $>6$ cycles
Mode de reproduction	Ovoviviparité, œufs isolés, pontes, pontes sur les végétaux ou milieu terrestre, reproduction asexuée
Voltinisme	$<1$ , 1, $>1$

#### Analyse des données

La stœchiométrie à l'échelle de la communauté a été calculée par des moyennes pondérées (*Community weighted mean*, CWM). Les valeurs stœchiométriques (%C, %N, %P, C:N, C:P, N:P) des taxons composant la communauté sont pondérées par les abondances  $\log(n+1)$ -transformées de chaque taxon. La somme des valeurs pondérées est ensuite divisée par la somme des poids pour obtenir la composition stœchiométrique de chaque communauté échantillonnée. Pour les calculs, les ratios (C:N, C:P, N:P) sont préalablement  $\log$ -transformés, comme conseillé par Isles (2020), il s'agit donc de moyennes géométriques. Enfin, les moyennes annuelles sont calculées (sur  $n=4$  sauf pour 2008 où  $n=3$ ).

Les concentrations en  $\text{NO}_3$  et  $\text{PO}_4$ , le ratio N:P ainsi que la température dans l'eau ont été considérés comme des paramètres environnementaux pertinents vis-à-vis des macroinvertébrés aquatiques. Toutes les informations disponibles sur les quatre mois précédant chaque échantillonnage de la communauté ont été moyennées, cette période étant estimée comme le temps de réponse des macroinvertébrés. Comme pour les valeurs stœchiométriques, les moyennes annuelles sont calculées.

Pour détecter les tendances temporelles significatives, des tests de Mann-Kendall ont été appliqués à chaque variable stœchiométrique et à chaque paramètre environnemental. Pour tenir compte de l'autocorrélation présente dans les séries temporelles, la version modifiée par Hamed et Rao (1998) a été utilisée.

Pour investiguer la co-structure entre les traits (fonctionnels et stœchiométriques) et les paramètres environnementaux ( $\text{NO}_3$ ,  $\text{PO}_4$ , N:P et température), une analyse RLQ a été appliquée. Cette extension de l'analyse de co-inertie (Dolédec et Chessel, 1994) permet de relier un tableau décrivant l'environnement (sites x variables environnementales, 'R') à un tableau de traits (traits x taxons, 'Q'), *via* un tableau d'abondances (sites x taxons, 'L'), produisant une ordination simultanée des trois tableaux (Dray et al., 2003, 2014). Les sites dans R et L et les taxons dans Q et L doivent donc être les mêmes. Dans notre contexte, les sites ont été substitués par des années. L'inertie totale indique le lien entre les traits et les paramètres environnementaux, modérés par les abondances. Sa significativité a été estimée par un test de permutation, comme décrit par Dray et Legendre (2008). Les ratios stœchiométriques et les paramètres de chimie de l'eau ont été exprimés sur une échelle log préalablement à l'analyse. Toutes les analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel R (R Development Core Team, 2019, version 3.5.2) et du package ade4 (Dray et Dufour, 2007).

### 3.2.3 Résultats

#### Tendances temporelles des paramètres environnementaux et des traits stœchiométriques

La concentration en  $\text{PO}_4$  dans l'eau décroît significativement sur la période d'étude, malgré une légère ré-augmentation en fin de période (Figure 8). En comparaison à la première décennie (1980-1989, 0.22 mg/L), la concentration moyenne durant la dernière décennie (2004-2013) a décliné de 64% (0.08 mg/L). La concentration en  $\text{NO}_3$  a fluctué selon les années, mais sans tendance claire. Le ratio N:P a augmenté de manière significative sur la période, de plus d'un facteur 5 entre la première et la dernière décennie, avec un pic entre 2002 et 2004. Enfin, on observe également sur la période une tendance significative d'augmentation de la température.

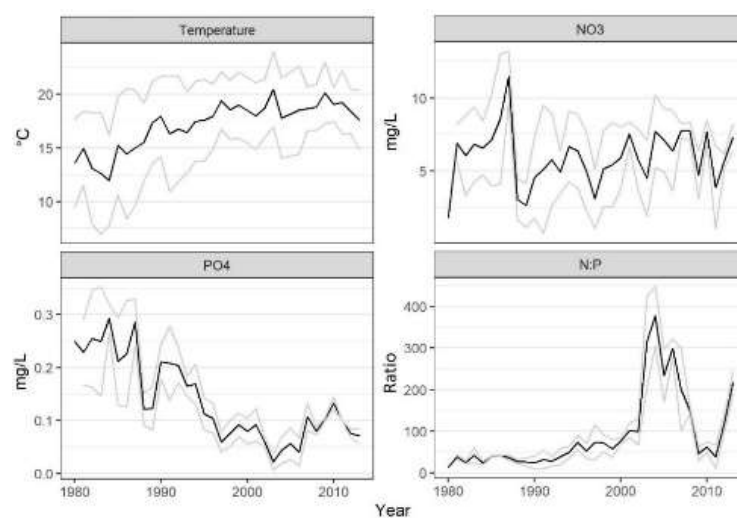


Figure 8 - Paramètres environnementaux (température, concentrations de  $\text{NO}_3$ ,  $\text{PO}_4$  et leur ratio) sur la période 1980-2013. Les lignes noires représentent les valeurs moyennes annuelles. Les lignes grises représentent les moyennes  $\pm$  l'écart type. Le nombre de mesures par an est de  $n=4$ , sauf pour 2008 où  $n=3$ . Les valeurs de ces paramètres sont calculées en considérant les quatre mois précédant les dates d'échantillonnage des communautés.

Toutes les variables stœchiométriques à l'échelle de la communauté montrent une tendance temporelle significative sur la période 1980-2013. Cette tendance est à la baisse pour le %C, le %N et le %P, à la hausse pour les ratios C:N, C:P et N:P (Figure 9).

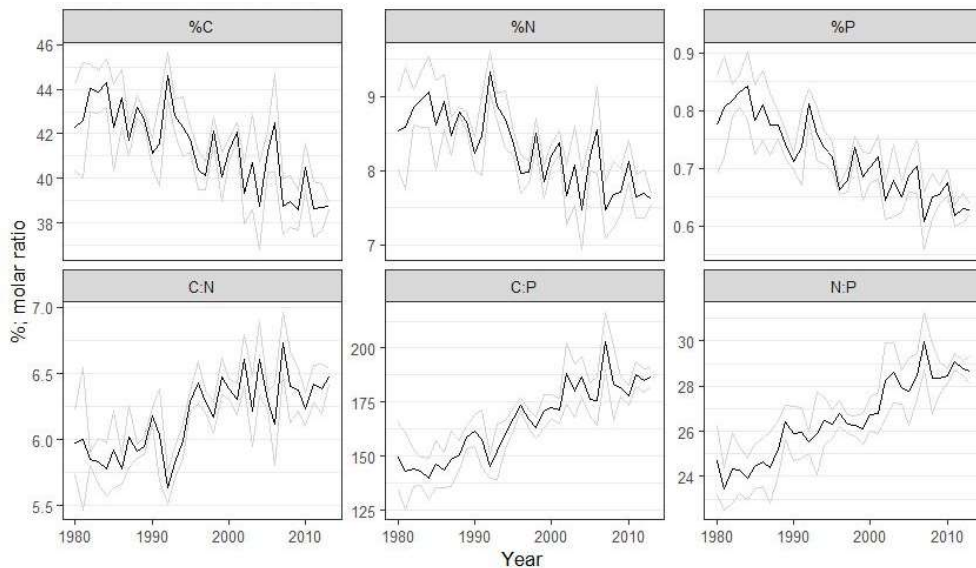


Figure 9 - Variables stœchiométriques à l'échelle de la communauté (%C, %N, %P, C:N, C:P, N:P) sur la période 1980-2013. Les lignes noires représentent les valeurs moyennes annuelles. Les lignes grises représentent les moyennes  $\pm$  l'écart type. Le nombre de mesures par an est de  $n=4$ , sauf pour 2008 où  $n=3$ .

#### Liens entre paramètres environnementaux, traits stœchiométriques et fonctionnels

Le lien entre les paramètres environnementaux de l'eau, et les traits stœchiométriques et fonctionnels est statistiquement significatif ( $p < 0.05$ ). La grande majorité de la co-structure (95.2%) est décrite par le premier axe de l'analyse RLQ (axe des ordonnées de la Figure 10, que nous appellerons par la suite F1), qui sépare la concentration en P dans l'eau (partie basse de l'axe en Figure 10A) du ratio N:P et de la température (partie haute de l'axe en Figure 10A), représentant ainsi les tendances globales du jeu de données. Compte tenu de sa prépondérance, la suite des résultats se focalise sur les contributions des catégories de traits dans la définition de ce premier axe F1 uniquement. Le positionnement des années le long de F1 suit clairement un gradient, illustrant la tendance temporelle sous-jacente (Figure 10B).

Les traits stœchiométriques, %C, %N et %P corporels, sont tous positivement reliés au P (et au N) dans l'eau (Figure 10C). Les ratios C:N, C:P et N:P corporels varient quant à eux dans la direction opposée, positivement reliés au N:P dans l'eau et à la température. La proportion d'invertébrés de grande taille ( $> 4$  cm) est positivement liée au N:P dans l'eau (Figure 10D), alors que la classe de taille  $>0.5-1$  cm est à l'opposé associée aux fortes valeurs de P dans l'eau. Les autres classes de taille ont une position plutôt centrale le long de F1. Parmi les autres catégories de traits fortement impliqués dans le lien entre variables environnementales et traits fonctionnels, on peut noter, du côté de F1 associé à P dans l'eau : durée de vie courte ( $\leq 1$  an), polyvoltinisme ( $> 1$  générations par an), un unique cycle de reproduction, et un grand nombre de mues (15-19 mues,  $\geq 20$  mues) (Figure 10D). Ces traits relatifs à un développement rapide sont également associés aux catégories suivantes : larve aquatique, dispersion aérienne passive, œufs et statoblastes comme forme de résistance et un comportement alimentaire de type collecteur de débris (Figure 10E+F).

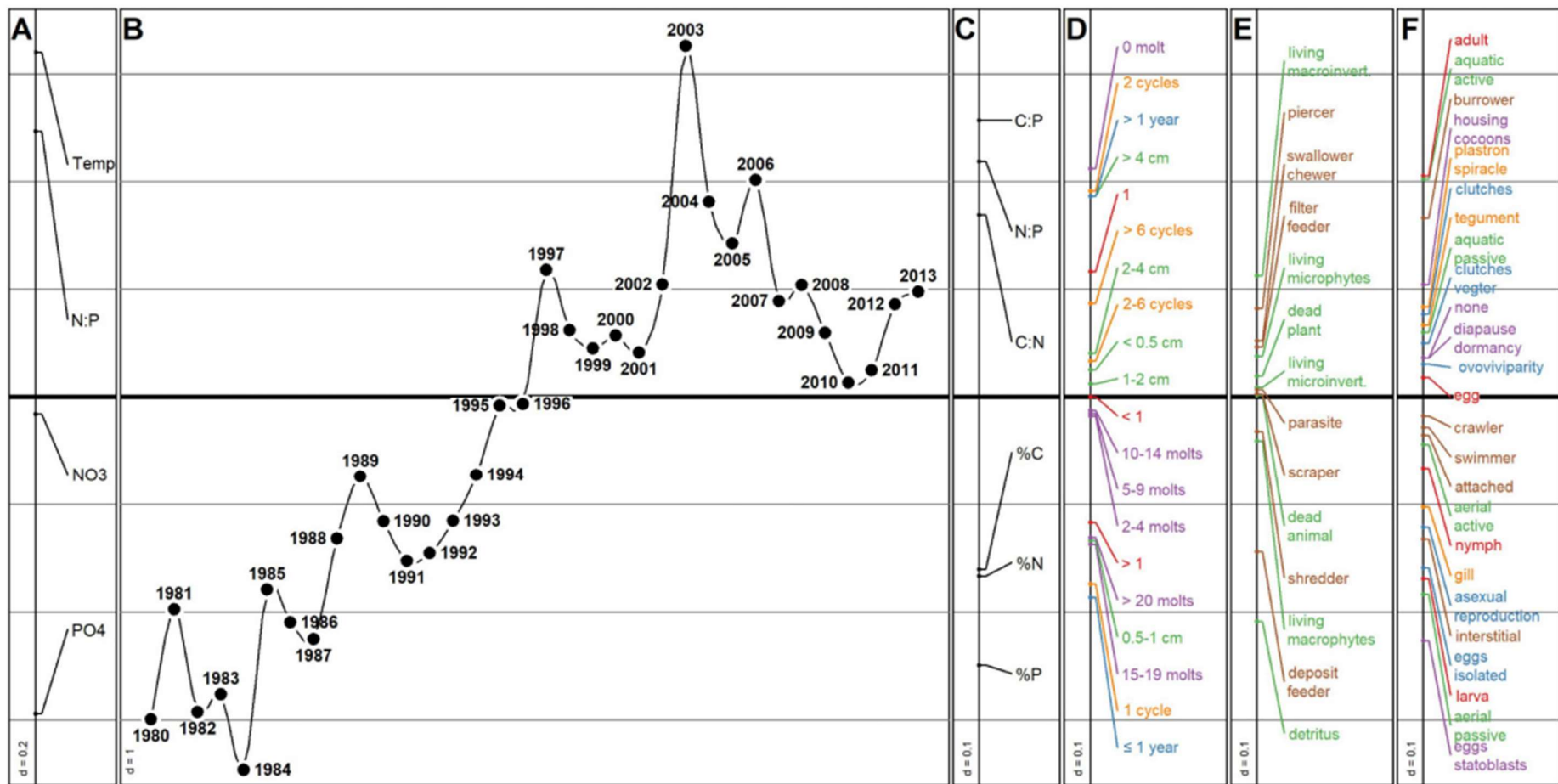


Figure 10 - Positions le long du premier axe de l'analyse RLQ (95.2% de la co-inertie) a) des paramètres environnementaux ( $PO_4$ ,  $NO_3$ , N:P et température dans l'eau), c-f) des catégories de traits. Les catégories de traits ont toutes eu une part égale dans l'analyse, et sont représentées dans différentes sous-figures pour une meilleure lisibilité (traits stœchiométriques (c), traits relatifs au développement (d), à l'alimentation (e) et autres (f)). La sous-figure (b) montre chronologiquement la position des années le long du premier axe de l'analyse RLQ.



Du côté opposé de F1, associé à N:P et à la température dans l'eau, on retrouve les catégories : durée de vie longue ( $> 1$  an), monovoltinisme ( $< 1$  génération par an), organismes avec plusieurs évènements de reproduction par individu (surtout 2 cycles), et un développement direct (0 mue) (Figure 10D). De tels organismes affichent aussi un stade adulte aquatique, un comportement alimentaire déchetueur et avaleur/mâcheur, des macroinvertébrés comme source de nourriture, et un mode de dissémination aquatique actif.

### 3.2.4 Discussion

Le %P de la communauté de macroinvertébrés a décliné significativement au long de la période d'étude. Il a donc suivi le déclin de la concentration en P dans l'eau, en accord avec notre hypothèse initiale et avec les études préalables (Prater et al., 2015, Singer et Battin, 2007, Teurlinckx et al., 2017). Les autres variables stœchiométriques à l'échelle de la communauté ont aussi montré des tendances significatives. Ces changements sont vraisemblablement dus à un glissement, dans la communauté, vers des groupes taxonomiques moins riches en P au cours de la période. L'augmentation du C:N et du C:P dans la communauté est allée de paire avec des proportions croissantes de bivalves et de gastéropodes, deux groupes qui ont généralement des C:N et C:P corporels plus importants que les autres (Beck et al., 2022). La proportion d'insectes, qui sont relativement riches en P, a diminué au cours de la période d'étude, parallèlement au %P à l'échelle de la communauté.

Les six traits stœchiométriques ont montré une forte association au premier axe de l'analyse RLQ et semblent plus affectés par les paramètres environnementaux étudiés que les autres traits fonctionnels, qui ont probablement un déterminisme plus multifactoriel. Les corrélations trouvées avec les autres traits sont en accord avec nos hypothèses basées sur la théorie de la stœchiométrie écologique (EST) et avec les résultats déjà rapportés dans la littérature. Les taxons avec de forts %P corporels et exprimant des traits indicateurs d'une croissance ou d'un développement rapide, souvent considérés comme des stratégies r (Southwood, 1977), sont positivement reliés aux fortes concentrations en P dans l'eau. Dans notre contexte ils avaient donc de fortes abondances au début de la période d'étude. Ensuite, la communauté a évolué vers des traits indicateurs d'une croissance ou d'un développement lent et vers de forts N:P corporels. Ces résultats sont en accord avec la *Growth Rate Hypothesis* (GRH).

Le long des concentrations environnementales en P décroissantes, les comportements alimentaires au sein de la communauté sont bouleversés, au détriment des collecteurs de détritus et au profit des caractéristiques de prédateurs (déchetueur, avaleur/mâcheur, et macroinvertébrés comme nourriture). Un déclin des collecteurs de détritus a déjà été observé sous le même scénario environnemental de diminution du P dans l'eau (Floury et al., 2013, Latli et al., 2017), mais ces travaux ont reporté soit une absence d'effet sur les prédateurs, soit un effet négatif, en opposition avec nos résultats. Généralement, les réponses des prédateurs observées face à un enrichissement en nutriments ont été divergentes (Hulot et al., 2000, McCormick et al., 2004, Murphy et al., 2012, Demi et al., 2019), et sont probablement guidées non seulement par la qualité des proies mais aussi par leur quantité. Enfin, un comportement alimentaire de type prédateur a été lié à la teneur corporelle en N (Fagan et al., 2002, Cross et al., 2003, Beck et al., 2021), mais pas à celle en P. Bien que dans notre étude ce lien est ressorti parmi les plus forts concernant les traits liés à l'alimentation (Figure 10E), ces derniers ne contribuent que modestement à l'analyse RLQ.

De manière concomitante à la diminution du P dans l'eau, la température a significativement augmenté. On pourrait donc se demander si les changements observés à l'échelle de la communauté ne sont pas causés par ce réchauffement. D'après de précédentes études, les taxons à croissance ou à développement rapide sont favorisés lorsque les températures augmentent (Daufresne et al., 2009, Yvon-Durocher et al., 2011). Compte tenu des liens attendus entre vitesse de croissance et besoins en P (GRH), la hausse de température devrait aussi sélectionner les taxons riches en P, et donc accroître le %P à l'échelle de la communauté. En résumé, les effets attendus de la hausse de la température sont à l'inverse de ceux attendus considérant la baisse du P dans l'eau. Dans notre étude, les résultats sont en ligne avec la diminution du P dans l'environnement, suggérant que cette diminution a eu davantage d'impact sur la composition stœchiométrique de la communauté que la hausse de température.



## 3.3 Etude à large échelle spatiale en France métropolitaine

### 3.3.1 Introduction

Cette étude s'inscrit dans le même contexte que la précédente, c'est-à-dire dans le cadre de la théorie de la stœchiométrie écologique (EST). Supposant que la composition élémentaire corporelle indique la demande nutritionnelle des organismes, les abondances de taxons riches en P vont croître avec un niveau croissant de P dans l'environnement. Ici, il est important de souligner que jusqu'à présent, les études à l'échelle de communautés entières sont rares, et limitées à quelques sites (e.g. Beck et al., 2021, 2023) ou à des installations où N et P dans l'eau sont manipulés expérimentalement (e.g. Demi et al., 2019). Aucune étude n'a explicitement investigué la stœchiométrie d'une communauté de consommateurs à une large échelle spatiale.

La présente étude a analysé les effets des concentrations en N et en P dans l'eau sur la stœchiométrie de la communauté d'invertébrés présents dans les petits cours d'eau. Nous avons aussi regardé des sous-communautés, correspondant à des groupes taxonomiques larges (classes), diversifiés en termes de traits stoichiométriques. Le mécanisme supposé de sélection des taxons est l'altération de la qualité et/ou de la quantité de ressources basales. En effet, contrairement aux consommateurs, les producteurs primaires ne sont pas homéostatiques, et peuvent constituer une ressource de qualité nutritionnelle variable (notamment au regard de la teneur en P et en N) pour les macroinvertébrés des cours d'eau, en fonction des conditions environnementales. Dans ce contexte, nous avons émis les hypothèses suivantes :

- Le %P à l'échelle de la communauté entière devrait être plus élevé dans les sites où la concentration en P dans l'eau est élevée.
- Les traits stœchiométriques étant diversifiés à l'intérieur des groupes taxonomiques considérés, on peut s'attendre à la même tendance au sein des sous-communautés correspondantes.

La présente étude repose sur un jeu de données de plus de 1300 opérations d'échantillonnage dans toute la France, contenant de l'information sur les abondances de macroinvertébrés et sur la chimie de l'eau.

### 3.3.2 Matériel et Méthodes

#### Jeux de données

Dans le contexte de la DCE, les assemblages de macroinvertébrés benthiques présents dans les cours d'eau Français sont suivis en routine au moyen de procédures standardisées (AFNOR NF T90-333, 2016, pour l'échantillonnage sur le terrain, AFNOR NF T90-338, 2020, pour le tri et l'identification). Cela a permis de consolider un jeu de données faunistique standardisé de grande taille, comprenant la composition taxonomique et l'abondance des macroinvertébrés lors d'opérations d'échantillonnage dans les petits cours d'eau de toute la France, entre 2004 et 2017. Le niveau d'identification est en général le genre (pour Bivalvia, Gastropoda, Insecta, et Malacostraca), sauf certains taxons identifiés au niveau de la famille (Diptera, Hirudinea, Turbellaria). Les Oligochaeta et Nematoda sont déterminés comme tels.

Le jeu de données faunistique a été combiné avec un deuxième jeu de données décrivant, pour les mêmes opérations d'échantillonnage (une station donnée à une date donnée), 17 catégories de pression, dont dix sont liées à la chimie de l'eau. Pour chaque opération, chaque catégorie de pression est associée à une classe de qualité, « mauvais », « médiocre », « moyen », « bon » ou « très bon ». De manière à éviter, dans notre étude, les situations de forte pollution, nous n'avons sélectionné que les opérations avec une classe de qualité « très bon », « bon » ou « moyen » pour les pressions suivantes, liées à la chimie de l'eau : micropolluants organiques et minéraux, pesticides, matière particulaire suspendue, HAP et composés azotés (hors nitrates). Ensuite, nous avons filtré selon la taille du cours d'eau, en ne gardant que les opérations d'échantillonnage menées dans des cours d'eau ayant un rang de Strahler entre 1 et 4. Enfin, nous n'avons gardé que les opérations pour lesquelles nous avons des informations stœchiométriques disponibles pour au moins 95% des individus échantillonnés. Selon ces critères, 1308 opérations d'échantillonnage, sur 504 sites (Figure 11), ont été incluses dans cette étude, incluant 146 taxons différents.

Nous avons caractérisé les niveaux de pression relatifs au P et au N pour ces 1308 échantillons. Le niveau de P a été considéré quantitativement et correspond à la concentration en phosphates dans l'eau ( $\text{PO}_4^{3-}$ , en mg/L). Le niveau de N a été considéré qualitativement avec les catégories suivantes, selon la concentration en nitrates dans l'eau ( $\text{NO}_3^{2-}$ , en mg/L) : faible (< 10 mg/L), intermédiaire (10-25 mg/L) ou fort (> 25 mg/L). A noter que les valeurs quantitatives de concentrations en phosphates sont pour certaines imprécises, à cause de la limite de détection. Dans ces cas, les vraies valeurs pourraient être plus faibles que celles reportées, mais il est impossible d'identifier avec certitude ces situations, la limite de détection n'étant pas toujours la même. Les niveaux de N souffrent du même problème, mais du fait de la discrétisation, de toute façon ces sites sont dans la catégorie faible (< 10 mg/L).

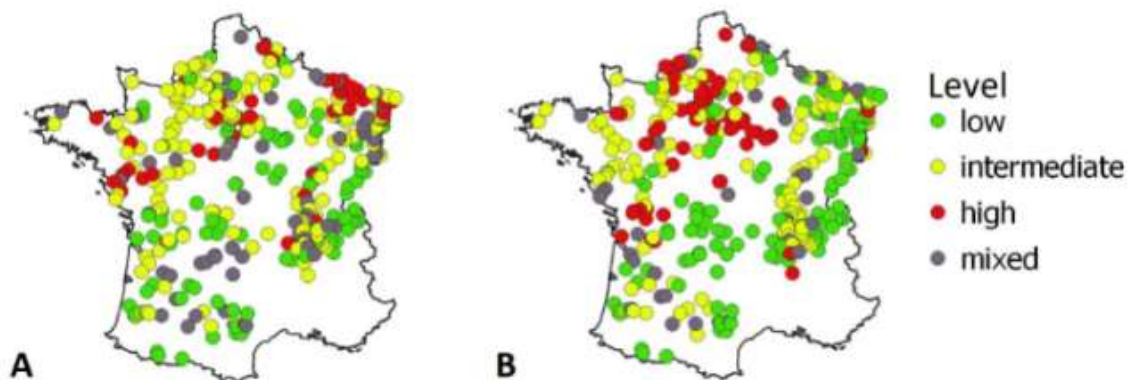


Figure 11 - Positions des sites d'échantillonnage ( $n=504$ ) et leurs niveaux de P (A) et de N (B) (low = faible, intermediate = intermédiaire, high = fort) indiqués par différentes couleurs. Pour P, low est < 0.05 mg/L, intermediate est entre 0.05 et 0.2 mg/L, et high est > 0.2 mg/L. Pour N, low est < 10 mg/L, intermediate est entre 10 et 25 mg/L, et high est > 25 mg/L. Les points sont gris quand le niveau de nutriment a changé entre les opérations d'échantillonnage (mixed).

### Analyses de données

Les valeurs stœchiométriques (%C, %N, %P, C:N, C:P, N:P) pour chaque taxon ont été récupérées dans la base publiée dans Beck et al. (2022). Pour chaque opération d'échantillonnage, les valeurs stœchiométriques à l'échelle de la communauté ont été calculées par une moyenne des valeurs des taxons en présence, pondérée par les  $\log(1+\text{abondances})$  des taxons. Les valeurs des ratios (C:N, C:P, N:P) ont été log-transformées avant les calculs, comme recommandé par Isles (2020). Les valeurs stœchiométriques ont également été calculées à l'échelle de sous-communautés correspondant à des groupes taxonomiques larges (en général, des classes d'invertébrés).

Pour chaque variable stœchiométrique (%C, %N, %P, C:N, C:P, N:P) un modèle linéaire a été construit pour analyser les effets des concentrations en nutriments sur la stœchiométrie à l'échelle de la communauté. La concentration en P dans l'eau et le niveau de N (faible, intermédiaire ou fort) ont été intégrés comme deux variables explicatives potentielles, quantitative et qualitative, respectivement. Un terme d'interaction entre les deux a été également ajouté, et sa contribution a été vérifiée par un test des modèles emboîtés comparant les modèles avec et sans interaction.

Les mêmes modèles ont été appliqués aux variables stœchiométriques calculées à l'échelle des groupes taxonomiques. A cause du nombre limité de taxons dans certains groupes, seuls les plus riches ont été considérés : Gastropoda, Hirudinea, Insecta, et Malacostraca. A noter que des réserves sont à émettre pour les Gastropoda et Hirudinea où le nombre limité de taxons dans ces groupes a mené à de nombreuses valeurs stœchiométriques identiques. Enfin, les mêmes modèles ont été appliqués aux proportions d'individus de chaque groupe (Bivalvia, Gastropoda, Hirudinea, Insecta, Malacostraca, Oligochaeta, Turbellaria). Toutes les analyses ont été conduites sous R (version 3.5.3, R Core Team, 2019).

### 3.3.3 Résultats

Comme nos principales hypothèses concernent le P, les résultats ci-après sont limités au %P dans la communauté. Les figures et tableaux pour les autres variables (C:P, N:P, %C, %N, C:N) sont au complet dans Beck et al. (in prep.), et son matériel supplémentaire.

Les résultats à l'échelle de la communauté entière sont représentés en Figure 12. Le %P à l'échelle de la communauté diminue significativement le long du gradient de P croissant dans l'eau, avec une pente plus importante pour le niveau de N faible.

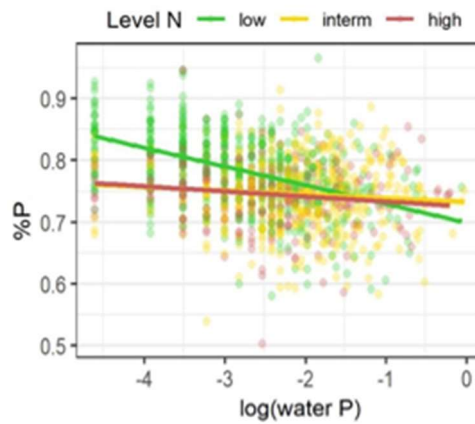


Figure 12 - %P calculé à l'échelle de la communauté entière de macroinvertébrés aquatiques le long du gradient de concentration en P dans l'eau (en échelle log). Les droites de régression correspondent aux différents niveaux de N, selon le code couleur. Vert = low = faible, jaune = interm = intermédiaire et rouge = high = élevé. Les points représentent les opérations d'échantillonnage.

Dans les différents groupes taxonomiques, la stœchiométrie varie selon la concentration en P dans l'eau (sauf pour Hirudinea), et l'interaction avec le niveau de N est significative chez Gastropoda et Insecta (Figure 13). Les relations les plus marquées sont observées chez les insectes (Insecta), chez qui le %P augmente avec le P dans l'eau, surtout pour les niveaux de N intermédiaire et élevé. Chez les crustacés (Malacostraca), le %P augmente également avec le P dans l'eau, à tous les niveaux de N. Chez les gastéropodes (Gastropoda), le %P augmente avec P dans l'eau au niveau de N élevé, mais suit la tendance inverse au niveau de N intermédiaire.

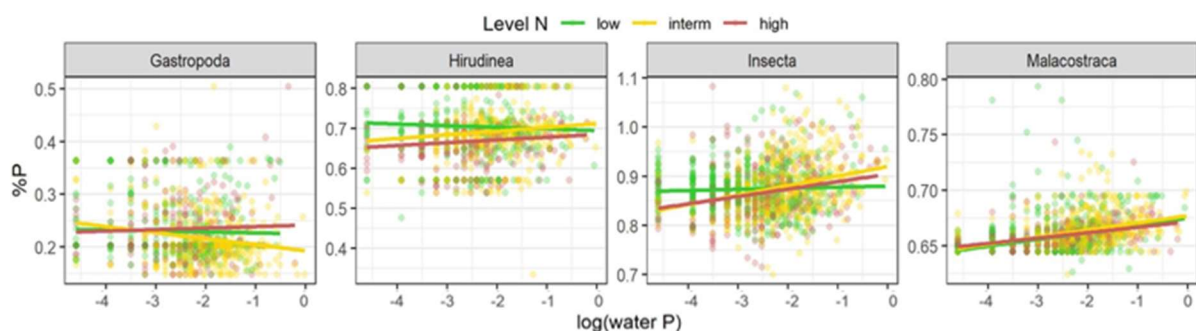


Figure 13 - %P calculé à l'échelle des principales classes de macroinvertébrés aquatiques le long du gradient de concentration en P dans l'eau (en échelle log). Les droites de régression correspondent aux différents niveaux de N, selon le code couleur. Vert = low = faible, jaune = interm = intermédiaire et rouge = high = élevé. Les points représentent les opérations d'échantillonnage.

Quatre groupes taxonomiques sont très minoritaires (Figure 14), avec des proportions qui n'excèdent que rarement 10% : les bivalves (Bivalvia), les gastéropodes, les sangsues (Hirudinea), et les vers plats (Turbellaria). Parmi ces groupes, seule la proportion de sangsues est significativement et positivement reliée au P dans l'eau. Aux niveaux intermédiaire et élevé de N dans l'eau, les proportions d'insectes et d'oligochètes augmentent significativement avec P, au détriment de la proportion de crustacés qui suit la tendance inverse. Au niveau faible de N, la proportion d'insectes diminue significativement avec P, au bénéfice des proportions de crustacés et d'oligochètes.

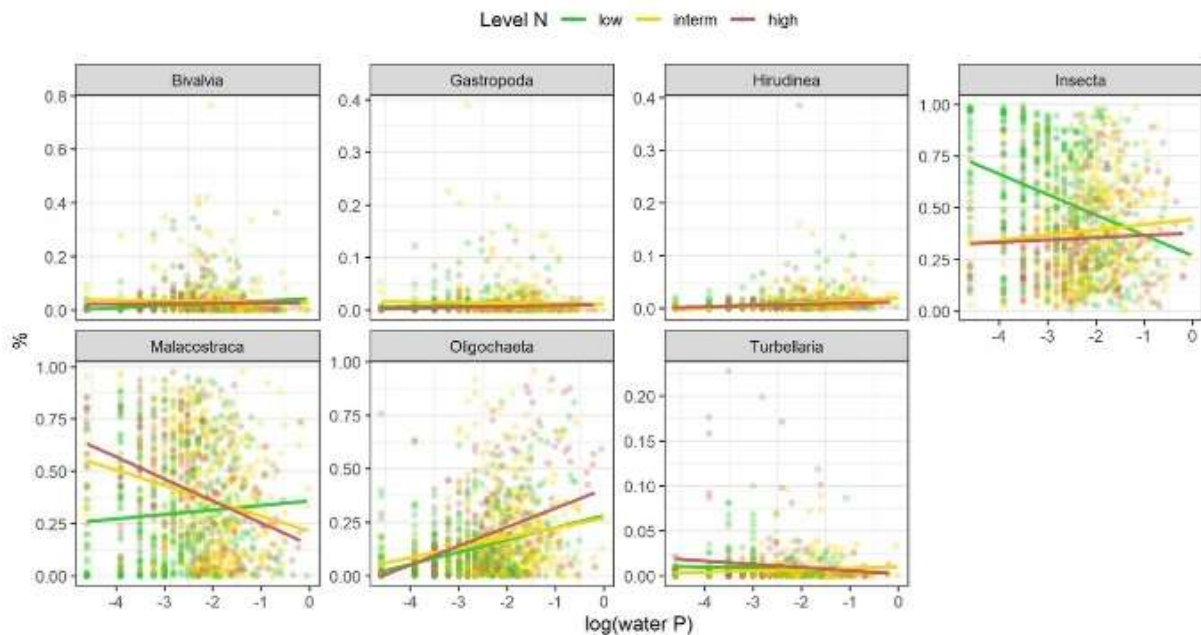


Figure 14 – Proportions des différentes classes de macroinvertébrés aquatiques le long du gradient de concentration en P dans l'eau (en échelle log). Les droites de régression correspondent aux différents niveaux de N, selon le code couleur. Vert = low = faible, jaune = interm = intermédiaire et rouge = high = élevé. Les points représentent les opérations d'échantillonnage.

### 3.3.4 Discussion

Au contraire des travaux qui ont conduit des expérimentations en mésocosmes (Teurlinx et al., 2017), qui ont manipulé les apports de nutriments sur des cours d'eau (Cross et al., 2003, Demi et al., 2019) ou qui ont suivi un gradient temporel de nutriment sur un site (Beck et al., 2023), ici nous avons utilisé des données échantillonnées à une large échelle spatiale, sur des sites affichant des niveaux de nutriments variés. Plutôt que d'analyser la réponse directe d'une communauté à un changement en termes de charge en nutriments, notre étude se confronte à un gradient spatial. Bien que nous ayons réduit le risque de facteurs confondants non contrôlés, en sélectionnant des sites de taille similaire et en excluant les sites pollués, d'autres caractéristiques morphologiques ou hydro-géographiques des sites peuvent avoir réduit les tendances stœchiométriques dans notre étude. Malgré ce bruit, nous avons trouvé des relations significatives pour toutes les variables stœchiométriques, suggérant un fort lien général entre les niveaux de nutriments dans l'environnement et la stœchiométrie des communautés.

A l'échelle de la communauté entière, dans notre étude le %P ne suit pas la concentration en P dans l'eau, ce qui est contraire à nos attentes. Cela est surprenant, car deux autres études sur les macroinvertébrés (Singer et Battin, 2007, Beck et al., 2023) ont trouvé des communautés riches en P à de fortes concentrations en P dans l'eau, et comme Prater et al. (2015), ont rapporté des glissements compositionnels vers des taxons riches en P. La stœchiométrie à l'échelle de la communauté semble être dirigée par sa composition et la proportion de taxons riches ou pauvres en C, N et P. Teurlinx et al., (2017) ont montré que le changement de C:P dans une communauté planctonique, suite à un enrichissement en nutriment, était causé davantage par un changement dans la composition que par une plasticité des taxons individuellement. Bien qu'il existe des variations stœchiométriques entre familles ou genres (McManamay et al., 2011, Morse et al., 2012, Mehler et al., 2013), ces variations sont plus importantes entre classes ou ordres (Fagan et al., 2002, González et al., 2011, González et al., 2018). En effet, des différences générales en termes de structure du corps ou de métabolisme entre des lignées plus distantes ont pour conséquences des besoins nutritionnels plus contrastés. Dans notre étude, au niveau faible de N, la diminution du %P à l'échelle de la communauté le long du gradient des concentrations croissantes en P dans l'eau (Figure 12) est allée de paire avec une diminution drastique des abondances d'insectes (Figure 14, Insecta), une classe qui est globalement riche en P corporellement mais sensible aux fortes charges en nutriments (Friberg et al., 2010, Beck et al., 2022). Les crustacés (Malacostraca) et les oligochètes (Oligochaeta), les autres groupes les plus abondants, sont moins riches en P, et ont augmenté en proportion, ce qui explique la diminution du %P à l'échelle de la communauté entière. La proportion d'oligochètes a augmenté avec P, pour tous les niveaux de N, ce qui n'est pas surprenant car les taxons de ce groupe ont tendance à être dominants dans des conditions chargées en nutriments (McCormick et al., 2004, Ortiz et Puig, 2007).

A l'échelle intra-classe, le %P croit avec la concentration en P dans l'eau, en accord avec notre deuxième hypothèse, pour les insectes et les crustacés, c'est-à-dire pour les deux classes les plus riches taxonomiquement dans nos listes faunistiques et pour lesquels nous avons de nombreuses données stœchiométriques dans notre base (Beck et al., 2022). Au sein de ces classes nous avons observé un décalage vers des taxons riches en P aux fortes concentrations en P dans l'environnement, avec par exemple chez les insectes une augmentation des diptères particulièrement riches en P, et une diminution des coléoptères, plus pauvres en P.

## 3.4 Bilan et perspectives

### Synthèse

Les résultats de l'étude à long terme à Dampierre-en-Burly (Partie 3.2) montrent que sur la période 1980-2013, la stœchiométrie à l'échelle de la communauté de macroinvertébrés aquatiques a suivi la diminution de la concentration en P dans l'eau, avec un glissement vers des taxons pauvres en P. Les évolutions de la communauté en termes de traits fonctionnels sont également en accord avec la théorie de la stœchiométrie écologique (EST, Sterner et Elser, 2003). Dans les années les plus récentes, la communauté était ainsi composée de taxons plus grands et avec une croissance/un développement plus lent, comme prévu par la *Growth Rate Hypothesis* (GRH, Elser et al., 2003). Nos résultats ont souligné l'intérêt d'intégrer des traits dits stœchiométriques dans les « approches traits », pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à la réponse fonctionnelle des communautés exposées à des stress environnementaux.

L'étude à l'échelle de la France métropolitaine (Partie 3.3) montre que même à une large échelle spatiale, les résultats sont en cohérence avec l'EST. Au sein des deux classes, insectes et crustacés, les assemblages sont plus riches en P dans les environnements plus chargés en P. Les importants changements de composition taxonomique, avec le long du gradient de P dans l'eau une bascule d'une large majorité d'insectes à une majorité de crustacés+oligochètes, complique l'interprétation à l'échelle de la communauté entière.

En termes de modélisation, les outils mathématiques employés dans ce chapitre, à savoir des moyennes pondérées, des tests non-paramétriques, des régressions linéaires et des analyses multivariées, peuvent être résumés en quelques mots : simplicité et pragmatisme, face à un signal d'une grande complexité. Les figures parlent d'elles-mêmes, surtout celles de la Partie 3.3, la variabilité est inhérente à de telles données de terrain. Face à une telle hétérogénéité, l'objectif est de mettre en évidence les principales tendances, et pour cela il est préférable de se tourner vers les méthodes les plus simples possible. Ici, les hypothèses fortes relèvent de la théorie qui mène à l'EST et à la GRH, et d'aspects pratiques comme le codage flou ou les *community weighted means*. Appliqués à des jeux de données de grande taille, ces simplifications sont légitimes et mènent à des résultats probants. Enfin, la RLQ figure parmi les méthodes d'analyse multivariée les plus élaborées, en permettant l'articulation entre trois tableaux dont deux partagent les mêmes lignes et deux partagent les mêmes colonnes, mais reste basée sur des projections linéaires simples.

### Perspectives

Le principal avantage des traits stœchiométriques est leur lien avec des éléments qui permettent de comprendre les modifications en termes de structures taxonomique et fonctionnelle des communautés. Mais ils peuvent aussi aider à aborder des questions relatives aux nutriments au-delà de l'échelle des communautés. Intégrer la biomasse, et donc passer d'un %P à une masse de P, permettrait de quantifier les stocks de nutriments et les exportations *via* l'émergence des insectes. En effet, une spécificité des systèmes d'eau douce est la perte de biomasse du fait de l'émergence des insectes semi-aquatiques, qui deviennent terrestres au stade adulte. Concernant les écosystèmes, cela fournit un transfert d'énergie et de nutriments entre les milieux aquatiques et terrestres qui peut être substantiel (Martin-Creuzburg et al., 2017, Bartrons et al., 2018, Raitif et al., 2018). Quantifier précisément les flux des nutriments, et estimer la part stockée dans le milieu aquatique



ou perdue par exportation pourraient aider à comprendre et prédire les effets de changements globaux relatifs aux nutriments sur les cycles du N et du P au-delà de l'échelle des communautés.

Dans nos travaux, nous avons supposé une homéostasie stricte, c'est-à-dire une constance des teneurs élémentaires, à l'échelle des taxons. Pourtant, même au sein d'une même espèce, des déviations vis-à-vis de l'homéostasie existent, notamment en fonction de l'ontogénie (stade de développement de l'organisme) (Back et King, 2013), de la taille corporelle (Naddafi et al., 2012, González et al., 2018), ou du sexe (Back et King, 2013). D'ailleurs, si l'on reprend l'hypothèse du taux de croissance, (*Growth Rate Hypothesis*, GRH), qui stipule que la teneur corporelle en P est liée aux besoins en P pour la croissance corporelle, les juvéniles, avec leur taux de croissance plus important que les adultes, devraient avoir une teneur corporelle en P plus importante que leurs aînés. GRH et homéostasie stricte à l'échelle des taxons se contredisent. Il paraîtrait pertinent d'affiner l'hypothèse d'homéostasie, par exemple en décrivant une distribution statistique de la teneur en C, N, et P, pourquoi pas sous forme de codage flou, ou encore en distinguant au sein des taxons des classes d'individus à la stœchiométrie différente.

La GRH a au départ été émise à l'échelle des individus. La thèse de Miriam Beck a montré qu'elle pouvait être étendue à un « taux de développement » à l'échelle des espèces/taxons : les taxons à développement rapide (caractérisés par une durée de vie inférieure à un an, plus d'une génération par an (polyvoltinisme), et un unique cycle de reproduction) sont globalement plus riches en P que les taxons à développement lent (caractérisés par une durée de vie supérieure à un an, une seule génération par an, et de nombreux cycles de reproduction). En perspective, vient la question de savoir si cette GRH tiendrait toujours en considérant le taux de croissance d'une population. Le taux de P à l'échelle d'une population augmente-t-il avec le taux de croissance de la population ?

Les perspectives ouvertes dans ces trois derniers paragraphes ont donné lieu au stage de M2 de Titouan Dionet au LIEC (Co-encadrement Michaël Danger, Mehdi Cherif, Elise Billoir, Vincent Felten, Romain Coulaud), qui s'est déroulé de janvier à juillet 2023. Titouan s'est basé sur un modèle matriciel de dynamique des populations distinguant cinq classes de tailles, comme proposé par Coulaud et al. (2014). Par des mesures au laboratoire, il a pu établir que le taux de P est plus élevé dans la classe des gammares les plus petits (en accord avec la GRH). La stœchiométrie (taux de P dans les différentes classes) a ensuite été explicitement intégrée au cadre matriciel, ce qui permet de suivre non seulement la dynamique et la structure de la population, mais également la quantité de P à l'échelle de la population, en utilisant les biomasses de chaque classe. Les premiers résultats montrent que la GRH n'est pas vérifiée à l'échelle populationnelle : tout dépend des proportions des différents stades. Lorsque la proportion d'individus de la première classe est importante, la richesse en P des petits organismes, relativement aux plus grands, est à l'échelle de la population contrecarrée par leur faible biomasse. Ces résultats restent à explorer en faisant varier davantage les paramètres démographiques et à généraliser.





## 4 Modélisation en écotoxicologie des populations et des communautés

### 4.1 Contexte

Suite à mon recrutement comme MCF au LIEC, j'ai engagé des collaborations avec les laboratoires ECOBIO (Rennes) et LEHNA (Lyon), à l'occasion du projet EC2CO intitulé « Ecologie expérimentale de la structuration des communautés végétales sous contrainte de stress chimique » (2015-2016, coordination Cécile Sulmon). Ce projet pose la question de savoir si, et dans quelle mesure, en condition de contamination résiduelle péri-agricole, la structuration des communautés végétales et la tolérance des espèces au stress chimique sont inter-dépendantes. Pour l'anecdote, je ne connaissais pas du tout Cécile avant ma prise de fonction. Elle était dans mon jury de recrutement de MCF en « écotoxicologie des communautés », ce qui correspondait parfaitement à son projet, et m'a proposé cette collaboration avant même ma prise de fonction. C'est d'ailleurs en grande partie grâce à elle que j'ai pu développer et diriger des travaux dans cette thématique. Pour le projet EC2CO, nous avons convenu de ma contribution pour l'analyse des données et la mise en œuvre d'approches de modélisation des effets écotoxicologiques (courbes dose-réponse, *Species Sensitivity Distributions* (SSD)). Avec Simon Devin, nous avons ensuite bénéficié d'une demi-bourse de thèse ministérielle, complétée d'une demi-bourse Région Lorraine, et ma contribution directe s'est transformée en supervision des travaux de Vincent Baillard (2017-2021, Direction Simon Devin, Co-direction Elise Billoir).

Les travaux de thèse de Vincent Baillard ont en grande partie porté sur l'effet de la compétition interspécifique dans le cas des communautés végétales terrestres des bandes enherbées exposées à un herbicide (l'isoproturon). Ils sont basés sur un jeu de données issu de bioessais en dose-réponse pour six espèces de plantes herbacées exposées à de l'isoproturon et soumises à deux situations de compétition, avec et sans organismes compétiteurs d'une septième espèce. Onze mesures biologiques différentes ont au final été évaluées afin d'étudier la différence de réaction à l'isoproturon des organismes sur plusieurs points de santé des individus. A noter que les expérimentations ont été réalisées par nos collègues de Rennes, la thèse de Vincent Baillard étant focalisée sur les travaux de modélisation et d'analyse des données.

Ce chapitre est organisé en trois parties :

- Une approche « classique » a été adoptée afin de mimer la procédure réglementaire appliquée en l'évaluation du risque écologique. L'originalité était là d'observer la variation des conclusions sur la base des bioessais incluant ou non de la compétition interspécifique.
- Une approche « hiérarchique » a modélisé 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 dose-réponse.
- Une partie de bilan et perspectives.

## 4.2 Importance de la prise en compte d'interactions biotiques en évaluation des risques

### 4.2.1 Introduction

L'évaluation du risque environnemental permet de caractériser et de quantifier les effets des contaminants afin de les maintenir à un niveau considéré acceptable. Cette évaluation se fait le plus souvent à partir de bioessais monospécifiques, et les relations dose-réponse ainsi décrites pour plusieurs espèces peuvent ensuite être intégrées au sein d'une distribution de sensibilité des espèces (*Species Sensitivity Distribution*, SSD). Ces SSD, largement utilisées en évaluation du risque environnemental, permettent alors de définir une concentration (appelée HC<sub>5</sub>) n'ayant d'effets critiques que pour une petite fraction (5%) des espèces présentes dans un assemblage. L'un des problèmes importants de ce type d'approches reste cependant une représentativité environnementale limitée (Forbes et Calow, 2002). En effet, les conditions expérimentales des bioessais restent éloignées de la réalité environnementale, les espèces intégrées aux SSD ne correspondent pas souvent à des assemblages observables *in situ*, les interactions biotiques sont négligées, de même que la variabilité inter-populationnelle (intra-spécifique), etc. Ce manque de réalisme est compensé par l'application d'un facteur de sécurité supposé protecteur.

Sur le terrain, les organismes sont soumis à différents types d'interactions biotiques, en théorie positives (commensalisme, symbiose) ou négatives (amensalisme, compétition) pour la fitness des populations. Ces interactions peuvent moduler les effets des contaminants auxquels les organismes sont exposés. Dans le cas de la compétition, les études sur des espèces modèles animales (en majorité des daphnies) montrent que la sensibilité aux toxiques est augmentée par la compétition, qu'elle soit intra-spécifique (Gust et al., 2016) ou interspécifique (Foit et al., 2012). Chez les plantes, très peu d'études ont testé les effets combinés d'interactions biotiques et de stress chimique. Cette question est pourtant essentielle chez des organismes sessiles, qui doivent être tolérants à toutes les conditions de leur environnement local pour survivre et maintenir leurs populations. Bien que les études chez les plantes prennent la question dans l'autre sens, à savoir quel est l'effet de contaminants sur les interactions biotiques, elles concluent elles aussi à l'existence d'effets interactifs (au sens statistique) entre contaminant et compétition (Damgaard et al., 2014, Boutin et al., 2019).

Dans ce contexte, nous avons émis les hypothèses suivantes :

- La compétition interspécifique a un impact négatif sur les réponses des organismes à un contaminant.
- La concentration d'exposition assurant la protection de 95% des espèces est abaissée en cas de compétition interspécifique.

Notre étude a porté sur les effets de l'isoproturon chez six espèces d'herbacées représentatives des communautés habitant les marges herbeuses présentes en bordure des champs. L'isoproturon est un herbicide, inhibiteur de la photosynthèse, souvent utilisé sur les cultures de céréales et caractérisé par sa persistance dans les sols (Johnson et al., 2001). Ce composé, comme les autres pesticides utilisés en agriculture, a des effets sur des organismes cibles au sein des surfaces traitées, mais également sur des organismes non-cibles

en dehors de ces surfaces, du fait de phénomènes de dérive dans l'atmosphère, de lessivage et de ruissellement. Les marges herbeuses sont en première ligne. Nous avons modélisé des courbes dose-réponses et des SSD en condition avec/sans compétition et nous les avons comparées, en considérant différentes définitions du seuil de tolérance, différentes réponses biologiques (traits mesurés) et différentes façons de résumer ces réponses.

## 4.2.2 Matériel et méthodes

### Jeu de données

Je ne présenterai ici que brièvement la partie expérimentale de cette étude. Tous les détails sont dans Baillard et al. (2020). Six espèces d'herbacées ont été choisies comme représentantes des communautés peuplant des bandes enherbées. Elles ont été sélectionnées pour représenter la diversité naturelle des plantes en termes de tolérance à l'isoproturon et de capacité compétitive : *Dactylis glomerata*, *Lolium multiflorum*, *Arrhenatherum elatius*, *Trisetum flavescens*, *Poa pratensis*, *Poa trivialis*. *Bromus erectus* a été choisi comme espèce compétitrice pour assurer une pression de compétition aussi constante que possible sur la durée de l'expérience. En effet, des pré-tests sur une dizaine d'espèces ont permis de l'identifier comme la plus tolérante à l'isoproturon. Le pesticide utilisé pour l'exposition est l'isoproturon, un inhibiteur de la photosynthèse. Malgré sa récente interdiction dans l'Union Européenne, la persistance de l'isoproturon, son usage hors UE et son mode d'action similaire à de nombreux autres herbicides, en font une molécule toujours pertinente à étudier (Johnson et al., 2001, Alberto et al., 2018). Des bioessais écotoxicologiques ont été menés pour les six espèces modèles et les deux modalités de compétition, absence ou présence du compétiteur. Les expérimentations ont été réalisées en microcosmes en conditions contrôlées. L'isoproturon était apporté *via* l'eau d'arrosage deux fois par semaine durant les 25 jours des expérimentations. Cinq concentrations en isoproturon (0.25, 0.5, 1, 1.5 et 1.75  $\mu\text{M}$ , correspondant à 51.5, 103, 206, 309, et 360  $\mu\text{g/L}$ ), en plus du témoin, ont constitué la gamme d'exposition. Pour chaque concentration et chaque modalité de compétition, les microcosmes ont été répliqués huit fois.

A la fin de l'expérience, onze traits ont été mesurés. Ces paramètres biologiques ont été choisis pour détecter les effets des différents facteurs étudiés (exposition à un herbicide, compétition).

Certains traits globaux répondent potentiellement à tout type de stress :

- masse sèche totale (*total Dry Mass, DM*)
- masse sèche des racines (*root DM*)
- masse sèche des parties aériennes (*shoot DM*)
- hauteur maximale des parties aériennes (*max. shoot height*)
- longueur des racines (*root length*)

Certains traits ont été préférentiellement choisis pour leur réponse attendue à l'herbicide :

- activité photosynthétique, *via* le rendement quantique maximum du PSII (*Fv/Fm*)
- contenu en caroténoïdes
- contenu en chlorophylle

Certains traits ont été préférentiellement choisis pour leur réponse attendue à la compétition :

- surface foliaire spécifique (*Specific Leaf Area, SLA*), qui traduit « l'épaisseur » des feuilles
- contenu en matière sèche foliaire (*Leaf Dry Matter Content, LDMC*), qui est le ratio masse sèche sur masse fraîche des feuilles
- hauteur de ligule (*Stem height*)

La masse sèche des parties aériennes du brome, le compétiteur, a aussi été pesée à la fin de l'expérience. L'analyse de ces masses sèches a montré que la pression de compétition a bien été similaire pour les différentes espèces et les différents traitements à l'isoproturon.

### Analyse des données

Les valeurs de concentration d'effet critique (CEC) sont les composants élémentaires nécessaires à la construction de SSD. Ces CEC ont été obtenues à l'issue des étapes suivantes :

- 1) Transformation des données pour certains traits
- 2) Pour chaque espèce, identification des traits répondant à l'exposition chimique
- 3) Pour ceux-là, ajustement de courbes dose-réponse
- 4) Dérivation de CEC à partir de ces ajustements

1) L'ajustement de courbes dose-réponse par régression non linéaire fait l'hypothèse d'une distribution Gaussienne des réponses tout le long du gradient de doses. En conséquence, la première étape a été d'appliquer une transformation aux mesures de certains traits, dans le but d'améliorer l'homoscédasticité et la normalité des données et donc des résidus du modèle ajusté. Pour déterminer l'opportunité ou non des transformations, nous avons construit des modèles d'ANOVA où les réponses mesurées pouvaient être expliquées par les facteurs espèce, compétition et concentration, de telle sorte que la variabilité restante est uniquement la variabilité inter-réplicats. Pour chaque trait, un modèle d'ANOVA a été construit à partir des données brutes, et un autre à partir des données post-transformation. Ensuite, nous avons inspecté visuellement les résidus pour voir si la transformation améliorerait leur homoscedasticité et leur normalité, et dans ce cas, nous l'avons conservée. Différentes transformations ont été testées selon les traits. Pour le Fv/Fm, qui est une proportion, nous avons appliqué une transformation logit. Pour les autres traits une log-transformation a été testée.

2) Certains des traits mesurés n'ont pas présenté de variation face à l'exposition chimique, on dit alors qu'ils ne sont pas régulés. La modélisation dose-réponse n'a pas de sens dans ces cas-là, et mène à des problèmes d'identifiabilité des paramètres (i.e. il est impossible de les estimer). Une étape de sélection préalable a donc été appliquée pour les mettre de côté. Avec six espèces, onze traits et deux modalités de compétition, nous avons 132 sous-jeux de données. Pour chacun d'entre eux, nous avons utilisé un test de tendance linéaire pour évaluer la significativité d'une droite de régression reliant les réponses mesurées aux concentrations en isoproturon, avec un taux de fausse découverte (*False Discovery Rate, FDR*) limité à 5%. Cette procédure a mené à la sélection de différents traits selon les espèces. Cependant, pour une espèce donnée, un trait n'a été sélectionné que s'il était régulé à la fois en situation avec et sans compétition.

3) Un modèle dose-réponse a été ajusté aux données pour chaque combinaison de trait sélectionné, d'espèce et de modalité de compétition. Des régressions non linéaires, avec l'hypothèse d'un modèle d'erreur Gaussien, ont été mises en œuvre à l'aide du package R drc (version 3.0-1, Ritz et al., 2015), en utilisant un modèle log-probit (Equation 4.1).

$$y_i = d + (c - d) * \Phi \left( b \log \left( \frac{x_i}{e} \right) \right) \quad (\text{Equation 4.1})$$

Où  $i$  réfère à la  $i^{\text{ème}}$  concentration en isotroturon,  $x_i$  est la concentration d'exposition,  $y_i$  le niveau de réponse du trait,  $\Phi$  est la densité de probabilité cumulée de la loi normale,  $e$  est la concentration à laquelle la pente est maximum (égale à la  $EC_{50}$ ;  $>0$ ),  $b$  est un paramètre de forme. Si  $b > 0$ ,  $d$  est le niveau de réponse aux fortes concentrations et  $c$  est le niveau de réponse aux faibles concentrations. Si  $b < 0$ , leurs rôles sont intervertis.

4) Pour chaque courbe dose-réponse, différentes CEC ont été calculées : les  $EC_{10}$ ,  $EC_{50}$ ,  $BMD_{1sd}$  et  $BMD_{2sd}$  (cf Partie 2.3.3).

Des SSD ont été construites sous trois scénarios communément rencontrés dans les publications scientifiques et les textes réglementaires lorsque plusieurs traits sont disponibles pour quantifier la sensibilité d'une espèce. Une quatrième approche, adaptée à notre jeu de données incluant de nombreux traits, mais non proposée dans les textes réglementaires, a également été testée.

- i. Dans un premier scénario, pour chaque espèce, la moyenne géométrique des CEC obtenues pour les différents traits a été utilisée (Xu et al., 2015).
- ii. Dans un second scénario, pour chaque espèce, nous avons gardé la plus faible des CEC obtenues. Cette méthode est protectrice, mais repose sur une seule valeur, ce qui la rend sensible à cette dernière.
- iii. Dans un troisième scénario, seule la masse sèche totale a été considérée pour chaque espèce. Ce trait a été régulé par l'exposition chimique pour toutes les espèces, et c'est le trait le plus couramment mesuré chez les herbacées dans les études écotoxicologiques (Del Signore et al., 2016).
- iv. Le quatrième scénario n'utilise pas directement les valeurs de CEC. Nous avons tout d'abord construit, pour chaque espèce, une distribution de sensibilité des différents traits (Arts et al., 2008, Hanson et Salomon, 2002), que nous appelons *Endpoint Sensitivity Distribution* (ESD), par analogie aux SSD. Ensuite, nous avons calculé le cinquième percentile de ces distributions, une concentration théoriquement protectrice pour 95% des traits, et nous avons utilisé ces valeurs pour construire les SSD. Nous avons considéré que cette méthode est un bon compromis entre les deux premières approches, puisqu'elle prend en compte tous les traits disponibles, mais donne un résultat plus protecteur que la moyenne des CEC, sans être trop sensible à d'éventuelles valeurs minimum extrêmes.

Les SSD ont été modélisées par des distributions log-logistiques. La méthode du maximum de vraisemblance avec prise en compte des données censurées (c'est-à-dire définies par un intervalle possiblement ouvert à gauche ou à droite) a servi à ajuster les modèles aux données. Les ajustements ont été réalisés en utilisant le package R fitdistrplus (version 1.0-14, Delignette-Muller et Dutang, 2015). Les  $HC_5$ , soient les concentrations théoriquement protectrices pour 95% des espèces, ont été dérivées *via* le 5<sup>ème</sup> percentile des SSD.

### 4.2.3 Résultats

#### Transformation des données

Une transformation logit a été appliquée au Fv/Fm, une transformation log à tous les autres traits, sauf aux contenus en chlorophylle et en caroténoïdes.

#### Sélection des traits régulés par l'exposition à l'isoproturon

Le Tableau 5 présente les résultats de l'étape d'identification des traits qui sont régulés le long du gradient d'exposition chez chaque espèce. Cinq à neuf traits sont sélectionnés selon les espèces. Le Fv/Fm et les trois masses sèches (racines, parties aériennes et total) sont régulés par l'exposition chimique chez toutes les espèces. A l'inverse, le LDMC et les contenus en pigment sont très peu sélectionnés, ce qui est en partie dû à une très forte variabilité entre les réplicats. Au total, 42 couples (espèce, trait) sont sélectionnés, menant à la construction de 84 courbes dose-réponse (avec et sans compétiteur).

Tableau 5 - Traits biologiques régulés par l'exposition chimique pour les différentes espèces. Les X indiquent une réponse significative le long du gradient de concentrations.

Espèce	<i>P. trivialis</i>	<i>P. pratensis</i>	<i>T. flavescens</i>	<i>A. elatius</i>	<i>L. multiflorum</i>	<i>D. glomerata</i>
Hauteur ligule	X	X				X
Hauteur max	X	X				X
Longueur racines	X	X		X		X
LDMC			X			
SLA		X	X		X	X
Fv/Fm	X	X	X	X	X	X
Chlorophylle		X				
Caroténoïdes						
Masse racines	X	X	X	X	X	X
Masse aérienne	X	X	X	X	X	X
Masse totale	X	X	X	X	X	X
Total sélectionnés	7	9	6	5	5	8

## Modélisation des courbes dose-réponse

La Figure 15 montre en exemple les ajustements obtenus pour les différents traits chez *P. pratensis*. Tous les ajustements ont été vérifiés et sont cohérents avec les données. Pour tous les traits, les courbes dose-réponse sont décroissantes avec la concentration d'exposition croissante, sauf pour SLA, qui croit avec la concentration d'isoproturon.

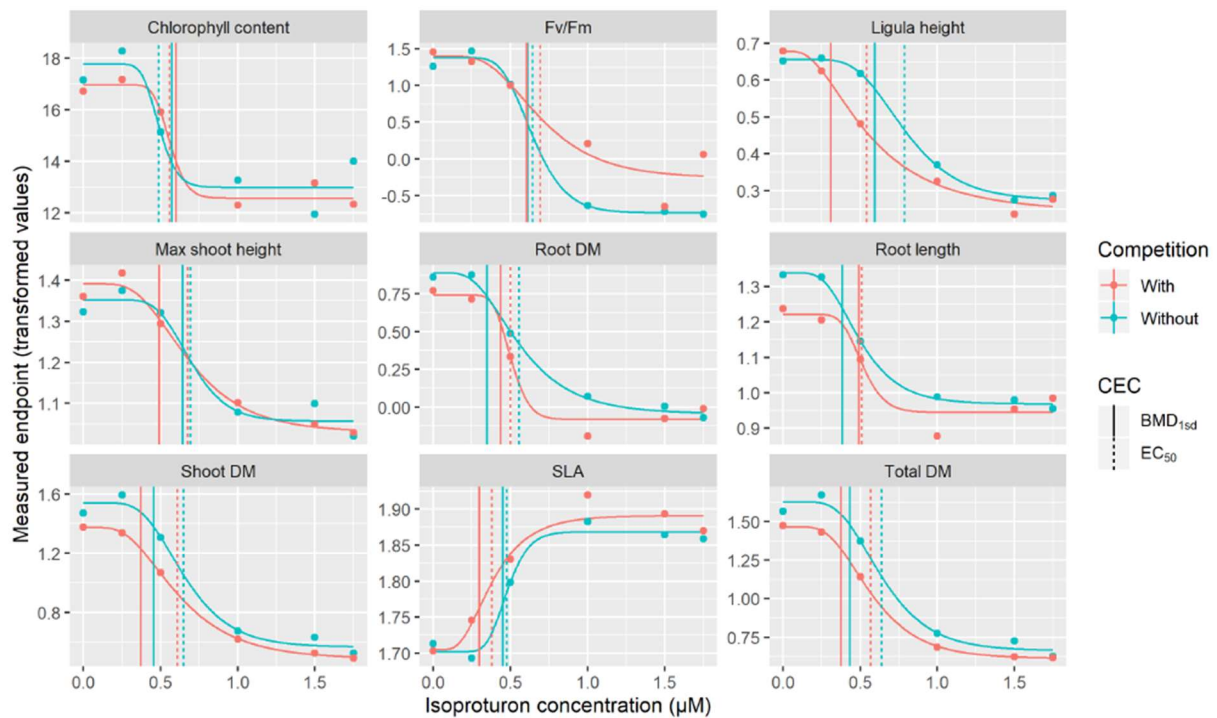


Figure 15 - Exemple des courbes dose-réponse obtenues pour *P. pratensis*. Les points représentent les moyennes des huit réplicats pour chaque concentration et les courbes représentent les modèles ajustés. Les lignes verticales en pointillés correspondent aux valeurs d' $EC_{50}$  et les lignes verticales en trait plein correspondent aux valeurs de  $BMD_{1sd}$ .

## Concentrations d'effet critique (CEC)

La Figure 15 illustre également, pour les différents traits chez *P. pratensis*, les calculs d' $EC_{50}$  et de  $BMD_{1sd}$ . Une valeur n'a pas toujours pu être calculée pour la  $BMD_{2sd}$  car elle était parfois au-delà de l'ordonnée de l'asymptote pour les fortes concentrations, ce qui signifie que l'amplitude du signal est parfois en deçà de deux fois l'écart-type résiduel du modèle. Cela s'est produit 12 fois sur les 84  $BMD_{2sd}$  à calculer. Comme le niveau d'effet correspondant aux EC est un pourcentage de l'effet maximum (i.e. de la différence entre les deux asymptotes), les EC sont toujours calculables. Cependant, dans certains cas, les EC ou BMD calculées sont supérieures à la plus forte des concentrations testées. Nous avons considéré ces valeurs comme des valeurs censurées dans l'intervalle [concentration max testée ; +inf]. Cela s'est produit trois fois sur les 84  $EC_{10}$  à calculer, 20 fois sur les 84  $EC_{50}$ , 10 fois sur les 84  $BMD_{2sd}$ , et jamais pour les  $BMD_{1sd}$ .



La Figure 16 montre les valeurs de  $BMD_{1sd}$  calculées pour les onze traits et les six espèces. Dans la grande majorité des cas, la valeur de  $BMD_{1sd}$  est plus faible en présence du compétiteur. Nous avons calculé, pour chaque  $BMD$ , le pourcentage de réponse correspondant. Les  $BMD_{1sd}$  correspondent en moyenne à des valeurs d' $EC_{29.7}$  (IQR [16.5 ; 38.3]). Les  $BMD_{2sd}$  correspondent en moyenne à des valeurs d' $EC_{49.0}$  (IQR [32.4 ; 64.3]).

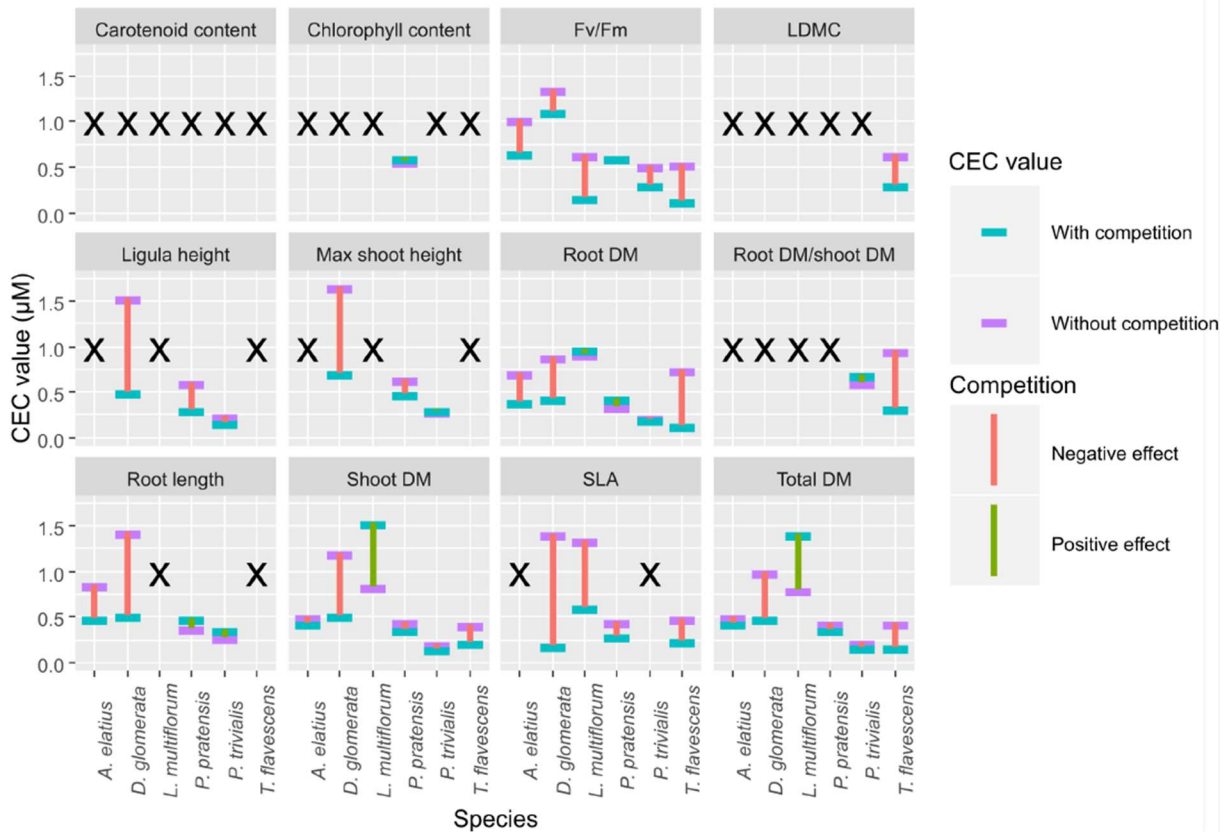


Figure 16 - Valeurs de  $BMD_{1sd}$  pour les différentes espèces et les différents traits. Une croix noire indique que le trait n'a pas été sélectionné pour construire un modèle dose-réponse car il n'est pas significativement régulé le long du gradient de concentrations. L'effet de la compétition est négatif lorsque la  $BMD_{1sd}$  est plus faible en présence du compétiteur qu'en son absence, positif lorsque la  $BMD_{1sd}$  est plus élevée en présence du compétiteur qu'en son absence.

La Figure 17 montre les valeurs de CEC calculées pour les différents types de CEC, les différentes espèces et les différents traits, et affiche la valeur obtenue en absence de compétition contre la valeur obtenue en présence de compétition. Environ 10% des points sont dans la zone entre les lignes pointillées, correspondant à moins de 5% de différence, ce qui montre un effet modéré de la compétition. Beaucoup plus de points sont sous les lignes pointillées (70%) qu'au-dessus des lignes pointillées (20%), ce qui montre que la compétition interspécifique a eu majoritairement un effet négatif sur la tolérance des organismes face au stress chimique dans notre étude, en cohérence avec notre hypothèse initiale. Cette tendance aux effets négatifs est un peu moins prépondérante pour les  $EC_{50}$  (44%) que pour les autres CEC (69% pour les  $EC_{10}$ , 73% pour les  $BMD_{1sd}$ , 74% pour les  $BMD_{2sd}$ ).

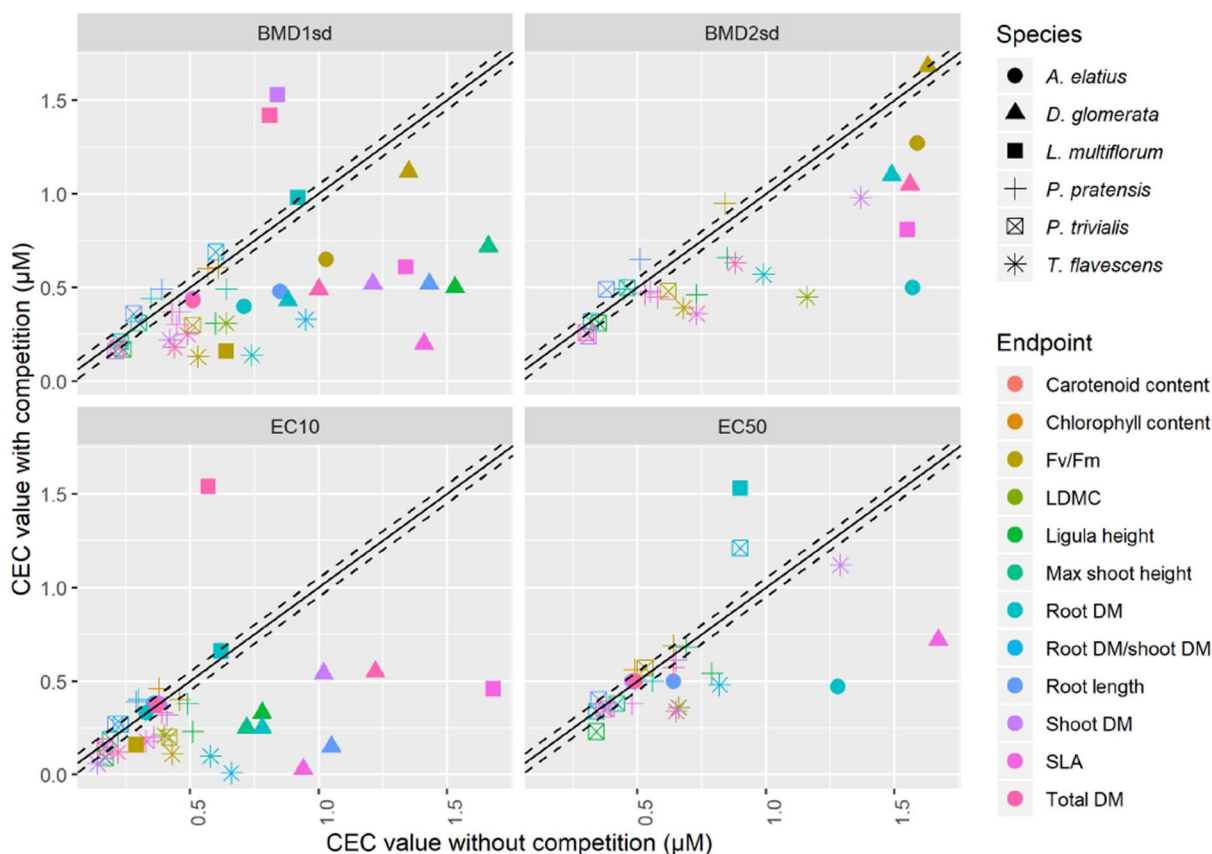


Figure 17 - Comparaison des valeurs de CEC en absence (en abscisse) vs présence (en ordonnée) de compétiteur, pour les quatre types de CEC calculées. La ligne noire est la première bissectrice, les lignes en pointillés représentent 5% de variation autour de cette bissectrice.

### Modélisation des SSD

La Figure 18 montre en exemple les SSD construites à partir des  $BMD_{1sd}$ , en utilisant les différentes méthodes d'intégration des traits multiples disponibles pour chaque espèce (moyenne, minimum, masse sèche totale et ESD). Le Tableau 6 synthétise les décalages des SSD avec ou sans compétition, *via* les valeurs d' $HC_5$  et leurs ratios sans/avec compétition. On peut voir dans ce tableau que tous les ratios sont au-dessus de la valeur 1, indiquant que la compétition interspécifique tend à diminuer la tolérance des assemblages de plantes, d'un facteur compris entre 1.1 et 4, sauf dans une situation où l'effet de la compétition baisse l' $HC_5$  d'un facteur 11, ce qui dépasse le facteur de sécurité de 5 couramment utilisé en évaluation du risque basée sur les SSD.

Tableau 6 - Valeur d' $HC_5$  (en  $\mu M$ ) pour les différentes CEC et les différentes méthodes explorées pour résumer les CEC disponibles pour chaque espèce. Les valeurs sont données sans / avec compétition et entre parenthèses la valeur du ratio.

	EC <sub>10</sub>	EC <sub>50</sub>	BMD <sub>1sd</sub>	BMD <sub>2sd</sub>
<b>Valeur minimum</b>	0.112 / 0.011 (11.1)	0.285 / 0.231 (1.23)	0.212 / 0.101 (2.11)	0.261 / 0.218 (1.19)
<b>Valeur moyenne</b>	0.197 / 0.090 (2.19)	0.435 / 0.388 (1.12)	0.291 / 0.196 (1.48)	0.494 / 0.371 (1.33)
<b>Masse sèche tot.</b>	0.125 / 0.077 (1.63)	0.180 / 0.130 (1.38)	0.219 / 0.113 (1.94)	0.215 / 0.187 (1.15)
<b>5<sup>ème</sup> perc. ESD</b>	0.084 / 0.022 (3.84)	0.156 / 0.121 (1.29)	0.159 / 0.096 (1.66)	0.167 / 0.126 (1.33)

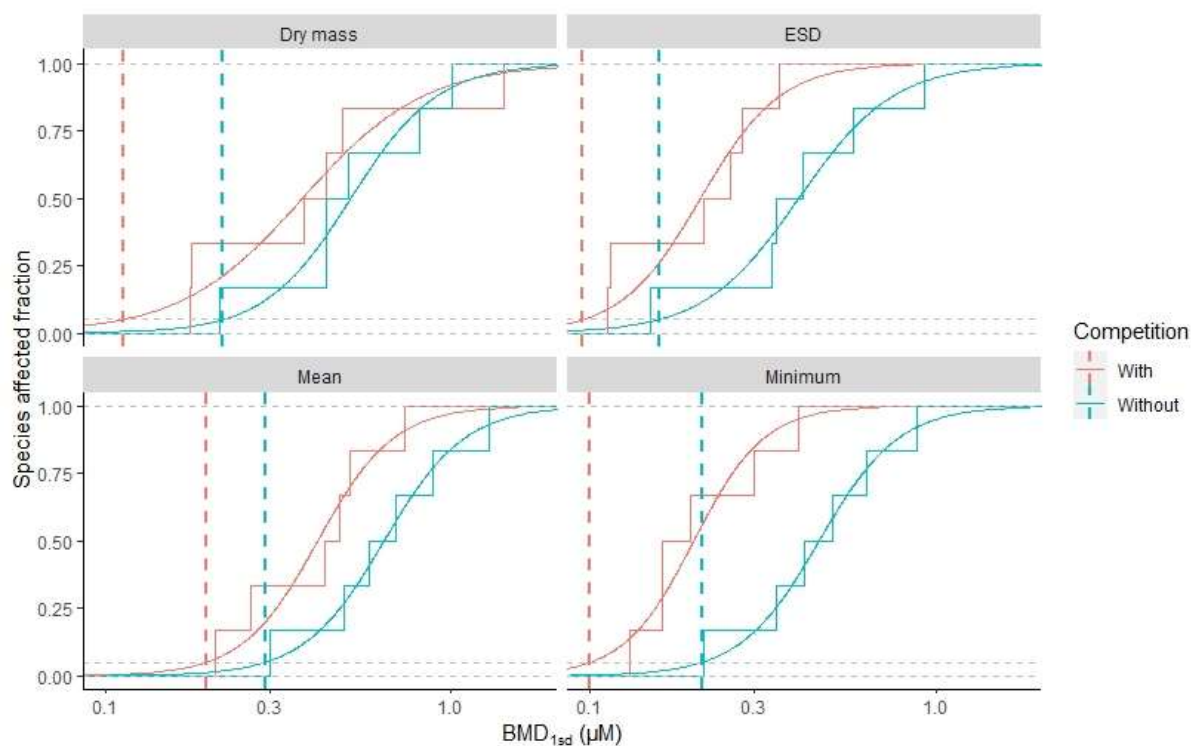


Figure 18 - Exemples de SSD produites à partir des BMD<sub>1sd</sub>. Les lignes horizontales en pointillés correspondent aux niveaux 0, 0.05 et 1. Les lignes verticales en pointillés indiquent les HC<sub>5</sub>.

#### 4.2.4 Discussion

Les plans d'expérience usuels pour les tests sur les plantes (ISO, OCDE) mesurent toujours quelques mêmes traits, comme la longueur des racines, ou la masse sèche totale, et considèrent qu'ils sont soit représentatifs de la santé des organismes, soit des marqueurs primaires dans la réponse à la contamination par rapport à d'autres paramètres biologiques (Krewski et al., 2011). Concernant la masse sèche totale, dans notre étude ce trait a en effet été régulé par le stress chimique pour toutes les espèces (Tableau 6). De plus, les CEC pour les masses sèches sont souvent parmi les plus faibles pour une espèce donnée, et donc les plus protectrices, plaidant en faveur de l'usage de ce trait en évaluation du risque. Le Fv/Fm a également été régulé par l'exposition chez toutes les espèces (Tableau 6). Ce paramètre biologique, au regard du mode d'action de l'isoproturon, qui inhibe spécifiquement le centre de réaction de la photosynthèse II (Grouselle et al., 1995), est donc un trait pertinent dans notre contexte. Dans notre étude, les contenus en pigments n'ont pas beaucoup été sélectionnés comme régulés par l'exposition (Tableau 6) en comparaison avec d'autres études préalables sur des herbicides inhibiteurs du photosystème II (Ramel et al., 2009, Sulmon et al., 2004). Nos résultats confirment que le LDMC n'est pas pertinent pour les tests écotoxicologiques. Enfin, la propension à répondre de la SLA et des traits de longueur est spécifique à certaines espèces, soulignant la mise en œuvre de stratégies espèce-dépendantes d'allocation d'énergie aux organes en réponse à un stress (Eziz et al., 2017, Xiong et al., 2018).

Un profil de réponse similaire a été observé chez certains groupes de traits. Ces différents groupes se distinguent sur la base de leur réponse (ou non) à l'exposition chimique chez les six espèces, ainsi que sur le classement des espèces en termes de tolérance. Un premier groupe rassemble la hauteur de ligule, la hauteur maximum des parties aériennes et la longueur des racines. Ces traits ont répondu à l'exposition pour les mêmes espèces : *D. glomerata*, *P. pratensis* et *P. trivialis*. Ces traits partagent également un même classement de tolérance pour les espèces concernées : *D. glomerata* > *P. pratensis* > *P. trivialis* (Figure 16). Un deuxième groupe est constitué des masses sèches (racines, parties aériennes et totale) et répondent à l'exposition chez toutes les espèces. A nouveau, un même classement de tolérance est observé, pour cinq des six espèces : *L. multiflorum* > *D. glomerata* > *A. elatius* > *P. pratensis* > *P. trivialis*. La tolérance de *T. flavescens* est plus variable selon les traits.

En accord avec notre première hypothèse, la compétition interspécifique a eu dans notre cas d'étude un effet négatif sur la tolérance des organismes face à un stress chimique, comme le montrent les valeurs de CEC calculées. Cette diminution des seuils protecteurs est propagée des CEC aux HC<sub>5</sub>, comme avancé dans notre deuxième hypothèse. La mise en évidence de cet effet est robuste, toutes les HC<sub>5</sub> étant réduites en présence de compétiteur, quels que soient le type de CEC (EC<sub>10</sub>, EC<sub>50</sub>, BMD<sub>1sd</sub>, BMD<sub>2sd</sub>) et la méthode d'intégration des traits.

La pertinence écologique des approches SSD est largement critiquée dans la littérature (Forbes et Calow, 2002, Del Signore et al., 2016). Il est également communément admis par les écotoxicologues ou les évaluateurs que le nombre et le choix des espèces intégrées dans une SSD, le choix d'une distribution, la méthode d'ajustement, etc. auront un impact sur la HC<sub>5</sub> estimée. Il me semble moins souvent mise en avant l'influence des choix pratiques qui constituent des hypothèses « cachées » : choix d'un type de CEC, choix d'une méthode d'intégration quand plusieurs traits sont disponibles, etc. qui rejoignent la question : comment définir un niveau d'effet acceptable ou critique pour une espèce ? Des choix qui constituent autant d'hypothèses, au niveau des expérimentations, des concepts et de la modélisation. Les hypothèses ne sont pas l'apanage de la modélisation (ou alors tout est modélisation ?).



## 4.3 Comment la compétition modifie-t-elle la réponse des plantes au stress chimique ?

### 4.3.1 Introduction

Prolongeant l'analyse du jeu de données présenté précédemment, par une approche de modélisation plus élaborée, cette partie traite de l'effet de la compétition non seulement sur la tolérance, résumée par une concentration d'effet critique, mais sur l'ensemble de la relation dose-réponse, caractérisée par quatre paramètres. Pour chaque trait, nous avons modélisé, toutes à la fois, les courbes dose-réponse pour les six espèces et les deux modalités de compétition afin d'évaluer de manière intégrée et comparative les effets de la compétition.

Nous avons émis les hypothèses suivantes :

- Un cadre de modélisation intégré aide à la compréhension de l'interaction entre le stress chimique et la compétition interspécifique
- La compétition interspécifique affecte négativement les réponses des plantes à l'herbicide

### 4.3.2 Matériel et méthodes

#### Principe de modélisation

Le but a été d'estimer les valeurs des paramètres des courbes dose-réponse et la modification de ces valeurs du fait de la compétition interspécifique. Lorsque l'on traite espèce par espèce, il est impossible de tirer des conclusions globales. Notre approche intégrée a permis de prendre en compte toutes les données simultanément et de co-interpréter les résultats observés chez les six espèces. Pour chaque trait biologique mesuré, douze courbes dose-réponse (six espèces \* deux modalités de compétition) ont été décrites au sein d'un même modèle hiérarchique, permettant d'étudier les effets de la compétition sur toutes les espèces à la fois. Le cadre de modélisation quantifie les effets de la compétition par exemple sur le niveau de réponse des témoins (sans stress chimique), ou un éventuel décalage des valeurs d'EC<sub>50</sub>.

#### Modèle de base

Pour chaque trait, le cadre de modélisation a été conçu pour englober douze courbes dose-réponse. Nous avons utilisé un modèle log-probit pour décrire ces courbes :

$$\mu_{i,j,k} = d_{i,j} - \Delta dc_{i,j} * \Phi \left( \frac{\log \left( \frac{x_k}{e_{i,j}} \right)}{b_{i,j}} \right) * rep_i \quad (\text{Equation 4.2})$$

$$y_{i,j,k,l} = \mu_{i,j,k} + \epsilon_{i,j,k,l} \text{ avec } \epsilon_{i,j,k,l} \sim N(0, S_i) \quad (\text{Equation 4.3})$$

Où  $i$  indique l'espèce,  $j$  la modalité de compétition ( $j = 0$  signifie absence de compétition,  $j = 1$  sa présence),  $k$  la concentration en isotroturon et  $l$  le réplicat.

$d$ ,  $\Delta dc$ ,  $e$  et  $b$  sont les quatre paramètres du modèle log-probit :

- $d_{i,j}$  est le niveau de réponse chez les témoins
- $\Delta dc_{i,j}$  est la différence entre entre  $d_{i,j}$  et le niveau de réponse à fortes concentrations
- $e_{i,j}$  est la concentration au niveau du point d'inflexion de la courbe, ce qui correspond à une valeur d'EC<sub>50</sub>
- $b_{i,j}$  est un paramètre de forme, plus il est faible, plus la pente maximale du modèle est forte.

Une illustration du rôle de chaque paramètre est présentée en Figure 19. Parce que les valeurs des  $e_{i,j}$  et  $b_{i,j}$  peuvent varier sur plusieurs ordres de magnitude, ils ont été manipulés en échelle log. On mentionnera donc par la suite  $\log e_{i,j}$  et  $\log b_{i,j}$ . Pour chaque espèce  $i$ , les réplicats sont supposés répartis autour des valeurs moyennes selon une distribution Normale caractérisée par un écart-type  $S_i$ . A noter que  $S$  ne dépend que de  $i$ , pour une espèce donnée il est considéré constant, et donc indépendant de la concentration d'exposition et de la compétition.  $rep_i$  est une indicatrice valant 1 ou 0, indiquant si le modèle log-probit est nécessaire pour décrire la relation dose-réponse, ou si un modèle constant au niveau  $d_{i,j}$  décrit la courbe aussi bien (pas de réponse le long du gradient de concentration). Par souci d'interprétabilité, nous avons considéré que  $rep_i$  doit avoir la même valeur avec et sans compétition, c'est pourquoi il est défini au niveau de l'espèce.

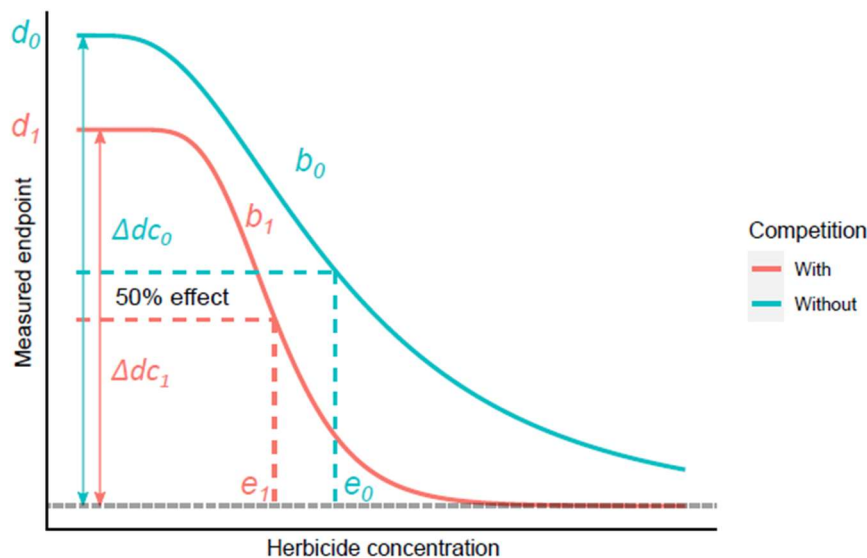


Figure 19 - Schéma illustrant le rôle des quatre paramètres du modèle dose-réponse et leur possible modification par la compétition : la courbe bleue et les paramètres indexés 0 réfèrent à la situation sans compétition, la courbe rouge et les paramètres indexés 1 réfèrent à la situation avec compétition. Tout ou partie de ces paramètres peuvent avoir des valeurs différentes en absence ou présence de compétiteur.

## Modélisation des effets de la compétition, et choix du meilleur modèle

Pour chaque espèce, on décrit deux courbes dose-réponse : une de paramètres  $d_{i,0}$ ,  $\Delta dc_{i,0}$ ,  $loge_{i,0}$  et  $logb_{i,0}$  pour la situation sans compétition et une de paramètres  $d_{i,1}$ ,  $\Delta dc_{i,1}$ ,  $loge_{i,1}$  et  $logb_{i,1}$  pour la situation avec compétition, tel qu'illustré en Figure 19. Pour chaque paramètre, la différence de valeur entre les deux modalités de compétition ( $d_{i,0} - d_{i,1}$  par exemple) a été définie par des paramètres de compétition appelés *compd*, *comp $\Delta$ dc*, *comploge* et *complogb*. Si l'on essaie de traduire ces éléments de modélisation en termes biologiques, *compd* représente la modification du niveau de réponse chez les témoins sans stress chimique, et montre donc les effets de la compétition seule sur les traits mesurés. Les trois autres paramètres correspondent pour leur part à une modification des effets toxiques par la compétition : *comp $\Delta$ dc* traduit un changement d'amplitude de réponse entre les faibles et fortes concentrations, *comploge* un changement d' $EC_{50}$  (abscisse du point d'inflexion de la courbe) et *complogb* un changement dans la pente de la courbe dose-réponse.

Pour un trait donné, nous avons considéré trois possibilités pour chaque paramètre de compétition, correspondant à trois types d'effet. Premièrement, l'effet de la compétition peut être nul, on aura dans ce cas une même valeur de paramètre avec ou sans compétition. Deuxièmement, l'effet de la compétition peut avoir une valeur fixe et commune à toutes les espèces, on parlera alors d'un effet fixe, ou générique, de la compétition. Troisièmement, l'effet de la compétition peut avoir une valeur différente chez chaque espèce, on parlera dans ce cas d'un effet aléatoire, ou spécifique, de la compétition. Dans ce dernier cas, on suppose toutefois que les valeurs chez les différentes espèces suivent une distribution Normale.

Le choix entre ces trois possibilités est basé sur une procédure de choix du meilleur modèle en termes d'ajustement aux données. Le DIC (Deviance Information Criteria), un critère de qualité d'ajustement, a été calculé pour des modèles construits pour toutes les combinaisons de types d'effet pour chaque paramètre de compétition. La combinaison menant au DIC le plus faible (qui correspond au meilleur ajustement) est élue meilleur modèle. Quand plusieurs combinaisons mènent à des DIC proches (écart inférieur à 2), suivant le principe de parcimonie, le modèle le plus simple est conservé.

## Inférence et estimation des paramètres

Les paramètres ont été estimés par inférence Bayésienne. Cette méthode fournit des estimations sous forme de distributions de probabilité (appelées distribution *a posteriori*), dont les médianes ou moyennes peuvent servir d'estimations ponctuelles des paramètres et les quantiles à 2.5 et 97.5% permettent de définir des intervalles de crédibilités à 95%. Cette méthode, basée sur des algorithmes de type Monte Carlo Markov Chain (MCMC), converge vers ces estimations en mettant à jour des distributions *a priori* pré-supposées pour les paramètres de manière à trouver les valeurs permettant d'optimiser la vraisemblance des données analysées.

Dans ce travail, nous avons défini des distributions *a priori* peu informatives, ayant pour unique objectif de contenir les valeurs de paramètres dans des gammes raisonnables, et ainsi d'éviter d'éventuels problèmes numériques liés à des valeurs extrêmes. Tous les détails sur le modèle, les paramètres, les distributions *a priori* utilisées et la mise en œuvre des MCMC figurent dans Baillard et al. (2021) et son matériel supplémentaire. Nous avons utilisé JAGS (Plummer, 2003) depuis R (R Core Team, 2019) *via* le package Rjags (Plummer, 2016).



### 4.3.3 Résultats

Pour la grande majorité des traits, nous avons obtenu des courbes dose-réponses qui décrivent bien les données. Les exceptions concernent les contenus en caroténoïdes et en chlorophylle, pour lesquels il y a une forte variabilité inter-réplicats et une variation modeste le long du gradient d'exposition. Ces deux traits sont écartés pour la suite des résultats.

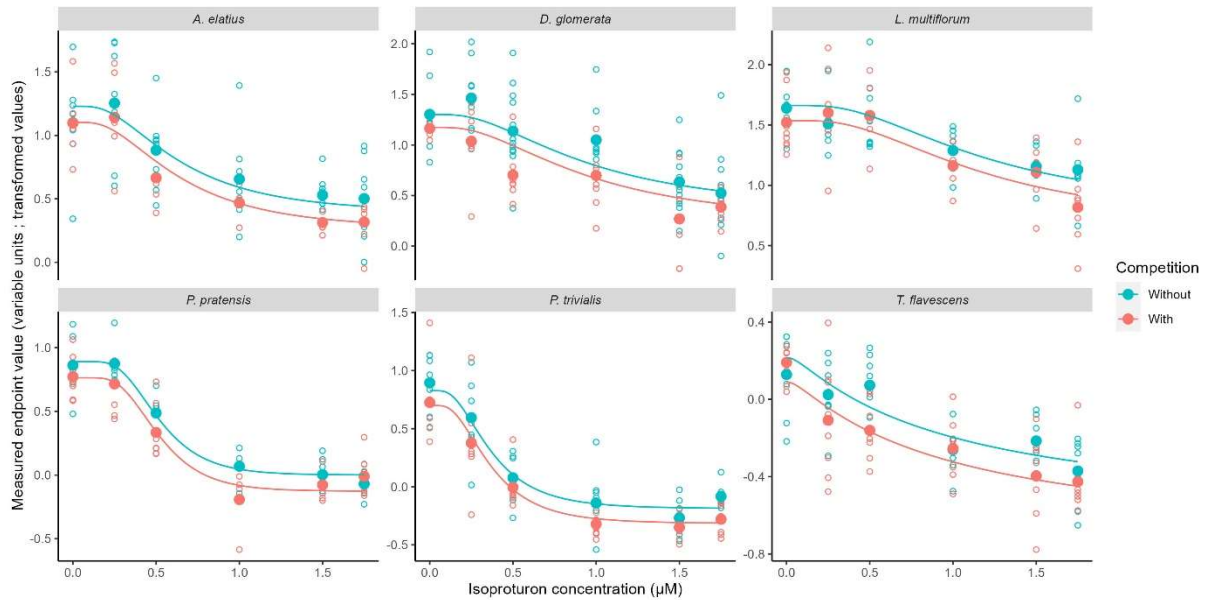
La partie haute du Tableau 7 montre, pour chaque paramètre du modèle log-probit, quels types d'effet de la compétition (effet nul, effet fixe ou effet aléatoire) sont mis en évidence dans le meilleur modèle pour chaque trait. Pour chaque trait, au moins un paramètre de la courbe dose-réponse voit sa valeur modifiée par la compétition. Cependant, pour deux traits, la longueur des racines et la masse sèche des racines, la compétition n'a modifié que le paramètre  $d$ , le niveau de réponse chez les témoins non exposés, et non les paramètres liés à la toxicité.

Tableau 7 - En partie haute, les meilleurs modèles choisis par la procédure décrite. Pour chaque trait, il est indiqué le type d'effet pour chaque paramètre de compétition (- signifie effet nul de la compétition). En partie basse, table de contingence des types d'effet.

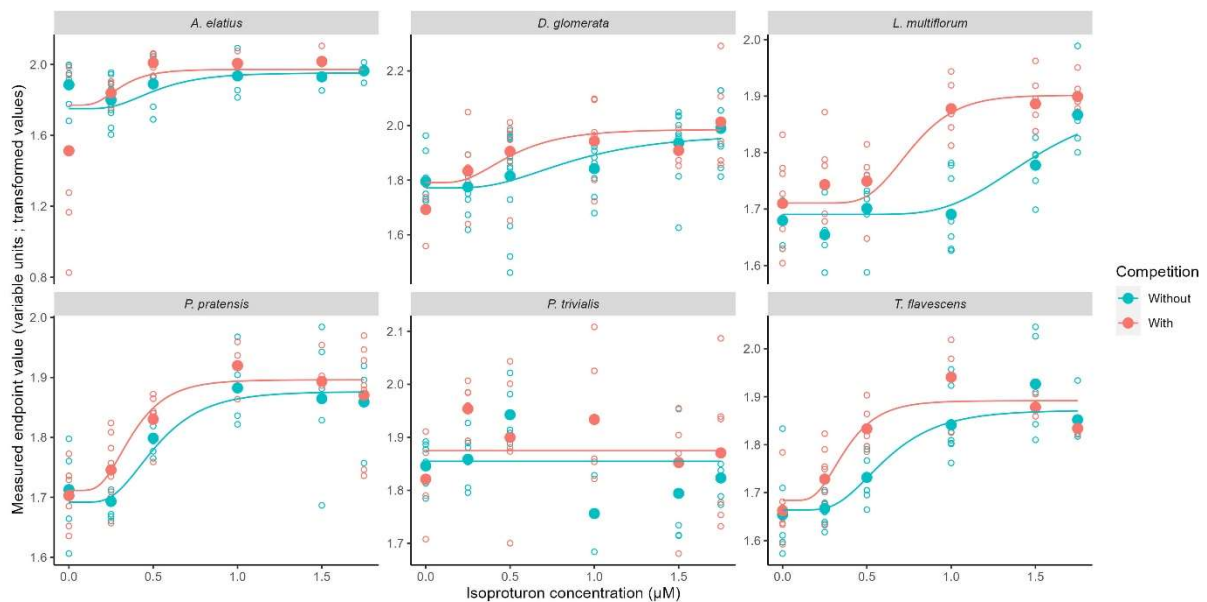
Trait	Effet de la compétition sur les paramètres			
	<i>compd</i>	<i>compΔdc</i>	<i>comploge</i>	<i>complogb</i>
<b>Fv/Fm</b>	-	-	-	Fixe
<b>LDMC</b>	-	-	Fixe	Fixe
<b>Hauteur ligule</b>	-	Fixe	Fixe	Fixe
<b>Hauteur max</b>	Aléatoire	Fixe	-	-
<b>Masse racines</b>	Fixe	-	-	-
<b>Longueur racines</b>	Fixe	-	-	-
<b>Masse aérienne</b>	Aléatoire	-	Fixe	-
<b>SLA</b>	Fixe	-	Aléatoire	-
<b>Masse totale</b>	Aléatoire	-	Fixe	-
<b>Synthèse des types d'effet</b>				
<b>Total effet nul</b>	3	7	4	6
<b>Total effet fixe</b>	3	2	4	3
<b>Tot. effet aléatoire</b>	3	0	1	0

La Figure 20 donne deux exemples d'ajustement, pour la masse sèche des racines en Figure 20a et pour la SLA en Figure 20b. Ces deux exemples permettent d'illustrer comment se traduisent des effets fixes et des effets aléatoires dans les courbes dose-réponse. Pour la masse sèche des racines (et c'est aussi le cas de la longueur des racines), il n'y a qu'un effet de la compétition : un effet fixe sur le paramètre  $d$ , niveau de réponse chez les témoins non exposés (asymptote à gauche). Les autres paramètres ne sont pas affectés par la compétition, l'ensemble de la courbe avec compétition est donc une translation vers le bas de la courbe sans concentration. Pour la SLA, le meilleur modèle inclut un effet fixe sur  $d$ , comme dans l'exemple précédent, et un effet aléatoire sur  $loge$ ,  $e$  étant l'abscisse du point d'inflexion (équivalente à la  $EC_{50}$ ). Cela

se traduit sur la Figure 20b par un décalage horizontal du point d'inflexion, variable selon les espèces, alors que le décalage vertical est fixe. Pour la SLA, la compétition interspécifique a modifié la manière dont les plantes répondent à l'exposition chimique, en rendant certaines espèces plus sensibles à l'herbicide. On observe une exception pour *P. trivialis* qui n'affiche pas de réponse significative à l'isoproturon, ni en présence ni en absence du compétiteur. Dans ce cas, l'indicatrice  $rep_i$  a été estimée à 0.



(a) Root DM endpoint



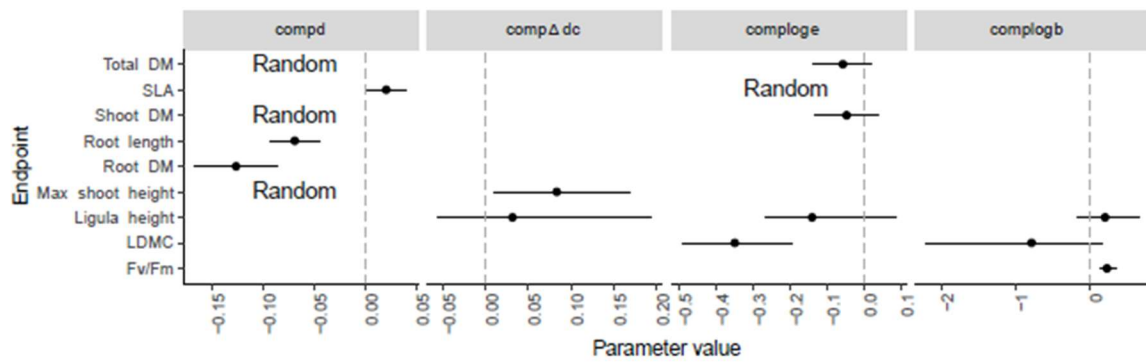
(b) SLA endpoint

Figure 20 - Exemples de courbes dose-réponse correspondant aux meilleurs modèles pour la masse sèche des racines (partie haute) et la SLA (partie basse). Les points creux représentent les données brutes, les points pleins la moyenne des réplicats pour chaque concentration, les courbes les modèles dose-réponse.

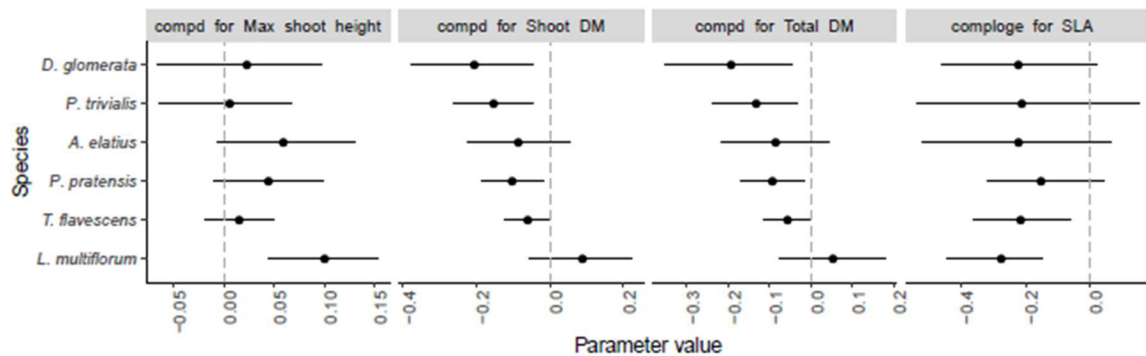
Les masses sèches des parties aériennes et totales présentent des résultats proches de ceux de la SLA. La compétition a eu un effet sur les deux mêmes paramètres, mais cette fois un effet aléatoire sur  $d$  et un effet fixe sur  $loge$ . Les meilleurs modèles pour Fv/Fm, LDMC, et hauteur de ligule, montrent des effets fixes de la compétition, sur  $logb$ ,  $loge$  et  $logb$ , et  $loge$ ,  $logb$ , et  $\Delta dc$ , respectivement. Les effets de la compétition sur  $loge$  et/ou  $logb$  concourent à démontrer une modification de la sensibilité des espèces. Les effets sur  $\Delta dc$  sont plus compliqués à interpréter, ils reflètent un changement dans l'amplitude de la réponse entre les deux asymptotes de la courbe dose-réponse. En l'absence d'effet sur  $d$ , comme c'est le cas pour la hauteur de ligule, l'effet fixe sur  $\Delta dc$  signifie que les espèces ont été plus fortement impactées aux fortes concentrations quand la pression de compétition était présente.

La partie basse du Tableau 7 nous permet de synthétiser : ajouter un effet de la compétition à 16 paramètres (sur un maximum de 36) permet une meilleure description des données. Ces effets sont principalement fixes (12 fois sur 36), les effets aléatoires étant rarement sélectionnés par notre procédure de modélisation (4 fois sur 36).

Les graphiques de la Figure 21 rendent compte des effets de la compétition sur les paramètres : en partie haute pour les effets fixes (c'est-à-dire les effets génériques, communs à toutes les espèces) et en partie basse pour les effets aléatoires (c'est-à-dire les effets spécifiques à chaque espèce). Ces représentations montrent que les effets sont toujours négatifs sur  $loge$ , qu'ils soient fixes ou aléatoires, reflétant une diminution de la tolérance en présence de compétiteur. Les effets sur  $d$ , qui reflètent les effets de la compétition seule (en absence d'exposition chimique) sont positifs ou négatifs, en fonction des traits (par exemple effet fixe positif pour la SLA, effet fixe négatif pour longueur et masse sèche des racines). Lorsque les effets sur  $d$  sont aléatoires (hauteur des parties aériennes, masse sèche aérienne et masse sèche totale), ils sont parfois positifs pour certaines espèces et négatifs pour d'autres. A noter que le classement des espèces est similaire pour les trois traits : *D. glomerata* et *P. trivialis* subissent les effets les plus fortement négatifs (ou faiblement positifs), *A. elatius*, *P. pratensis* et *T. flavescens* des effets intermédiaires et *L. multiflorum* les effets les plus positifs. Ces traits « aériens » mettent en évidence des différences de capacité compétitive entre les espèces.



(a) For the fixed effect parameters.



(b) For the random effect parameters.

Figure 21 - Estimations ponctuelles (points) et intervalles de crédibilité (segments) des paramètres de compétitions, dans le cas où ces derniers sont fixes (en partie haute) ou aléatoires (en partie basse). La ligne pointillée grise indique la valeur zéro. Random = Aléatoire.

#### 4.3.4 Discussion

Au-delà de confirmer les effets de la compétition inter-spécifique dans nos bioessais, les résultats de cette Partie 4.3 ont montré comment, en détail, les plantes répondent à la présence de compétiteurs (*B. erectus*) et à l'exposition à l'isoproturon.

Le paramètre *compd* reflète les effets de la compétition en condition témoin. Dans cette situation la compétition a agi principalement sur les parties aériennes, avec notamment une augmentation de la hauteur maximum des parties aériennes (Figure 21b) et de la surface foliaire spécifique (SLA) (Figure 21a). En effet, l'augmentation de la hauteur et de la SLA est caractéristique de la réponse à l'ombrage, en permettant une interception accrue de la lumière (Fan et al., 2019, Yang et al., 2019). L'augmentation de la surface foliaire spécifique (SLA) est commune à toutes les espèces, tandis que le paramètre *compd* est aléatoire pour la hauteur des parties aériennes et leur masse sèche. Cela traduit une capacité compétitive variable selon les espèces, *L. multiflorum* se révélant l'espèce la plus compétitrice. D'autres espèces, comme *E. elatius* et *P. pratensis*, sont capables d'augmenter leur hauteur au détriment de la masse sèche produite.

Etant donné ses effets ciblés sur le système photosynthétique II (PSII), l'exposition à l'isoproturon engendre une situation de perturbation du PSII au niveau des feuilles et de stress oxydatif avec une cascade de conséquences régulationnelles et développementales impliquant des mécanismes métaboliques, hormonaux et de signalisation entre racines et parties aériennes (Grouselle et al., 1995, Sulmon et al., 2007, Ramel et al., 2009). Les parties aériennes ont donc été la cible à la fois de la compétition inter-spécifique (*via* ombrage) et de l'isoproturon. Cela explique les résultats du Tableau 7 où les paramètres relatifs à la réponse à l'exposition chimique (*comp $\Delta$ dc*, *complog $e$*  et *complog $b$* ) ne montrent un effet de la compétition que pour les traits associés aux parties aériennes.

Le paramètre *complog $e$*  correspond à la modification de l'EC<sub>50</sub> due à la compétition. Il est le paramètre le plus facile à interpréter en tant que marqueur de l'interaction entre compétition et stress chimique. Les résultats pour ce paramètre montrent que la compétition a significativement réduit l'EC<sub>50</sub> au regard des traits « aériens » suivants : LDMC, SLA, hauteur de ligule, et masse sèche (Figure 21). En tant que traits fonctionnels directement impliqués dans la réponse à la compétition (Fan et al., 2019, Yang et al. 2019), le LDMC et la surface foliaire spécifique (SLA) ont été particulièrement affectés par la compétition. Ces traits sont donc pertinents pour conclure que la compétition inter-spécifique rend les plantes plus sensibles à l'isoproturon. Les masses sèches aérienne et totale sont quant à elles des traits de performance des plantes plus globaux, résultant de l'intégration des réponses des traits fonctionnels à la compétition et au stress chimique. Les paramètres de compétition *comp $\Delta$ dc*, *complog $e$*  et *complog $b$*  sont en grande majorité fixes, c'est-à-dire génériques à toutes les espèces testées.

Les paragraphes ci-dessus résument des pages de discussion sur de possibles *trade-offs*, allègement des pressions, etc. développées par nos collègues spécialistes de la physiologie des plantes (Baillard et al., 2021). Je ne me risquerai pas à détailler ici leur interprétation vis-à-vis de processus de physiologie végétale qui sont loin de mes disciplines de spécialité. Néanmoins, l'objectif de cette partie était de permettre la discussion et l'interprétation des résultats de ce cadre de modélisation approfondie. Les fruits de notre collaboration avec Cécile Sulmon et ses collègues prouvent l'intérêt de cette approche.

## 4.4 Bilan et perspectives

### Synthèse

Les résultats de l'approche « classique » (Partie 4.2) montrent que les différentes espèces tendent à afficher une plus grande sensibilité à la toxicité de l'isoproturon en présence du compétiteur qu'en son absence. La compétition amène également à une réduction des HC<sub>5</sub> estimées, ce qui reflète une augmentation de la sensibilité à l'échelle de l'assemblage, ou de la communauté. Cette réduction, selon la méthodologie employée, atteint dans notre cas d'étude un ordre de grandeur, ce qui remet en cause la pertinence des facteurs de sécurité habituellement appliqués en évaluation du risque.

Les résultats de l'approche « hiérarchique » (Partie 4.3) montrent que, au regard de onze traits biologiques, les six espèces de poacées étudiées sont impactées de manière similaire par la compétition, tandis que dans de plus rares situations (et surtout en absence d'exposition) on observe un effet spécifique. Cette étude précise comment la compétition modifie la réponse des plantes au stress chimique et comment l'impact de cette interaction biotique varie d'une espèce à l'autre.

L'analyse du même jeu de données par ces deux approches illustre la valeur que peut ajouter une modélisation élaborée à l'interprétation d'un jeu de données. Là où l'approche classique analyse indépendamment des sous-jeux de données (i.e. chaque espèce), l'approche hiérarchique intègre l'ensemble et formule des hypothèses précises (i.e. effets de la compétition nul, génériques ou spécifiques sur chacun des quatre paramètres du modèle dose-réponse) qui peuvent ensuite être évaluées, enrichissant ainsi l'interprétation des données.

L'approche « classique » peut paraître plus simple, mais ne nous y trompons pas : d'un point de vue mathématique, elle nécessite l'estimation de 4 paramètres pour chaque trait, pour chaque espèce et pour chaque modalité de compétition, soit un total de  $4*6*11*2 = 528$  paramètres (et encore, sans compter les paramètres de variabilité résiduelle). Beaucoup plus sobres, les meilleurs modèles pour chaque trait de l'approche « hiérarchique » comptent  $4*6*11*1 = 264$  paramètres pour la partie sans compétition auquel il faut ajouter 36 paramètres de compétition soit un total de 300 paramètres (toujours sans la variabilité) : cette parcimonie est la marque d'un modèle plus simple.

### Perspectives

Les projets RESI-ADAPT (EC2CO 2023), EXPOTROPHIQU (Ecophyto 2023-2026) et PESTITROPHIC (ANR PRC 2023-2027), récemment démarrés, fourniront un cadre de choix pour poursuivre les travaux, toujours avec les mêmes partenaires et toujours sur les bandes enherbées. De manière générale, ces projets portent sur l'exposome des paysages agricoles (en agriculture conventionnelle et en agriculture Bio), et les conséquences écologiques et évolutives des pesticides sur les communautés d'espèces non cibles. En particulier, ils prévoient d'étudier différents acteurs de la chaîne tritrophique : poacée – puceron – parasitoïde, et de mesurer les effets d'expositions chroniques aux pesticides sur les organismes, isolément (lorsque cela est possible) ou associés en système trophique. Nous envisageons le développement de modèles dose-réponse hiérarchiques pour évaluer la généralité des réponses de différentes espèces de poacées/pucerons, l'impact des interactions trophiques, et l'effet des pesticides sur le fonctionnement de la chaîne trophique.



## 5 Modélisation dose-réponse de données omiques

### 5.1 Contexte

Le point de départ des travaux développés dans ce chapitre est le projet MicroERA, une application pour bourse postdoctorale Marie Curie conçue en collaboration avec Floriane Larras (à l'époque postdoc au LIEC, par la suite postdoc à l'UFZ) et Mechthild Schmitt-Jansen (UFZ, Leipzig), écotoxicologue microbienne. Le projet **MicroERA** (2016-2018) « *Ecological Sensitivity Distribution: integrating molecular-based structural and functional Microbial community responses in a new tool for Environmental Risk Assessment of chemicals* », avait pour objectif l'intégration de données de transcriptomique et de métabolomique dans les outils d'évaluation du risque environnemental. L'idée proposée était d'ajouter la notion de protection des processus fonctionnels à la problématique de protection des communautés qui est classiquement focalisée sur des paramètres structurels. En considérant les réponses moléculaires (ici réponse transcriptomique) comme des *proxys* des processus fonctionnels, nous avons proposé de construire des *Function Sensitivity Distribution (FSD)*, complémentaires des *Species Sensitivity Distribution (SSD)*.

Lors de la soumission du projet MicroERA, nous avons naïvement prévu, pour chaque transcrit, de construire une courbe dose-réponse avec des outils existants (e.g. package R *drc*), tel que décrit par Smetanova et al. (2015) et d'en dériver une concentration d'effet critique (e.g. EC, BMD). La tâche s'est avérée plus ardue que prévu, nous poussant à développer un outil *ad hoc*. Grâce au renfort déterminant d'une collègue du LBBE, Marie Laure Delignette-Muller, la tâche de modélisation dose-réponse des données transcriptomiques a abouti à la création d'un package R dédié, intitulé DRomics. Depuis, l'outil DRomics a pris de l'ampleur, grâce à l'investissement de Marie Laure et d'Aurélié Siberchicot, ingénieure informatique au LBBE, qui a développé une interface en ligne pour le package. Son développement faisait l'objet du projet EC2CO **DROMADERE** (2019-2020), « Développement sous R d'Outils de Modélisation pour l'Analyse des Données « omiques » en vue de l'Evaluation du Risque Ecotoxicologique » (je ne suis pas peu fier du titre/acronyme !). L'outil DRomics s'est enrichi au gré des discussions avec des collègues biologistes, qui partagent leurs besoins, leurs données et leurs idées. Je pense notamment à Floriane et Mechthild (UFZ), à Philippe Veber (LBBE), à Sophie Prud'homme (LIEC) et son projet sur les poissons-zèbres, à notre stagiaire Ellis Franklin, à Aurélié Cébron (LIEC) et l'équipe du projet ANR EndoMix, à Romain Coulaud (SEBIO), ainsi qu'à ceux qui ont davantage interagi avec Marie Laure, Sandrine Frelon et Olivier Armant (IRSN).

Ce chapitre est organisé en quatre parties :

- Une présentation synthétique de DRomics, de son positionnement par rapport à d'autres outils, et de son évolution depuis sa première version publiée en 2018.
- Un premier exemple d'application avec la réponse fonctionnelle (aux niveaux transcriptomique et métabolomique) de la microalgue *Scenedesmus vacuolatus* exposée au biocide triclosan.
- Un deuxième exemple d'application avec la réponse transcriptomique de biofilms aquatiques au diuron et la question d'une tolérance induite par une préexposition.
- Une partie de bilan et perspectives.

Une présentation détaillée de DRomics est disponible sous forme de vignette à l'adresse : [https://cran.r-project.org/web/packages/DRomics/vignettes/DRomics\\_vignette.html](https://cran.r-project.org/web/packages/DRomics/vignettes/DRomics_vignette.html)



## 5.2 Développement de DRomics

### 5.2.1 Introduction

Récemment ont émergé, dans le domaine de l'écotoxicologie, des travaux utilisant des données omiques (e.g. transcriptomique, protéomique, métabolomique) (Zhang et al., 2018). Ces approches (multi-)omiques visent à une compréhension des mécanismes d'effets des contaminants, dans une perspective *Adverse Outcome Pathway* (AOP) (chemin d'effet néfaste). Ils permettent d'identifier des modes d'action potentiels au niveau moléculaire, qui devront ensuite être validés par des expérimentations ciblées (Andersen et al. 2018).

La modélisation dose-réponse fait partie de la boîte à outils des écotoxicologues. Cette approche est classiquement appliquée aux paramètres apicaux mesurés lors de bioessais (e.g. survie, croissance, photosynthèse). Les seuils de sensibilité qui en sont déduits, telles que les *Effective Concentrations* (ECx), ou *Benchmark Doses* (BMD), sont la base des procédures réglementaires d'évaluation du risque. Les plans d'expérience dose-réponse typiques, avec de nombreuses doses testées (>6) assurent une bonne description de la relation dose-réponse, et une estimation précise et robuste d'un seuil de sensibilité (Ewald et al., 2022). Cependant, de tels plans expérimentaux sont peu déployés dans les études omiques, car les outils classiquement utilisés pour analyser les données omiques sont dédiés à l'analyse différentielle entre quelques conditions (limma, Ritchie et al., 2015, DESeq2, Love et al., 2014, EdgeR, Robinson et al., 2010). Dans la littérature récente, l'analyse typique d'un jeu de données omiques commence par une analyse différentielle de chaque condition comparée au témoin, suivie d'une procédure d'enrichissement pour identifier les termes GO (Gene Ontology) ou les voies biologiques KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) des items (transcrits, gènes, protéines, ...) (Dubois et al., 2019, Murat El Houdigui et al., 2019, Meier et al., 2020, Zhan et al., 2021). Dans un second temps, certains auteurs, lorsqu'ils ont testé un nombre suffisant de doses, ajustent des modèles dose-réponse aux items différentiellement régulés pour estimer une BMD par item, et résumer la sensibilité de chaque voie moléculaire par exemple par la médiane des BMD correspondantes (Meier et al., 2020, Zhan et al., 2021).

La complexité de la modélisation dose-réponse pour des données omiques résulte principalement de trois aspects, qui ont été centraux dans le développement de DRomics :

- Les approches « omiques » ont la particularité d'être non-ciblées, et par conséquent de générer des jeux de données de très grande dimension : par exemple, des données transcriptomiques correspondent au niveau d'expression de millions de gènes. La modélisation des relations dose-réponse et le calcul de seuils de sensibilité doivent donc être automatisés et reposer sur une procédure robuste.
- La courbe dose-réponse sigmoïde, typique pour les paramètres apicaux, n'est qu'exceptionnellement observée pour les données de type « omique », il faut donc utiliser d'autres modèles dose-réponse.
- La nature des données à traiter doit être prise en compte. Le but de DRomics est de fournir un outil capable d'analyser de manière équivalente chaque type de données (fluorescences en transcriptomique par microarray, comptes de copies de transcrits en RNAseq, aires sous la courbe en spectrométrie de masse, etc.)

## 5.2.2 Caractéristiques de DRomics en comparaison des autres outils dédiés aux données omiques acquises en dose-réponse

Grace à une revue de littérature dans les domaines de la toxicologie et de l'écotoxicologie, nous avons identifié cinq outils disponibles pour l'analyse dose-réponse de données omiques à haut débit (Tableau 8). Leur *workflow* (i.e. procédé d'analyse) est constitué d'étapes successives : premièrement, la sélection des items (contigs, protéines, ...) significativement régulés le long du gradient d'exposition. Deuxièmement, pour les items sélectionnés, des relations dose-réponse sont modélisées et des BMD sont dérivées de ces modèles. Pour rappel, la  $BMD_{zSD}$  est définie comme la dose qui mène à une réponse (BMR) correspondant à un écart au témoin de  $z$  fois l'écart-type résiduel du modèle dose-réponse (souvent avec  $z=1$ , EFSA, 2017).

Le premier logiciel développé pour analyser des données omiques à haut-débit acquises en dose-réponse, en particulier des données d'expression de gènes (transcriptomique), est BMDEExpress, publié dans sa première version en 2007 (Yang et al., 2007). Il a depuis été mis à jour et augmenté en BMDEExpress-2 (Philips et al., 2019). FastBMD (Ewald et al., 2021) implémente les mêmes méthodes, celles préconisées par le *US National Toxicology Program* (NTP, 2018), avec le souci d'être plus rapide que BMDEExpress et plus convivial, *via* une interface web. Toujours dans le contexte de la toxicogénomique, BBMD (Ji et al., 2022) a la spécificité d'utiliser la technique du *model averaging* pour prendre en compte l'incertitude associée au modèle dose-réponse, et BMDx (Serra et al., 2020) vise à faciliter une comparaison des valeurs de BMD obtenues dans différentes conditions expérimentales. [Dans les faits, ces deux derniers outils sont très peu cités par d'autres chercheurs et se sont révélés ininstallables (et donc inutilisables) lors de nos essais.] Nous avons développé DRomics en 2018 (Larras et al., 2018) pour l'analyse dose-réponse de tout type de données omiques (transcriptomique, métabolomique, ...), y compris pour des organismes non-séquencés ou des communautés (données méta-omiques) qui sont couramment utilisés comme modèle biologique en écotoxicologie. Les principales caractéristiques et fonctionnalités des cinq outils logiciels sont résumées dans le Tableau 8.

Tableau 8 - Principales caractéristiques des outils disponibles pour l'analyse dose-réponse de données omiques à haut débit.

	Logiciel	DRomics	BMDEExpress 2	FastBMD	BBMD	BMDx
Généralités	Références	Larras et al., 2018	Yang et al., 2007 Philips et al., 2019	Ewald et al., 2021	Ji et al., 2022	Serra et al., 2020
	Principal domaine d'application	Ecotoxicologie	Toxicologie	Toxicologie	Toxicologie	Toxicologie
	Plateforme	R package, Web app. (R Shiny) gratuite et sans inscription	standalone application gratuite qui doit être installée localement	Web app. gratuite et sans inscription	Web app. avec inscription (free or premium accounts)	Web app. (R Shiny) à déployer localement (pas de serveur - source sur GitHub)
	Open source	oui (CRAN, GitHub)	oui (GitHub)	Non	Non	oui (GitHub)
	Langages de programmation	R	Java, C, Fortran	R, JavaServer Faces (JSF)	Python, Javascript	R
	Date de la première version	2019	2007	2021	2022	2019
	Date de la dernière révision (telle qu'au 02/02/2023)	2023	2020 BMDEExpress 3 en préparation <a href="https://github.com/auerbachs/BMDEExpress-3">https://github.com/auerbachs/BMDEExpress-3</a>	2022	2022	2022
Dépendances à d'autres packages R	limma, DESeq2 (packages Bioconductor)	non mentionné	limma, vsn, edgeR, DESeq2, genefilter et preprocessCore (packages Bioconductor)	non mentionné	drc, bmd, alr3, jtools (alr3 et bmd ne sont plus disponibles sur le CRAN)	
Importation/ Visualisation des données	Types de données pour lesquels l'outil est conçu	RNAseq, microarray, données omiques continues, données apicales continues	Données transcriptomiques (ne différencie pas microarray et RNAseq) ou autres données continues	RNAseq, microarray	RNAseq, microarray, données apicales continues, données apicales binaires	Données transcriptomiques (ne différencie pas microarray et RNAseq)
	Preprocessing des données transcriptomiques (microarray/RNAseq)	Oui	non	Oui	Non	non
	Graphiques proposés pour vérifier l'import des données	PCA + Boxplot	PCA + Densité	PCA + Boxplot + Densité	PCA + Densité	aucune
Sélection des réponses significative- ment régulées	Sélection des réponses significatives le long du gradient de doses	Oui	oui	Oui	Oui	oui
	Filtre sur le <i>fold change</i> pour la sélection	Non	optionel (par défaut oui, > 2)	optionel (par défaut oui, > 1)	oui obligatoire (> 1.5 au moins)	non
	Contrôle du FDR pour la sélection	Oui	optionel (par défaut non)	optionel (par défaut non)	Oui	optionel
	Méthodes proposées pour la sélection	ANOVA, test de tendance linéaire ou quadratique (pour la sélection des réponses monotones et biphasiques)	ANOVA, test de tendance de William, Oriogen (pour la sélection des réponses monotones)	ANOVA	ANOVA, test de tendance de William, Oriogen (pour la sélection des réponses monotones)	ANOVA ou test de tendance (monotone)

<b>Modélisation dose-réponse</b>	<b>Formes des modèles proposés</b>	monotone et biphasique	monotone, biphasique, multiphasique (polynômes d'ordre 3 et 4)	monotone, biphasique, multiphasique (polynômes d'ordre 3 et 4)	monotone	monotone, biphasique, multiphasique (polynômes d'ordre 3)
	<b>Sélection de modèles par l'utilisateur</b>	Non	oui	Oui	Oui	oui
	<b>Critères proposés pour le choix du meilleur ajustement</b>	AICc (défaut), AIC, BIC	AIC et comparaison de modèles emboîtés	AIC	<i>model averaging</i>	AIC
	<b>Caractérisation de la réponse</b>	croissante (sur-réglée), décroissante (sous-réglée), en U, en cloche	aucune	Aucune	croissante, décroissante	aucune
	<b>Seuils de toxicité fournis</b>	BMD-zSD	BMD-zSD	BMD-zSD	BMD-zSD	BMD-zSD
	<b>Méthode de calcul des intervalles de confiance des seuils de toxicité</b>	Bootstrap	basée sur la vraisemblance mais pas précisément décrite	méthode du profil de vraisemblance	<i>model averaging</i>	non renseignée
<b>Interprétation biologique</b>	<b>Inclut l'étape d'annotation</b>	Non	oui (6 espèces)	oui (14 espèces)	oui (6 espèces)	oui (3 espèces)
	<b>Espèces disponibles pour l'annotation</b>	Aucune	<i>H. sapiens, M. musculus, C. lupus familiaris, R. norvegicus, D. melanogaster, D. rerio</i>	<i>H. sapiens, M. musculus, R. norvegicus, C. elegans, D. melanogaster, D. rerio, S. cerevisiae, A. thalian, B. taurus, G. gallus, C. japonica, X. laevis, P. promelas, O. mykiss, + annotation-free pipeline, Seq2Fun Ortholog</i>	<i>H. sapiens, M. musculus, R. norvegicus, , D. melanogaster, D. rerio, B. taurus</i>	<i>H. sapiens, M. musculus, R. norvegicus</i>
	<b>Bases de données d'annotation</b>	Aucune	GO, reactome	KEGG, GO (BP, MF, CC), reactome	GeneID, GO, reactome, KEGG	KEGG, reactome, GO
	<b>Fonctions pour comparer les réponses à différents niveaux expérimentaux (multi-omics, diff. conditions, ...)</b>	Oui	pas trouvées	pas trouvées	pas trouvées	oui

## Généralités

DRomics est le seul outil qui est composé à la fois d'un package R et d'une application web gratuite, baptisée DRomics-shiny. Nous avons choisi le langage R, notamment i) pour faciliter l'interopérabilité avec les packages Bioconductor qui implémentent les méthodes bioinformatiques les plus en pointe, ii) pour permettre l'ajout d'une application Shiny (*interactive web app straight from R*) qui peut être lancée localement depuis le package ou sur un serveur librement accessible sans inscription (<https://lbbe-shiny.univ-lyon1.fr/DRomics/inst/DRomics-shiny/>). Ainsi, l'application DRomics-shiny a été pensée pour les utilisateurs qui ne souhaitent pas travailler dans l'environnement de programmation R, et également pour aider de nouveaux utilisateurs à prendre en main le package : pour cela, le code R de l'analyse réalisée est fourni en dernier onglet de l'application Shiny, et peut constituer un point de départ pour explorer le package.

## Sélection des items régulés

Dès le départ, DRomics a été conçu pour analyser des données issues de plan d'expérience dose-réponse, favorisant le nombre de doses testées plutôt que le nombre de réplicats par dose, ou même des données observationnelles sans réplicat (une dose par échantillon). C'est pourquoi, pour l'étape de sélection des items significativement régulés le long du gradient d'exposition, nous ne nous sommes pas tournés vers les méthodes classiques de comparaison des moyennes aux différentes doses, telles que l'ANOVA à un facteur, le test de William's (Williams, 1971) ou la méthode ORIOGEN (Peddada et al., 2003). Ces méthodes ne peuvent pas être appliquées sans réplicats, et sont très peu efficaces lorsque le nombre de réplicats est faible (par exemple  $< 5$ ). Comme alternative, DRomics implémente des méthodes basées sur l'ajustement de modèles linéaires ou quadratiques aux données (en approximation des tendances observées) en utilisant les rangs des doses testées comme variable explicative. Cette transformation des doses par leur rang permet une description robuste de la répartition des doses le long du gradient testé, souvent régulière sur une échelle log (par exemple, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 etc.). Ces deux méthodes originales implémentées dans DRomics sont inspirées des tests de tendance proposés par Tukey et al. (1985) et ne nécessitent pas de réplicats. Pour contrôler le taux de fausses découvertes (*False Discovery Rate*, FDR), DRomics impose l'utilisation d'une correction, selon un ajustement de Benjamini-Hochberg. Enfin, nous avons décidé de ne pas appliquer de filtre sur le *fold change* des items (facteur multiplicatif de réponse par rapport au témoin), de manière à garder les signaux faibles s'ils sont significativement régulés. DRomics propose par défaut l'utilisation de tests de tendance quadratique qui permet de détecter à la fois les réponses monotones (croissante ou décroissante) et biphasiques (en forme de cloche ou de U), et qui est beaucoup plus efficace que la classique ANOVA lorsque le nombre de réplicats est faible (Larras et al., 2018).

## Modélisation dose-réponse

Pour la description des relations dose-réponse des items sélectionnés, les outils développés dans le domaine de la toxicologie (Tableau 8) n'utilisent que des modèles monotones (cas de BBMD) ou que les modèles préconisés par le US NTP (NTP, 2018, cas de BMDEExpress, FastBMD et BMDx). Parmi les modèles du NTP, seuls des modèles polynomiaux peuvent décrire des relations non-monotones qui sont pourtant communément rencontrées dans les données omiques (Smetanova et al., 2015, Larras et al., 2018). Les modèles polynomiaux de degré 3 et 4, tels que proposés dans BMDEExpress et FastBMD ne sont plus

recommandés par le NTP dès lors qu'ils ne peuvent pas être contraints à un seul changement de direction (NTP, 2018). Donc les réponses biphasiques ne peuvent être décrites que par des paraboles, ce qui n'offre pas une grande flexibilité.

Dans le domaine de l'écotoxicologie, des modèles biphasiques plus flexibles ont été utilisés, basés sur la cloche Gaussienne (Gündel et al., 2012, Smetanova et al., 2015). Comme un de nos objectifs, en développant DRomics, était d'être capable de sélectionner, modéliser et caractériser tout type de relation dose-réponse monotones et biphasiques, nous avons développé notre propre famille de modèles, incluant des modèles biphasiques flexibles, appelés Gauss-probit et logGauss-probit (Figure 22) (voir [la vignette du package](#) pour plus de détails).

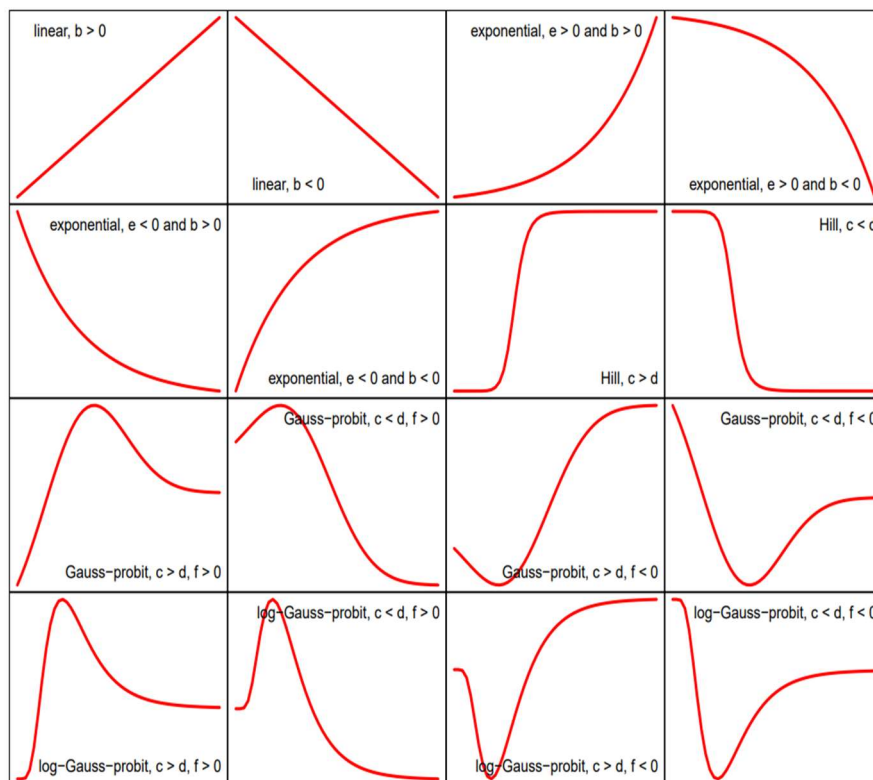


Figure 22 - Représentation graphique de la famille de modèles implémentée dans DRomics.

Les résultats de BMDExpress et de DRomics ont été comparés dans le cas d'étude d'un jeu de données transcriptomiques (matériel supplémentaire de Larras et al. (2018)). Les modèles ajustés par DRomics se sont avérés fournir une meilleure description de données, démontrée par des valeurs d'AIC (Akaike Information Criterion) plus faibles, et des estimations de BMD plus robustes. Au contraire des autres outils, DRomics ne fournit pas seulement une BMD, mais aussi une caractérisation de la relation dose-réponse selon quatre classes (croissante, décroissante, en cloche, en U) qui pourrait être particulièrement intéressante quand l'analyse dose-réponse ne vise pas seulement à définir des seuils de sensibilité, mais aussi à donner un sens mécanistique aux études omiques réalisées en contexte d'évaluation du risque environnemental.



**DRomics-shiny**  
Main workflow

<b>Step 1.</b> Importation, check and normalization / transformation of data using <i>ad hoc</i> methods (DEseq2, limma...) depending on the type of data	<code>o &lt;- microarraydata(...) / RNAseqdata(...) / continuousomicdata(...) / continuousanchoringdata(...) and PCAdataplot(o)</code>	
<b>Step 2.</b> Selection of significantly responding items using quadratic or linear trend tests, or ANOVA	<code>s &lt;- itemselect(o)</code>	with <code>print()</code> and <code>plot()</code> corresponding functions
<b>Step 3.</b> Fit of dose-response curves and best fit model selection among 5 monotonic or biphasic models using an information criterion	<code>f &lt;- drcfit(s)</code>	
<b>Step 4.</b> Sensitivity value derivation (BMD) with bootstrap confidence interval	<code>r &lt;- bmdcalc(f) b &lt;- bmdboot(r)</code>	

Functional annotation (e.g. KEGG, GO terms) → pathways

Augmentation of DRomics output with the **pathway**, and the **experimental level** for multilevel comparison (e.g. multi-omics, different pre-exposure histories, etc.) → `e` : an R object corresponding to DRomics output (r or b) extended with annotation and optionally experimental level → Visualization of pathways and levels using colors or facets in summary and exploration plots

Summary plots: `sensitivityplot(e)` `trendplot(e)` Exploration plots: `bmdplot(e)` `bmdplotwithgradient(e)` `curvesplot(e)` `targetplot(chosen_items, f)`

A one level example with `sensitivityplot()`

A one level example with `trendplot()`

A one level example with `targetplot()`

A multilevel example with `bmdplot()`

**DRomicsInterpreter-shiny**  
to help biological interpretation

Figure 23 - Schéma des fonctionnalités de DRomics et du périmètre des applications web associées. Le gras indique les nouvelles fonctions ajoutées au package R DRomics depuis sa première version.



### 5.2.3 Fonctionnalités nouvellement implémentées dans DRomics

La Figure 23 schématise le *workflow* DRomics et les fonctionnalités offertes pour explorer les résultats. Au départ développé pour des données de puces à ADN (signal de type intensité de fluorescence), DRomics est maintenant capable de traiter des données RNAseq (signal de type comptes de copies de gènes), en incluant une étape de normalisation spécifique à ces données (Love et al., 2014). Il permet également la modélisation de données métabolomiques (signal de type aire sous la courbe), ou toutes autres données omiques dont le signal est de nature continue et de distribution Gaussienne (après log-transformation). Enfin, DRomics permet désormais de traiter des données continues non-omiques, à des fins d'« ancrage phénotypique », c'est-à-dire pour comparer les courbes doses-réponses obtenues au niveau moléculaire à celles produites en s'intéressant à des paramètres apicaux (photosynthèse, croissance, etc.). Le même *workflow* a été décliné pour chaque type de données pour assurer la comparabilité des résultats, par exemple entre le niveau transcriptomique et le niveau métabolomique, entre le niveau transcriptomique et le niveau apical, etc. Programmer en langage R permet une interopérabilité avec les fonctions de la suite Bioconductor, qui rassemble les méthodes les plus en pointe en bioinformatique. Ainsi, DRomics repose sur les packages limma (pour les puces à ADN) et DEseq2 (pour les RNAseq) pour les premières étapes de normalisation et de sélection.

Depuis la première version de DRomics, de nombreuses fonctions ont été rajoutées au package pour répondre aux besoins des utilisateurs, elles sont mises en évidence en gras sur la Figure 23. Parmi elles, on peut citer PCAplotdata() qui permet une visualisation des données par analyse en composantes principales, targetplot() pour la visualisation d'items ciblés, qu'ils soient sélectionnés ou non par le *workflow* DRomics, ou encore bmdboot() et bmdplot() pour calculer par bootstrap et représenter les intervalles de confiance autour des valeurs de BMD. Enfin, des modifications ont été apportées pour renforcer la robustesse des résultats produits : par exemple, les modèles les moins parcimonieux ( $> 4$  paramètres) ne sont pas accessibles si le plan expérimental est limité ( $< 6$  doses).

### 5.2.4 Nouvelles fonctionnalités et nouvelle application Shiny pour l'aide à l'interprétation biologique des résultats

En toxicologie, lorsque l'on travaille sur des organismes modèles, bien séquencés et bien annotés, les items (par exemple les transcrits de gènes) peuvent être facilement annotés fonctionnellement. BMDExpress intègre cette étape d'annotation pour six espèces modèles (humain, rat, souris, etc.) et FastBMD pour quatorze espèces modèles, d'après les bases GeneID, GO, Reactome ou KEGG (voir Tableau 8). Une telle annotation fonctionnelle des items, qu'ils soient régulés ou non le long du gradient de doses d'exposition, permet une analyse d'enrichissement (Wu et al., 2021). Elle consiste en la mise en évidence des voies fonctionnelles qui sont les plus sur-représentées parmi les items sélectionnés (c'est-à-dire ceux régulés le long du gradient).

En écotoxicologie, les bioessais s'effectuent souvent sur des espèces non-modèles, ou même sur des communautés (i.e assemblages d'espèces) pouvant être complexes. Cela implique pour le chercheur de récupérer par lui-même des annotations fonctionnelles pour les items, en cherchant des similitudes avec des séquences connues et annotées chez des espèces modèles, ce qui peut être particulièrement ardu, notamment si le nombre d'items à annoter est énorme (par exemple, jusqu'à plusieurs millions en RNAseq). Nous avons



donc considéré que cette étape d'annotation fonctionnelle ne peut raisonnablement être réalisée que sur les items sélectionnés (de l'ordre de quelques milliers). Du fait de la grande diversité de *pipelines* (chaîne de procédures ou logiciels exécutés en série) d'annotation qui peuvent être envisagés selon les taxons, nous n'avons pas inclus cette étape dans DRomics. Cependant, pour aider à l'interprétation des résultats de DRomics, nous avons développé de nouvelles fonctions et une nouvelle application shiny, baptisée DRomicsInterpreter-shiny et accessible à l'adresse <https://lbbe-shiny.univ-lyon1.fr/DRomics/inst/DRomicsInterpreter-shiny/>.

Après avoir augmenté les sorties de DRomics avec l'information sur le rôle fonctionnel de chaque item (i.e. voie(s)/processus biologique(s) dans lequel il est impliqué), les représentations graphiques offertes par DRomics apportent un nouvel éclairage aux résultats. Plusieurs fonctions sont proposées pour visualiser, résumer ou comparer les réponses des différentes voies définies par l'annotation fonctionnelle :

- La répartition des tendances de réponses au sein de chaque voie, caractérisées par la forme des courbes dose-réponse le long du gradient d'exposition (croissante, décroissante, en cloche, en U) (fonction `trendplot()`, voir un exemple en Figure 23).
- La sensibilité de chaque voie, calculée comme un quantile des valeurs de BMD au sein de la voie (fonction `sensitivityplot()`, voir un exemple en Figure 23).
- Pour des voies ciblées, toutes les valeurs de BMD obtenues et leur intervalle de confiance (fonction `bmdplot()`, voir un exemple en Figure 23).
- Pour des voies ciblées, toutes les valeurs de BMD obtenues et les modèles dose-réponse correspondants, le signal étant codé par un gradient de couleur (fonction `bmdplotwithgradient()`).
- Pour des voies ciblées, toutes les courbes dose-réponse obtenues (fonction `curvesplot()`).

De plus, à condition qu'une même ontologie d'annotation soit utilisée aux différents niveaux moléculaires étudiés, DRomics peut être utilisé pour comparer les réponses observées entre différents niveaux. Nous en verrons un exemple dans le prochain sous-chapitre (Partie 5.3), avec la réponse transcriptomique et métabolomique de la microalgue *Scenedesmus vacuolatus* exposée au biocide triclosan (Larras et al., 2020).

Ces fonctions graphiques peuvent également être utilisées pour comparer des réponses mesurées dans différentes conditions environnementales (différents temps d'exposition, différentes températures, etc.). Cela sera illustré dans la Partie 5.4, avec la réponse transcriptomique au diuron de biofilms aquatiques pré-exposés ou non (en conditions contrôlées) à cet herbicide (Larras et al., in prep.).

## 5.3 Réponse fonctionnelle de la microalgue *Scenedesmus vacuolatus* exposée au triclosan

### 5.3.1 Introduction

Les récents progrès des techniques omiques, telles que la génomique, la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique ont ouvert de nouvelles perspectives dans le domaine de l'écotoxicologie. Les réponses omiques permettent d'appréhender la propagation des effets entre différentes échelles moléculaires, ainsi que la recherche de mode(s) d'action des contaminants, ou de mécanismes de défense mis en place. Le niveau moléculaire permet d'obtenir une évaluation des effets en début de la chaîne de réactions induites par un stresser, comme illustré par le concept d'*Adverse-Outcome-Pathway* (AOP, Brockmeier et al., 2017) qui vise à prédire des effets apicaux à partir des événements moléculaires (Ankley et al., 2010). Plusieurs études ont mis en évidence le bénéfice d'approches omiques en écotoxicologie (Beale et al., 2016, Wang et al., 2018, Zhang et al., 2018). Plus spécifiquement, des auteurs ont démontré l'adéquation des techniques omiques pour découvrir des biomarqueurs de réponse à un herbicide (Pesce et al., 2013, Moisset et al., 2014), comprendre les mécanismes d'interaction entre contaminants et organismes (Pillai et al., 2014, Schüttler et al., 2017) et évaluer la réponse métabolique de micro- ou macrophytes (Beauvais-Flück et al., 2016, Dranguet et al., 2017) ou de communautés microbiennes (Beale et al., 2017) face à différents stressers.

Combiner des observations à différents niveaux omiques fournit une vision plus intégrative de la réponse des organismes, en appui à la compréhension mécanistique des effets des contaminants sur le biote. En effet, le transcriptome et le métabolome ne réagissent pas simultanément (Pillai et al., 2014) et une corrélation des réponses à ces deux niveaux relève davantage de l'exception que de la règle (Haider et Pal, 2013). Cependant, la mise en lien de telles réponses est complexe, à cause de la nature des données : différentes entités sont mesurées, exprimées avec différentes unités et provenant de différents appareils de mesure et possiblement de différents plans expérimentaux. Les données acquises à différents niveaux sont le plus souvent analysées en parallèle, par des *heatmaps* (cartes de couleur reflétant l'ampleur de la réponse – *fold change*) ou des analyses multivariées (Liu et al., 2022, Yu et al., 2022).

Le but de cette étude était d'illustrer la valeur ajoutée d'une approche multi-échelle dans un cadre dose-réponse pour une compréhension mécanistique des effets de contaminants. En détail, nous souhaitons répondre aux questions suivantes :

- (i) Comment comparer quantitativement des données multi-omiques et phénotypiques ?
- (ii) Une telle approche aide-t-elle à l'analyse du mode d'action d'un contaminant modèle chez un organisme non-cible ?
- (iii) Permet-elle une meilleure intégration des données multi-omiques en évaluation du risque ?

Pour cela, notre étude a porté sur les effets du triclosan sur le transcriptome, le métabolome et les réponses apicales de la microalgue *Scenedesmus vacuolatus*. Le triclosan, un biocide entrant dans la composition de produits de soin personnel, est caractérisé par un mode d'action spécifique chez les bactéries, perturbant la biosynthèse des lipides en inhibant l'enzyme énoyl-ACP réductase. Du fait de son mode d'action, ce produit chimique peut potentiellement perturber une large gamme d'organismes non-cibles, telles que les microalgues

(Erikson et al., 2015, Pinckney et al., 2017). Jusqu'à présent, le mode d'action chez les chlorophycées reste peu clair et le triclosan constitue un danger pour les algues dans les milieux aquatiques (Busch et al., 2016). Peu d'études ont investigué les effets du triclosan chez les microalgues au niveau moléculaire (Pan et al., 2018), l'estimation de seuils protecteurs repose uniquement sur des paramètres apicaux (Capdevielle et al., 2008, Van der Ohe et al., 2011).

### 5.3.2 Matériel et méthodes

#### Expérimentations et analyse des échantillons

Je n'ai participé ni à la conception des expérimentations, ni à leur réalisation, ni à l'analyse des échantillons, qui sont à mettre au crédit de Mechthild Schmitt-Janssen (UFZ Leipzig) et son équipe. Je ne les présenterai ici que très brièvement. Tous les détails sont décrits dans Larras et al. (2020).

Les algues, provenant de cultures de l'UFZ, ont été exposées, en plus de la condition témoin, à cinq concentrations de 0.69 à 6.63 µg/L pour l'étude du transcriptome et à six concentrations de 0.69 à 7.76 µg/L pour l'étude du métabolome. Dans les deux cas, l'exposition a duré 14 heures en pleine lumière. Pour le transcriptome, chaque concentration a été répliquée cinq fois. Pour le métabolome, la condition témoin a été répliquée six fois, et les autres concentrations trois fois. Les réponses apicales (photosynthèse et croissance) ont été évaluées le long d'un gradient de neuf concentrations de 0.1 à 70.7 µg/L, avec deux à six réplicats par concentration.

Pour le métabolome, les échantillons ont été analysés par GC-MS. Des valeurs d'aires sous la courbe (*Area Under the Curve* ou AuC) ont été obtenues pour 224 métabolites. Ensuite, nous avons appliqué la procédure suivante : (i) élimination des métabolites pour lesquels la proportion de données manquantes (non-détections) parmi tous les échantillons est supérieure à 50% (ii) pour chaque métabolite restant, substitution des données manquantes par la méthode du *half minimum* (c'est-à-dire remplacement par la moitié de la valeur minimum trouvée parmi tous les échantillons) et (iii) log10-transformation des valeurs d'AuC.

Après extraction de l'ARN, le transcriptome a été mesuré par puces à ADN spécifiquement conçues pour *S. vacuolatus*, contenant 61535 probes représentant 21495 contigs. Les données de fluorescence ont été déposées sur le site du NCBI sous le numéro d'accès GSE122159 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE122159>). Les données brutes ont été log2-transformées avant analyse statistique ultérieure.

La croissance des algues a été estimée au moyen d'un compteur de particules, et l'activité photosynthétique a été mesurée *via* la fluorescence *in vivo* de la chlorophylle a (rendement quantique maximum) au moyen d'un fluorimètre PAM (*Pulse Amplitude Modulation*).

#### Traitement des données

DRomics version 2.0-1 a été utilisé pour 1) identifier les items du transcriptome (ici les probes) et du métabolome (ici les métabolites) régulés le long du gradient d'exposition 2) modéliser leur courbe dose-réponse et caractériser leur tendance (croissante, décroissante, en U, en cloche) et 3) calculer un seuil de sensibilité.

L'étape de sélection des items significativement régulés a reposé sur un test de tendance quadratique, en limitant le FDR à 0.01 pour le transcriptome et 0.1 pour le métabolome. Pour chaque item sélectionné, le meilleur modèle a été identifié selon le critère d'AIC (Akaike Information Criterion) qui était le seul implémenté dans cette version de DRomics. Pour chaque item dont la dose-réponse a pu être modélisée, la  $BMD_{1SD}$  a été calculée (différence au témoin limitée à une fois l'écart type résiduel du modèle), ainsi que son intervalle de confiance.

Dans certains cas, les puces à ADN comprenaient plusieurs fois la même probe (jusqu'à deux fois) mais aussi deux probes différentes correspondant à un même contig. Pour chaque contig, nous disposons donc de résultats pour 1 à 4 probes. Pour la suite de l'analyse, une seule probe par contig a été conservée, celle présentant l'intervalle de confiance le plus étroit autour de l'estimation de la BMD. Au total, les sorties de DRomics sont disponibles pour 3177 contigs et 68 métabolites significativement régulés.

Pour la photosynthèse et la croissance, une courbe dose-réponse a été construite et une  $BMD_{1SD}$  a été calculée selon la même méthodologie que dans DRomics (DRomics ne permettait pas encore de traiter les données apicales dans la version utilisée).

### Analyse fonctionnelle

Les séquences des 3177 contigs ont été *blastées* (des similarités sont recherchées) vs la NCBI nr database (taxa investigated: chlorophytes, cyanobacteria, diatoms and Arabidopsis; e-value=0.001) au moyen de l'outil DIAMOND (Buchfink et al., 2014). Un code NCBI a ainsi été obtenu pour 1612 contigs. A partir de ces codes, un numéro KEGG (Kanehisa et al, 2019) d'enzyme a pu être récupéré pour 507 contigs *via* l'outil UNIPROT (Uniprot Consortium, 2017), mais les voies biologiques KEGG n'étaient potentiellement associées aux microalgues que pour 443 contigs.

L'annotation des métabolites a été effectuée à la main en confrontation à la base de données KEGG et 31 métabolites ont été annotés. Deux niveaux d'annotation KEGG sont considérés : les *pathway classes* (e.g. métabolisme des lipides) que j'appellerai ici les voies et les *pathway levels* qui représentent toutes les sous-voies appartenant à une *pathway class* (e.g. métabolisme des acides gras, métabolisme de l'énergie).

La Figure 24 résume le *workflow* d'analyse et d'annotation des données.

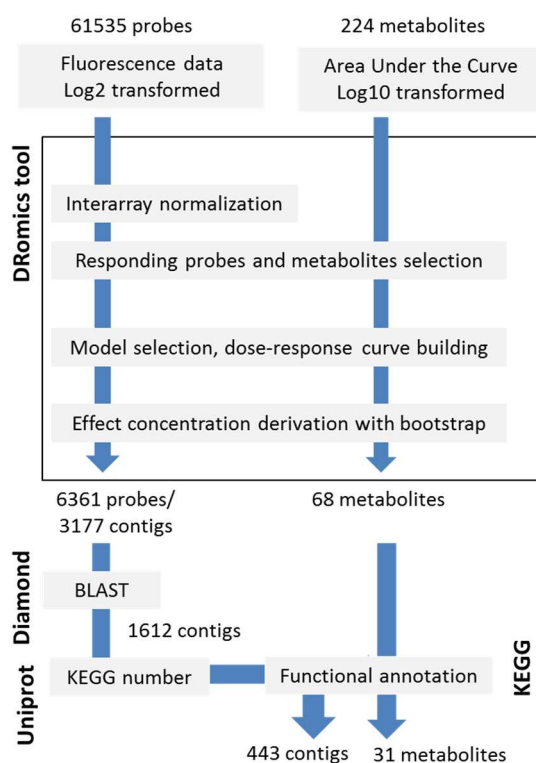


Figure 24 - Vue d'ensemble du workflow d'analyse des données et d'annotation. Les nombres correspondent aux effectifs de contigs et métabolites restants après chaque étape.

### 5.3.3 Résultats

#### Caractérisation des réponses transcriptomiques, métabolomiques et apicales

Parmi les 3177 contigs et 68 métabolites identifiés par DRomics comme régulés le long du gradient d'exposition au triclosan, les tendances de réponses ont été classées en croissante, décroissante, en forme de U ou en forme de cloche (Tableau 9). Pour le métabolome, la majorité des items (54%) suivent une tendance décroissante, tandis que pour le transcriptome les tendances décroissantes sont les plus fréquentes. Les réponses non-monotones totalisent 38% au niveau transcriptome, 33% au niveau métabolome. Au niveau apical, la croissance et la photosynthèse sont inhibées selon une forme sigmoïde classique.

Tableau 9 - Tendances des courbes dose-réponse pour les 3177 contigs et 68 métabolites régulés.

Tendance	Métabolites	Contigs
Croissante	9 (13 %)	1092 (34%)
Décroissante	37 (54 %)	878 (28 %)
Cloche	12 (18 %)	546 (17 %)
U	10 (15 %)	661 (21 %)

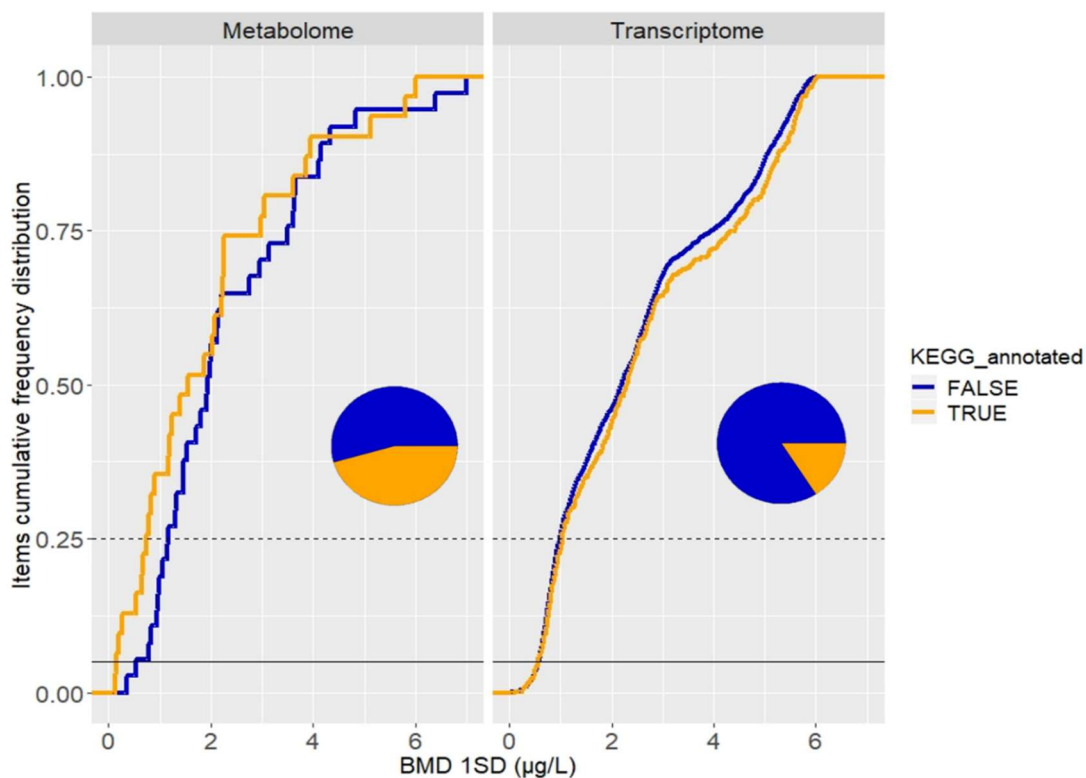


Figure 25 - Distribution cumulée des valeurs de BMD du métabolome et le transcriptome, pour les items annotés (en orange) et non-annotés (en bleu). Les camemberts représentent les proportions d'items annotés et non-annotés parmi ceux identifiés comme significativement régulés lors de l'exposition au triclosan.

Pour chaque niveau moléculaire, la distribution cumulée des valeurs de sensibilité (BMD) a été comparée entre items annotés et non-annotés (Figure 25). Une grande partie des contigs et métabolites n'a pas pu être annotée (86 % et 55 %), néanmoins les distributions des valeurs de BMD sont similaires entre items annotés ou non. Les contigs ont des BMD allant de 0.02 à 7 µg/L, les métabolites de 0.11 à 7 µg/L. La BMD calculée pour la croissance est 11.8 µg/L, pour la photosynthèse 28.6 µg/L.

## Réponse des voies métaboliques

Les résultats présentés ci-après reposent exclusivement sur les 443 contigs et 31 métabolites qui ont pu être annotés selon la classification KEGG.

La Figure 26 montre les nombres totaux de métabolites et de contigs associés à chaque voie. Considérant les deux niveaux moléculaires, 18 voies ont été perturbées par le triclosan après 14 heures d'exposition. Huit voies liées à des activités de métabolisme (e.g. *carbohydrate metabolism*, *amino acid metabolism*, *lipid metabolism* et *energy metabolism*) sont perturbées aux deux niveaux moléculaires. Au total, 118 sous-voies sont affectées.

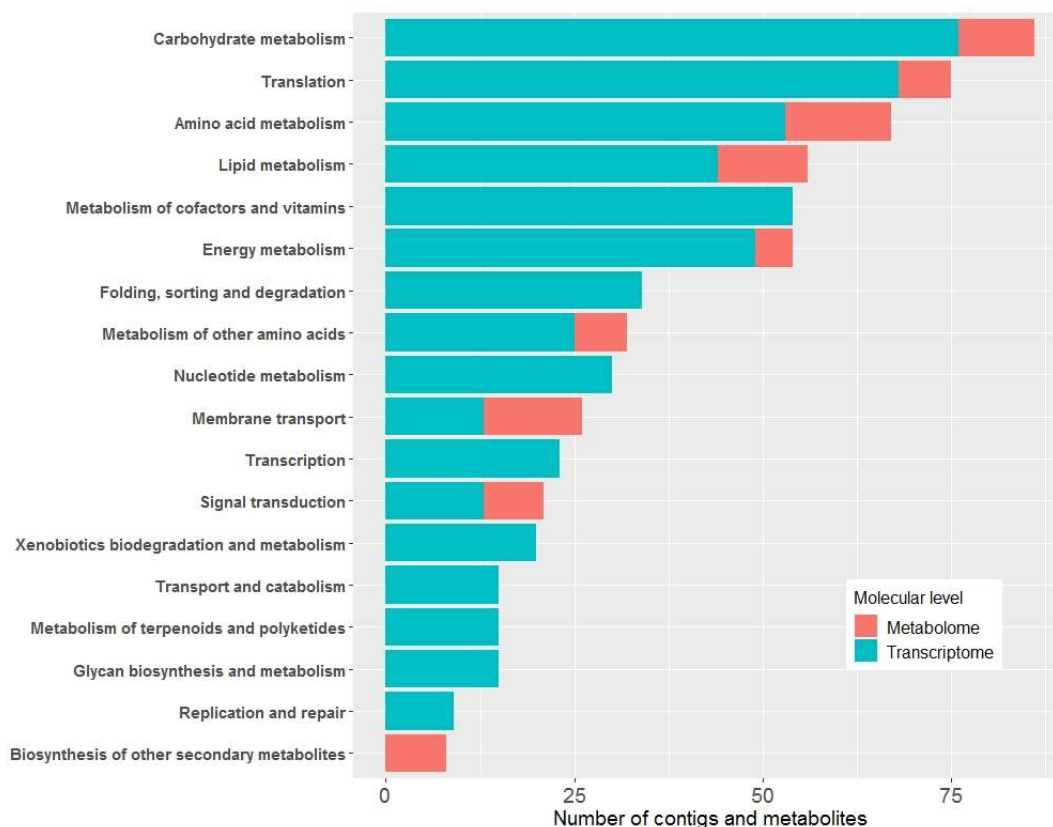


Figure 26 - Nombre de contigs et de métabolites par pathway class KEGG.

Pour chacune des 18 voies, des *pathway sensitivity distribution* (PSD) ont été établies synthétisant la réponse de tous les items (contigs ou métabolites) impliqués dans chaque voie. La Figure 27 montre en exemple les résultats pour la voie du métabolisme des lipides. Sont représentées : les valeurs de BMD (par ordre croissant), mais également les tendances de réponse (*via* la forme du point) et l'intensité du signal, rendue par un gradient de couleur (le vert indique une sous-expression par rapport au témoin, le rouge une sur-expression).

De manière générale, les voies ne peuvent pas être liées à une unique tendance de réponse, une grande variabilité, à chaque niveau moléculaire, étant parfois observée au sein d'une même voie. Cependant, certaines concordances ressortent. Par exemple, les métabolites impliqués dans le métabolisme des lipides montrent une dominance de tendances décroissantes (75 %).

Si l'on regarde l'intensité du signal, globalement le transcriptome a subi une plus forte variation que le métabolome. Par exemple, sur la Figure 27, l'inhibition maximale observée (vert le plus foncé) de l'expression du métabolome et du transcriptome en termes de *fold change* sont similaires ( $10^{-0.8} = 0.16$  et  $2^{-2.5} = 0.18$ ). En revanche, la sur-expression maximale observée (rouge le plus foncé) est beaucoup plus importante pour le transcriptome que pour le métabolome ( $10^{0.8} = 6.3$  et  $2^{7.5} = 181$ ), mais cela ne concerne que quelques contigs.

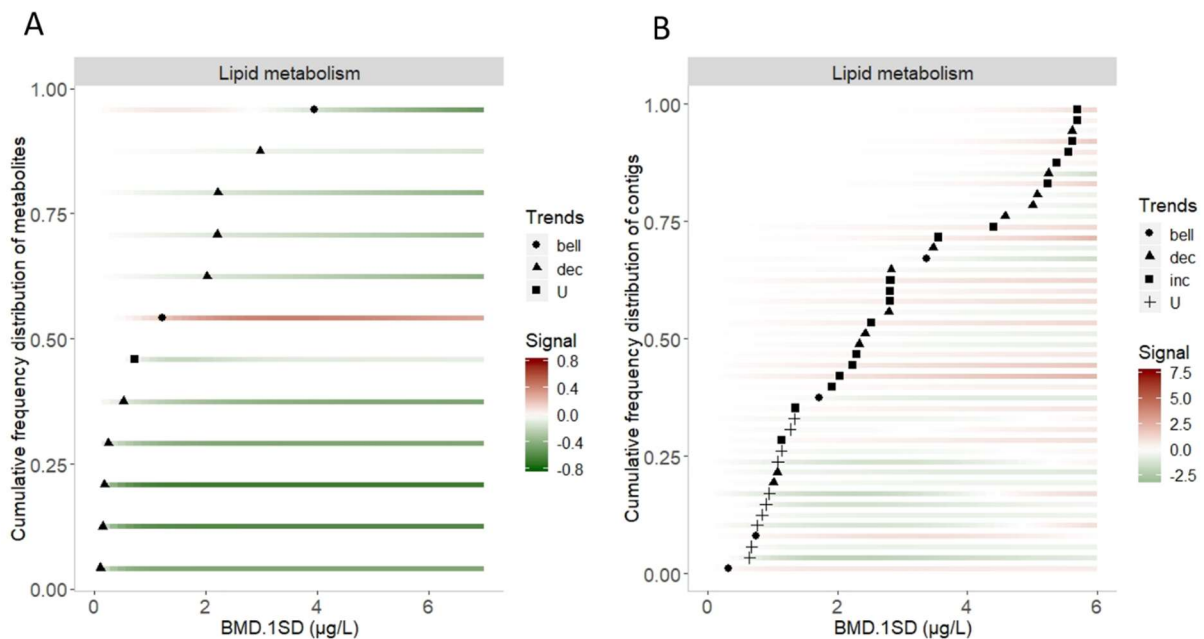


Figure 27 - Distribution cumulée de sensibilité (A) des métabolites et (B) des contigs impliqués dans le métabolisme des lipides, sur la base des  $BMD_{1SD}$ . La tendance de réponse des items est représentée par la forme des points, l'intensité du signal de réponse le long du gradient de concentration est représentée par un code couleur, de vert pour l'inhibition à rouge pour la surexpression.

Afin de comparer la sensibilité des voies affectées, nous avons calculé le 25<sup>ème</sup> percentile de la distribution spécifique à chaque voie (*PSD*). Cette méthode fait écho à la philosophie de la *Hazardous Concentration* (HC), dérivée des SSD, qui n'affecte théoriquement qu'une faible proportion des espèces. Le 25<sup>ème</sup> percentile représente un compromis entre le classique 5<sup>ème</sup> percentile utilisé en évaluation du risque et les limitations statistiques dues à un trop faible nombre d'items dans certaines voies pour dériver des valeurs de 5<sup>ème</sup> percentile robustes. Les seuils de sensibilités ainsi calculés s'étendent, selon les voies (Figure 28), de 0.72 à 1.99 µg/L pour le transcriptome et de 0.23 à 1.39 µg/L pour le métabolome. La voie la plus sensible est le métabolisme des lipides. C'est également la voie pour laquelle apparaît le plus fort contraste entre la sensibilité du métabolome (0.23 µg/L) et celle du transcriptome (1.61 µg/L). Les métabolites les plus sensibles sont principalement associés aux sous-voies *biosynthesis of unsaturated fatty acids*, *alpha-linoleic acid metabolism* et *linoleic and glycerophospholipid metabolism*. Plusieurs voies reliées à la détoxification sont régulées au niveau du transcriptome (e.g. *xenobiotic biodegradation*). Des contigs associés à des protéines connues pour être impliquées dans des processus de détoxification et plus spécifiquement dans des



mécanismes de défense face au stress oxydatif (*ascorbate peroxidase*, *catalase*, *thioredoxin*, *Glutathione S-transferase*) montrent des tendances de réponse croissantes le long du gradient d'exposition.

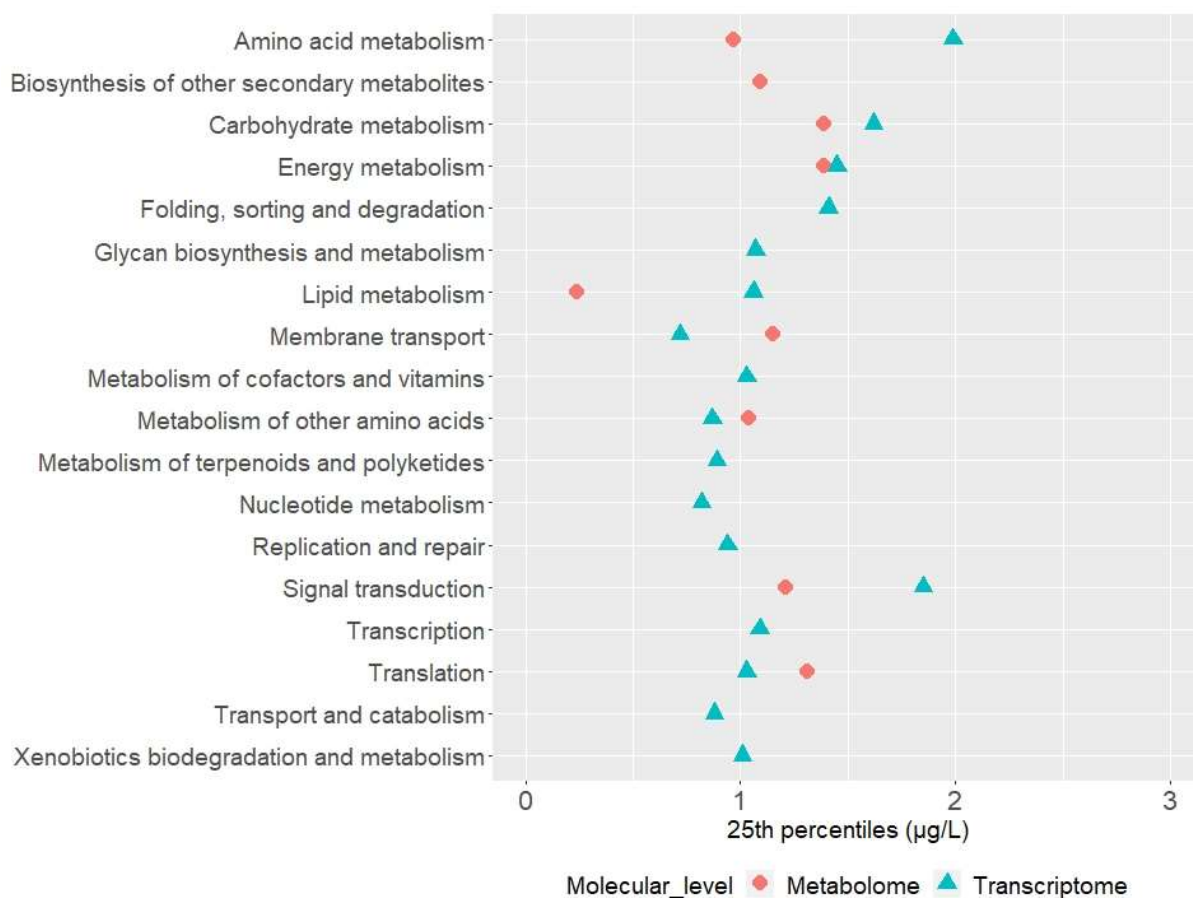


Figure 28 – Sensibilité des voies (pathway classes selon la classification KEGG) sur la base du 25<sup>ème</sup> percentile des valeurs de BMD des contigs (triangles bleus) et des métabolites (cercles rouges) impliqués.

Je ne souhaite pas alourdir ce document des dizaines de figures qu'il est possible de produire en déclinant les résultats voie par voie, d'autant que je suis incapable de les interpréter biologiquement. Je ne vais reprendre, dans la discussion, que les points principaux mis en avant par mes collègues biologistes.

### 5.3.4 Discussion

#### Valeur ajoutée de l'approche dose-réponse et du workflow DRomics

La mesure de réponses omiques dans un plan d'expérience de type dose-réponse, et leur analyse par un outil adapté, apportent beaucoup plus d'information qu'une simple comparaison témoin vs exposé. Les courbes dose-réponse construites pour chaque item régulé peuvent être visualisées sous différentes formes. La Figure 27 propose une version reposant sur un gradient de couleur, cher aux biologistes amateurs de *heatmap*. Elle peut être considérée comme une *heatmap* dont l'axe juxtaposant les conditions est défini de manière

continue (gradient d'exposition). Mais d'autres utilisateurs préféreront regarder les courbes dose-réponse elles-mêmes, que l'on peut facilement tracer avec DRomics.

L'approche dose-réponse permet d'estimer des BMD, mais également de caractériser des réponses non-monotones, observées dans ce cas d'étude mais également par d'autres auteurs (Gündel et al., 2012, Smetanova et al., 2015, Wang et al., 2018). Les courbes dose-réponse en forme de U pourraient être associées à l'adaptation du métabolisme à de fortes concentrations. A l'inverse, les formes en cloche montrent un point de disruption où le métabolisme ne peut plus faire face au stress. Cette prépondérance des courbes dose-réponse non-monotones montre une limite importante des comparaisons témoin *vs* exposé : selon la concentration d'exposition choisie, l'on aura une vision réduite, voire biaisée de la réponse.

Les réponses du transcriptome et du métabolome ont été analysées par un même *workflow*, les métriques fournies en sortie permettent donc de les comparer correctement. Après une étape d'importation et de normalisation qui s'adapte à la nature des données (et qui vise à rendre le signal gaussien), c'est la même méthode de sélection des items régulés qui est employée, c'est dans la même famille de modèles que le meilleur ajustement est recherché, c'est la même définition de la BMD qui est appliquée. DRomics apporte un langage commun aux différents niveaux omiques investigués, ainsi qu'aux mesures d'ancrage phénotypique.

#### Mode d'action du triclosan chez *S. vacuolatus*

Le triclosan est connu pour inhiber, chez les bactéries, l'activité du gène *FabI* qui code pour la dernière enzyme du cycle d'élongation des acides gras (McMurry et al., 1998). Ainsi, nous suspectons que le métabolisme des lipides chez *S. vacuolatus* pourrait être spécifiquement perturbé. Cette hypothèse est soutenue par la sensibilité de cette voie au niveau du métabolome. De plus, l'approche dose-réponse montre que la plupart des métabolites associés au métabolisme des lipides présentent une tendance de réponse monotone décroissante. Parmi les voies biochimiques, cette tendance n'est retrouvée que pour le métabolisme des lipides, indiquant que les sous-voies (e.g. *biosynthesis of unsaturated fatty acids*, *alpha-linolenic metabolism*) ne pourraient être compensées par d'autres voies. Les contigs les plus sensibles liés à la voie du métabolisme des lipides sont moins sensibles que le métabolome, suggérant une régulation aux fortes concentrations.

Les effets de produits toxiques peuvent avoir pour résultat différentes sensibilités des niveaux omiques et des voies biologiques, selon le mode d'action et la cible primaire. Cela renforce l'intérêt d'approches multi-omiques pour une vision intégrée de la réponse au contaminant, y compris chez les espèces non-modèles. Des conclusions ont pu être tirées malgré le faible taux d'annotation des items dans notre cas. La comparaison des distributions des BMD des items annotés et non-annotés montre qu'ils sont également sensibles.

La plupart des études traitant de l'évaluation des effets du triclosan chez les microalgues sont basées sur des réponses apicales (e.g. croissance, photosynthèse). Néanmoins, il est difficile de les comparer aux résultats apicaux de cette étude, car l'exposition n'avait pas la même durée, le matériel biologique n'était pas dans la même phase de croissance, et les métriques de sensibilité reportées ne sont pas les mêmes (EC<sub>50</sub> ou NOEC, et non BMD). Certains auteurs ont estimé, après application de facteurs de sécurité, des PNEC pour le triclosan (*Predicted No Effect Concentrations*) allant de 1.4 ng/L à 1.6 µg/L (Capdevielle et al., 2008, von der Ohe et al., 2012). Les plus faibles BMD observées dans notre étude sont dans cet intervalle.

## 5.4 Réponse de biofilms aquatiques au diuron et tolérance induite par une pré-exposition

### 5.4.1 Introduction

Un important principe en écologie du stress est le besoin de s'adapter aux changements environnementaux pour survivre. Les organismes sont dotés de mécanismes de régulation interne pour faire face au stress. A partir d'un certain niveau de pression d'un stress, des processus d'adaptation sont activés. Si la capacité d'adaptation est épuisée, des dommages sévères tels que l'extinction d'espèces et la perte de biodiversité peuvent s'en suivre. Dans des communautés naturelles, d'autres espèces dotées de plus fortes capacités pourront envahir le milieu, et un processus de succession induite par le stress pourra commencer, menant à une communauté plus tolérante. En écotoxicologie des communautés, ces processus sont la base du concept de *pollution-induced community tolerance* (PICT, e.g., Blanck et Wängberg, 1988, Blanck, 2002, Tlili et al., 2016).

Plusieurs études ont relié la tolérance des communautés à des changements dans leur composition en espèces. Ici, l'idée était d'explorer les mécanismes moléculaires de l'adaptation au stress à l'échelle de la communauté. Le but de cette étude était de comprendre les réponses transcriptomiques au stress chez des communautés microbiennes différant de par leur histoire d'exposition. Le modèle biologique utilisé est une communauté microbienne aquatique, plus précisément un biofilm naturel de rivière. Le modèle de contaminant est le diuron, un herbicide inhibiteur de la photosynthèse. Le long d'un gradient de huit concentrations d'exposition, nous avons analysé les réponses du méta-transcriptome dans deux situations expérimentales : chez une communauté de référence et chez une communauté pré-exposée de manière chronique au diuron.

Nous avons évalué les hypothèses suivantes :

- Les communautés exposées chroniquement voient leur méta-transcriptome restructuré pour s'adapter aux conditions de stress.
- La méta-transcriptomique non ciblée par RNAseq, combinée avec la modélisation dose-réponse, permet d'identifier les voies biologiques sensibles à une exposition aiguë.
- La comparaison des profils d'expression de gènes des deux communautés permet d'éclairer les mécanismes moléculaires d'adaptation au stress et d'induction de tolérance.

### 5.4.2 Matériel et méthodes

#### Expérimentations

J'ai participé à la conception du design expérimental des expérimentations, mais pas à leur réalisation ni à l'analyse des échantillons, qui sont à mettre au crédit de Floriane Larras, Mechthild Schmitt-Janssen et leurs collègues de l'UFZ (Leipzig). Je ne présenterai les expérimentations que très brièvement. Tous les détails sont décrits dans Larras et al. (in prep.), et son matériel supplémentaire.

Les expérimentations ont été organisées en deux étapes : une exposition (ou non-exposition) chronique de cinq semaines, suivi d'une exposition consécutive aigue d'une heure. Des communautés microbiennes aquatiques ont été prélevées dans une rivière voisine de l'UFZ (la Parthe). Au laboratoire, elles ont été incubées pendant cinq semaines sur des lames de verre positionnées dans des aquariums remplis d'eau de rivière, contaminés à hauteur de 4 µg/L de diuron ou non. A l'issue de cette étape d'exposition chronique, les communautés des deux conditions ont pu diverger : nous les appellerons la communauté « stressée » et la communauté « non-stressée ». Ensuite, les communautés ont été exposées pendant une heure à un gradient de huit concentrations en diuron (0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 et 100 µg/L). A la fin de cette étape d'exposition aigue, des échantillons ont été prélevés pour l'analyse du méta-transcriptome (deux répliquats par communauté et par concentration) et la mesure de la capacité photosynthétique (deux répliquats également).

#### Analyse des échantillons et traitement des données

L'activité photosynthétique des biofilms a été mesurée *via* la fluorescence *in vivo* de la chlorophylle a (rendement quantique maximum, Genty et al., 1989) au moyen d'un fluorimètre PAM (*Pulse Amplitude Modulation*). Les biofilms ont été acclimatés dans le noir pendant cinq minutes avant la mesure de fluorescence. La relation dose-réponse a été modélisée en utilisant le *workflow* pour données apicales de DRomics 2.4-0.

Après extraction de l'ARN, vérification de son intégrité, et préparation de bibliothèques ANR adéquates, le méta-transcriptome a été séquencé à l'UFZ. L'assemblage et le comptage des transcrits ont été effectués à l'aide de Trinity (Grabherr et al., 2011) version 2.9.1. Les données brutes de séquençage ont été déposées sur le site du NCBI sous le numéro d'accès GSE201034 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE201034>).

L'analyse dose-réponse du méta-transcriptome a été effectuée *via* le package R DRomics 2.4-0. Premièrement, les données ont été importées et les comptes de copies de contigs ont été normalisés selon la méthode « rlog » (*regularized logarithm*, Love et al., 2014). Deuxièmement, les contigs significativement régulés le long du gradient d'exposition ont été identifiés au moyen d'un test de tendance quadratique avec un FDR de 10%. Troisièmement, pour chaque contig ainsi sélectionné, le meilleur ajustement dose-réponse est déterminé sur la base de l'AIC. Enfin, la  $BMD_{1SD}$  est calculée pour chaque contig.

Les séquences de chaque contig ont été *blastées* (des similarités sont recherchées) versus la *NCBI nr database* au moyen de l'outil blastx. Les codes NCBI ainsi obtenus ont été importés dans Uniprot (UniProt Consortium, 2019), en utilisant la base de données « EMBL/GenBank/DDBJ CDS » de manière à obtenir des annotations de type *Gene Ontology* que l'on appelle des termes GO (Ashburner et al., 2000, Gene Ontology Consortium, 2020). Après vérification manuelle des annotations, les contigs associés à des organismes non pertinents vis-à-vis de ceux attendus dans des biofilms ont été supprimés.

### 5.4.3 Résultats

Les résultats sont systématiquement donnés pour la communauté non stressée puis pour la communauté stressée, respectivement.

### Exposition chronique

Les différences dans les méta-transcriptomes des communautés stressée et non stressée sont figurées par le nombre de contigs présents dans les échantillons témoins de l'exposition aigue, et la redondance entre eux. Les communautés non stressée et stressée expriment 974 274 et 881 160 contigs, avec 431 222 contigs communs.

### Exposition aigue

En comparaison à la communauté non-stressée, la communauté stressée a bien acquis de la tolérance au diuron au regard de sa capacité photosynthétique mesurée lors de l'exposition aigue consécutive. La  $BMD_{1SD}$  passe de 1.08 à 4.42  $\mu\text{g/L}$ .

Les comptes de copies de 3 502 153 contigs pour chaque communauté et pour chaque concentration d'exposition ont été analysés. DRomics a identifié 691 et 2804 contigs significativement impactés par l'exposition au diuron, dans les communautés non-stressée et stressée, dont seulement 43 contigs en commun. Des modèles dose-réponse ont pu être ajustés avec succès pour 559 et 2372 contigs. La répartition des tendances observées est significativement différente entre les communautés (test Chi2). La communauté non-stressée affiche principalement des tendances décroissantes, la stressée des tendances croissantes (Tableau 10).

*Tableau 10 - Pourcentage et nombre de contigs par tendance dose-réponse pour chaque communauté.*

<b>Tendance</b>	<b>Communauté non stressée</b>	<b>Communauté stressée</b>
<b>Croissante</b>	27 % (n=149)	71 % (n=1687)
<b>Décroissante</b>	43 % (n=242)	9% (n=220)
<b>En U</b>	15% (n=83)	11% (n=255)
<b>En cloche</b>	15 % (n=85)	9 % (n=210)

Parmi les 559 et 2372 contigs dont la réponse est modélisée, 216 et 343 ont pu être associés à au moins un terme GO, correspondant à 111 et 209 processus distincts. La plupart sont représentés par un ou deux contigs. Seuls les processus biologiques représentés par au moins quatre contigs sont considérés dans la suite des résultats, soient 28 et 27 termes GO régulés dans chaque communauté durant l'exposition aigue (Figure 29).

Les contigs régulés dans la communauté non-stressée sont impliqués principalement dans le métabolisme de base et les processus de provision d'énergie (Figure 29, gauche), et affichent principalement des tendances décroissantes. Les contigs régulés dans la communauté stressée sont impliqués principalement dans la transcription et la traduction, ainsi que dans la photosynthèse, et affichent principalement des tendances croissantes (Figure 29, droite). L'ensemble des courbes dose-réponse pour chaque terme GO peut-être facilement visualisé dans DRomics.

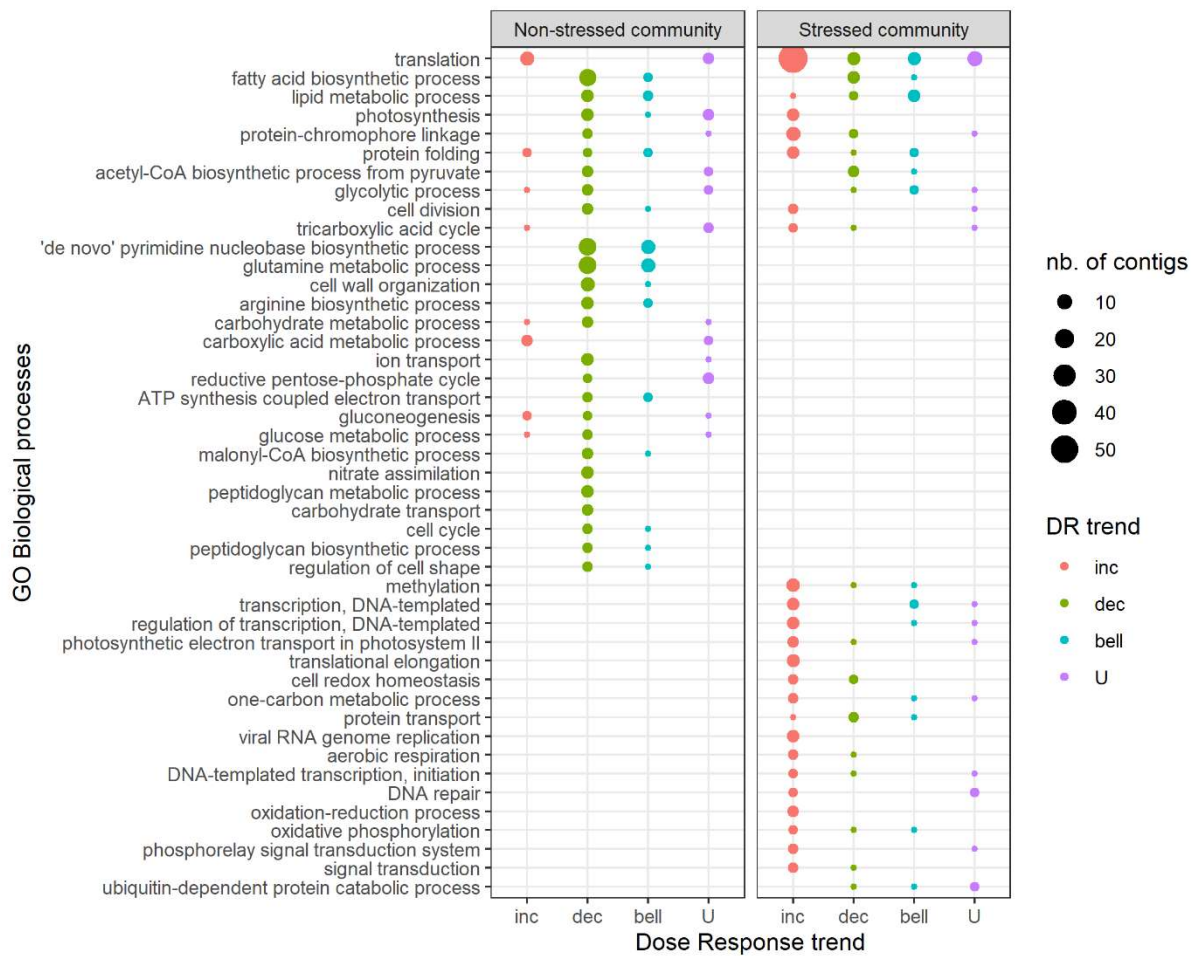


Figure 29 – Nombre de contigs régulés impliqués dans chaque processus biologique GO pour les communautés non-stressée et stressée. La couleur des cercles indique la tendance dose-réponse et la taille des cercles est proportionnelle au nombre de contigs impliqués. Les termes GO sont classés en trois catégories : régulés dans les deux communautés, régulés dans la communauté non-stressée seulement, régulés dans la communauté stressée seulement, et apparaissent dans cet ordre de haut en bas. Ce graphique a été produit par la fonction `trendplot()` du package `DRomics`.



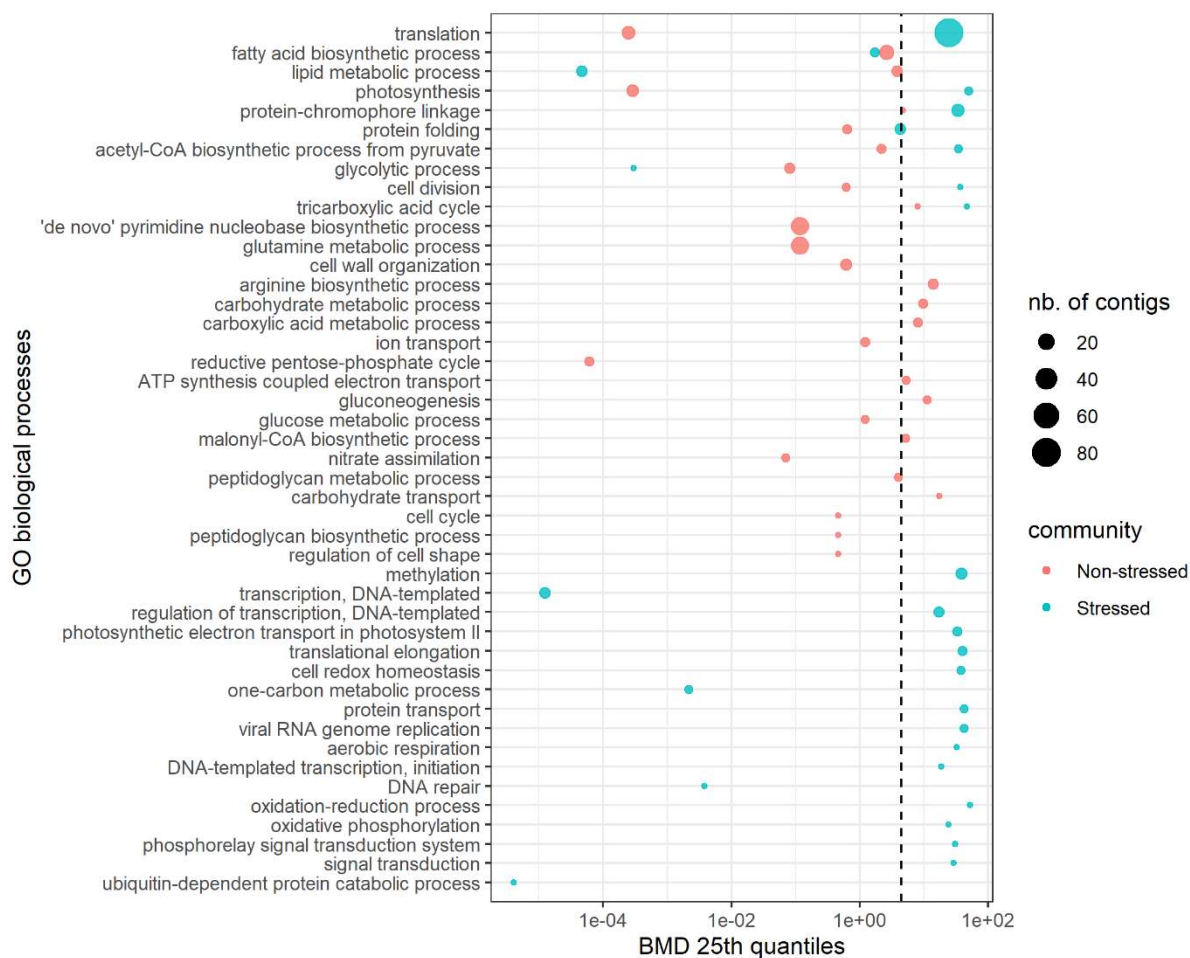


Figure 30 - 25<sup>ème</sup> percentiles des BMD obtenues par terme GO et par communauté. Les termes GO sont classés dans le même ordre que sur la figure précédente. Ce graphique a été produit avec la fonction `sensitivityplot()` du package `DRomics`. La ligne pointillée représente la BMD de la photosynthèse chez la communauté stressée.

Les sensibilités de chaque processus biologique dans chaque communauté sont représentées en Figure 30 par le 25<sup>ème</sup> percentile des BMD correspondantes. Davantage de termes GO apparaissent comme plus sensibles que l'activité photosynthétique (paramètre apical, BMD en pointillé) dans la communauté non-stressée. Pour une représentation détaillée des résultats, nous prendrons quelques exemples de termes GO particulièrement sensibles dans une des communautés (ou dans les deux) ou liés au mode d'action du diuron.

En Figure 31 sont représentés les relations dose-réponse pour les contigs impliqués, sous forme de gradients de couleur (Figure 31, gauche) et sous forme de courbes (Figure 31, droite). Pour les termes GO directement liés à la production primaire, photosynthesis (A) et protein-chromophore linkage (B), la communauté non-stressée affiche une très forte sensibilité, avec certaines BMD inférieures à la plus faible des concentrations testées ( $10^{-4}$   $\mu\text{g/L}$ ), et des tendances décroissantes ou en forme de U. La communauté stressée affiche une faible sensibilité (fortes BMD) et principalement des tendances croissantes. De même, les contigs impliqués dans le terme GO reductive pentose-phosphate cycle (C) sont très sensibles et à tendance décroissante dans la communauté non-stressée, alors qu'aucun contig ne répond à l'exposition dans la communauté stressée. Les contigs du terme GO glycolytic process (D) sont régulés dans les deux communautés, avec des tendances

non homogènes. De même pour glucose metabolic process (E), mais ce dernier n'est régulé que dans la communauté non-stressée. Enfin, les deux communautés montrent des tendances de réponse (décroissantes et en cloche) et des sensibilités similaires pour fatty acid biosynthetic process (F) et lipid metabolic process (G).

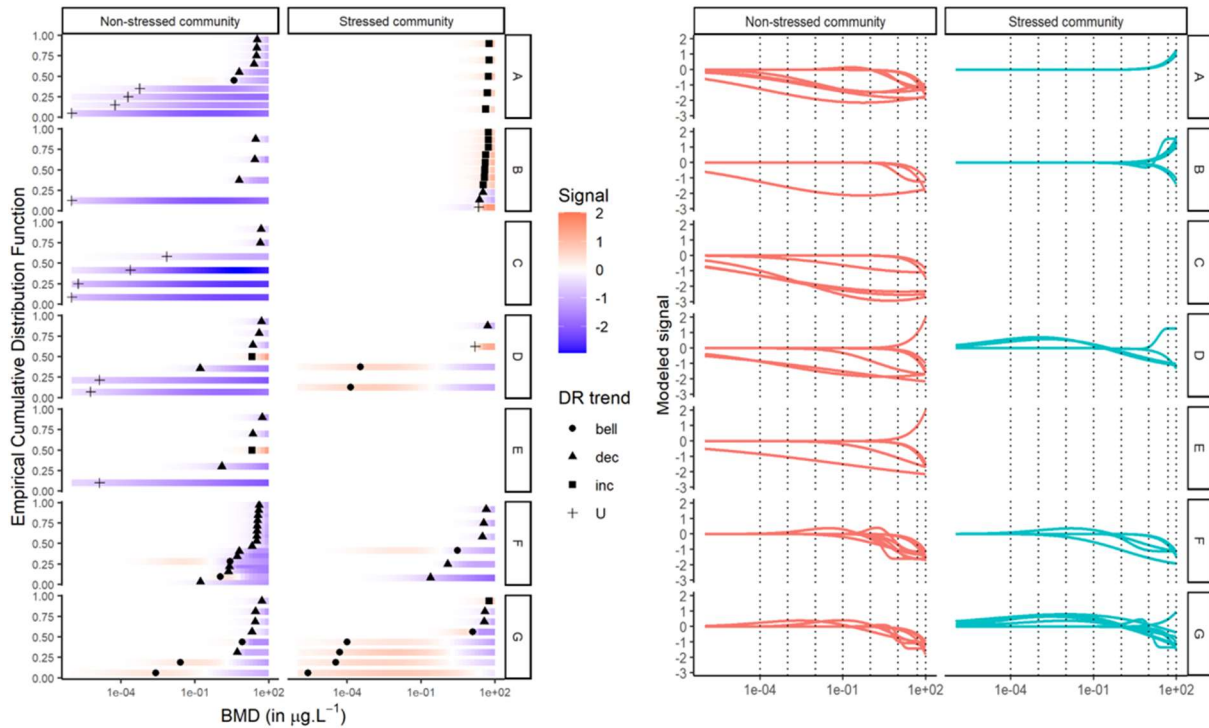


Figure 31 – Caractéristiques des contigs régulés impliqués dans : photosynthesis (A), protein-chromophore linkage (B), reductive pentose-phosphate cycle (C), glycolytic process (D), glucose metabolic process (E), fatty acid biosynthetic process (F), lipid metabolic process (G), dans les communautés non-stressée et stressée. Dans chaque graphe, chaque ligne illustre la réponse d'un contig. A gauche, pour chaque contig, les métriques de réponse représentées sont : 1/ l'intensité du signal modélisé (le signal étant des comptes de reads rlog-transformés), selon un gradient de couleurs où le bleu et le rouge indiquent une sous- et une sur-expression par rapport au témoin, 2/ la tendance dose-réponse (DR trend) le long du gradient de concentrations en diuron, représentée par la forme des points, et 3/ la valeur de BMD indiquée par la position des points le long du gradient. A droite, sont représentées les courbes dose-réponse des contigs. Ce graphique a été produit avec les fonctions `bmdplotwithgradient()` et `curvesplot()` du package `DRomics`.



#### 5.4.4 Discussion

Cette étude met en évidence des changements substantiels dans la réponse moléculaire face au stress suite à une pré-exposition chronique. Elle illustre les différences entre les communautés non stressée et stressée en termes de méta-transcriptome à l'issue de l'exposition chronique, de processus activés durant l'exposition aiguë consécutive, et de tendances et sensibilités de ces processus. Alors que la communauté non stressée est concernée principalement par des régulations à la baisse, la communauté stressée est concernée principalement par des régulations à la hausse, en particulier dans les processus biologiques liés à la production d'énergie, la transcription et la traduction. Cela suggère une réallocation des ressources dans ces processus le long du gradient d'exposition.

Je ne rentrerai pas ici dans des détails d'interprétation biologique que je ne maîtrise pas. Du point de vue méthodologique, cet exemple d'application montre que des données omiques acquises dans un cadre dose-réponse et analysées avec un outil adapté permettent une comparaison des profils d'expression de gènes et l'identification de voies particulièrement sensibles. Le dispositif expérimental, avec deux phases d'exposition, s'est avéré pertinent pour éclairer les mécanismes moléculaires de régulation face au stress et d'adaptation.

Dans le cadre conceptuel du PICT, la tolérance est classiquement évaluée par comparaison des seuils de sensibilité de communautés pré-exposée ou non, en utilisant des paramètres apicaux tels que la production primaire (Rotter et al., 2015) ou la respiration (Wakelin et al., 2014). Une comparaison directe des seuils de sensibilité calculés sur des données d'expression de gènes est compliquée principalement pour deux raisons. Premièrement, les réponses moléculaires montrent des tendances de réponse variées (croissante, décroissante, en U, en cloche). Cette complexité a été prise en compte dans cette étude en considérant à la fois les tendances dose-réponse et les valeurs de BMD dans la comparaison des deux communautés. Deuxièmement, le challenge central lorsque l'on utilise des réponses moléculaires pour comprendre l'acquisition de tolérance est l'attribution ambiguë des responsabilités de beaucoup de changements moléculaires convergeant vers la propriété de tolérance à l'échelle de la communauté. Nos résultats illustrent la complexité des processus de régulation et d'adaptation : par exemple, une sous-régulation et une forte sensibilité des processus proches de la cible primaire (photosynthèse) a été observée dans la communauté non adaptée, une sur-expression dans la communauté adaptée. Une comparaison directe des BMD, telle qu'effectuée dans la méthodologie PICT, n'est donc pas évidente. Une même BMD peut, d'une part, indiquer une sensibilité de voies délétèrement impactées, ou bien une capacité des organismes à faire face à un stress chimique. De plus, ce sont des cascades d'effets, avec leur dimension chronologique, qui pourraient résulter en une tolérance augmentée. Beaucoup reste à faire pour valider de tels mécanismes.

## 5.5 Bilan et perspectives

### Synthèse

Le développement de DRomics a été orienté par les demandes d'écotoxicologues cherchant à tirer du sens de leurs études (multi-)omiques dose-réponse. Ainsi, DRomics a été progressivement augmenté pour fournir un *workflow* capable de prendre en main des données transcriptomiques (puce à ADN ou RNAseq), protéomiques, métabolomiques et apicales. Il crée un cadre permettant une comparaison des réponses à différents niveaux et une compréhension mécanistique dans une perspective AOP. Combinées à des annotations fonctionnelles, les sorties de DRomics (tendances de réponse, BMD, etc.) peuvent maintenant être représentées par une série de fonctions graphiques pensées pour aider leur interprétation biologique au niveau des voies métaboliques. La comparaison est rendue facile de différents (i) niveaux de mesures, par exemple transcriptomique et métabolomique, (ii) objets biologiques, par exemple des communautés avec ou sans pré-exposition, ou (iii) conditions expérimentales, par exemple de temps de mesure successifs.

DRomics est utilisé par nous, et aussi par d'autres chercheurs. Par exemple, Gust et al. (2021) ont évalué le mode d'action aboutissant en une reproduction réduite chez *Daphnia pulex* exposée à du 1-méthyl-3-nitro-1-nitroguanidine en identifiant les voies KEGG les plus sensibles au niveau transcriptomique. Vokuev et al. (2021) ont confirmé, à l'aide d'analyses métabolomiques d'urine de rat, que l'empoisonnement au sarin commence par une inhibition de l'acétylcholinestérase qui déclenche une réponse toxicodynamique complexe. Song et al. (2023) ont montré comment la modélisation dose-réponse et l'estimation de seuils de sensibilité à plusieurs niveaux omiques et apicaux peuvent être positionnés sur un réseau AOP pour des rayonnements ionisants chez *Daphnia magna*.

Depuis 2020, nous avons conduit 8 sessions de formation à DRomic d'une demi-journée, en français ou en anglais, en visio ou en présentiel, organisées sous l'égide de la fondation Rovaltain, de H2O'Lyon, ou en satellite de colloques (SEFA 2021, SEFA 2022, SEFA 2023). Cette formation est régulièrement mise à jour pour y intégrer les derniers développements et les derniers exemples d'application.

### Limites

L'interprétation des données omiques (et ce n'est pas spécifique à DRomics) est limitée par l'existence et la qualité des annotations fonctionnelles. Pour certaines espèces modèles de la toxicologie, presque tous les gènes pourront être identifiés dans les bases de connaissance. Pour les modèles de l'écotoxicologie, une partie des items (contigs, métabolites, etc.) est mise de côté, faute de connaître leur fonction. Pour *S. vacuolatus*, cela correspondait à 86% des contigs et 55% des métabolites, pour les communautés de biofilm non-stressée et stressée à 61% et 86% des contigs. Cependant, nous avons pu vérifier qu'il n'y avait globalement pas de différence de sensibilité entre les items annotés et non-annotés (Figure 25). Le focus sur les items annotés n'induit pas de biais systématique en termes d'évaluation globale du risque. En revanche, l'interprétation biologique est *de facto* orientée vers les voies identifiées.

Les études portant sur des espèces modèles intègrent classiquement une analyse dite d'enrichissement. Tous les gènes annotés, qu'ils soient régulés ou non, constituent une *background gene list*. Puis l'analyse d'enrichissement (dans sa version la plus simple, l'over-representation analysis (ORA)), détermine quelles

sont les voies sur-représentées parmi les gènes régulés sur la base de tests de Fisher. Ceci permet de dresser une liste de voies dites enrichies par un certain traitement expérimental, par exemple l'exposition à un contaminant. Mais cette méthode nécessite d'essayer d'annoter tous les items du jeu de données, ce qui était impossible dans nos cas d'étude, à moins d'y consacrer des années.

Une autre partie des items, modeste (de l'ordre de quelques pourcents dans nos cas d'étude), est perdue au cours du *workflow* DRomics. Même s'il est impossible de scruter toutes les courbes dose-réponse une à une, des situations particulières sont identifiées à chaque cas d'étude, inspirant des mesures préventives conçues pour éliminer les items pour lesquels nous n'avons pas suffisamment confiance dans la relation dose-réponse modélisée. Par exemple, un test sur les résidus est implémenté, et les ajustements pour lesquels les résidus ont une tendance quadratique significative sont éliminés. L'analyse de données à haut débit requiert une approche automatisée. La philosophie de DRomics est de ne conserver que les signaux robustes.

### Perspectives

Les perspectives d'utilisation et de développement de DRomics sont nombreuses. Certaines, présentées dans les deux paragraphes ci-après, sont d'ores et déjà en bon état d'avancement.

Le projet ANR PRC EndOMiX (resp. Aurélie Cébron, LIEC) porte sur le rôle des associations plantes-microorganismes endophytes dans la biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Une des tâches de ce projet a investigué les effets du phénanthrène (un HAP) chez le peuplier (*Populus canadensis*), *via* des analyses transcriptomiques d'échantillons de racines et de feuilles après quatre semaines d'exposition. Sept concentrations, en plus du témoin, ont été testées. Le *workflow* DRomics a été appliqué, et a permis de synthétiser les voies impactées dans les racines, les feuilles, ou les deux, ainsi que leur sensibilité moyenne. Je suis heureuse que Lilian Gréau, le doctorant à la manœuvre sur cette étude, et ses encadrants, se soient approprié la démarche implémentée dans DRomics.

Un autre travail est en cours pour analyser des données de transcriptomique acquises par Sophie Prud'homme (LIEC), dans le cadre d'un projet OTELo JC intitulé DBP\_Dose. Elle a exposé durant cinq jours des embryons de poisson zèbre (*Danio rerio*) au composé phtalate di-n-butyl phtalate (DBP), avec un plan d'expérience limité à quinze échantillons, répartis en cinq concentrations (témoin inclus) et trois réplicats pour chaque concentration (pools de 10 embryons). Malgré la « faiblesse » du plan d'expérience, DRomics a identifié 2449 transcrits comme significativement dérégulés le long du gradient, et a permis leur modélisation dose-réponse. D'un point de vue méthodologique, l'intérêt particulier de cette étude, par rapport à nos précédentes applications de DRomics, c'est qu'elle porte sur un modèle biologique très décrit. Le transcriptome de *D. rerio* est très bien annoté, la fonction des gènes peut être identifiée bien davantage que pour *S. vacuolatus* ou le modèle biofilm. Au-delà des classiques analyses d'enrichissement, Ellis Franklin, lors de son stage de M2 (2023) encadré par Sophie, Marie Laure et moi-même, a combiné les sorties de DRomics avec les informations provenant de plusieurs bases de données : STRING (Szklarczyk et al., 2019), qui renseigne sur les réseaux d'interactions protéine-protéine codées par les transcrits identifiés, KEGG (Kanehisa et Goto, 2000) et Wikipathways (Martens et al., 2021), qui renseignent sur les voies métaboliques et fonctionnelles auxquelles elles participent, et Animal TFDB (Shen et al., 2022), qui renseigne sur les facteurs et co-facteurs de transcription présents parmi ceux-ci. Il a proposé une procédure d'analyse visant à rationaliser et optimiser les interprétations biologiques de milliers de courbes dose-réponse. Du point de vue

de l'interprétation biologique, cela permet de révéler des voies biologiques sensibles qui ne seraient pas ressorties des approches conventionnelles d'enrichissement ; notamment un lien entre la dérégulation du métabolisme du rétinol et le métabolisme et transport des lipides *via* le complexe de récepteurs nucléaires PPAR/RXR, en accord avec de précédentes études sur les esters de phtalate (Cocci et al., 2015, Zhang et al., 2021). D'un point de vue méthodologique, ce travail met en valeur l'approche de modélisation dose-réponse pour les données omiques, en exploitant non seulement des listes de gènes dérégulés, mais aussi leur sensibilité (BMD) et leur tendance de réponse (croissante, décroissante, en U ou en cloche).

D'autres perspectives portent sur les aspects méthodologiques.

Dans le cadre du projet Chroco (ANR JCJC 2022-2026) (« Chronology of coping with a toxic stress : from omics to apical responses »), les effets du composé phtalate DBP sont investigués chez *Daphnia magna*. L'étude prévue des réponses transcriptomiques à la fois le long d'un gradient d'exposition au DBP et au cours du temps, vise à décrypter la chronologie des effets et des mécanismes de réponse mis en place. Cela soulève un challenge méthodologique d'analyse des données dans la lignée du développement de DRomics. Je détaillerai davantage cette perspective dans la Partie 8 (Projet).

Enfin, une perspective serait de développer DRomics (ou un autre package R) pour prendre en compte encore davantage de données. Pour répondre aux demandes de nos collègues utilisateurs, nous avons récemment intégré à DRomics l'analyse de données apicales dites « d'ancrage phénotypique », afin de permettre, par l'utilisation d'un *workflow* commun, la comparaison des résultats obtenus à différents niveaux d'organisation (par exemple, transcriptomique et activité photosynthétique en ancrage). Mais ce module pour données apicales n'est utilisable que pour des données quantitatives continues, et pour lesquelles l'hypothèse d'une distribution Gaussienne est raisonnable. L'idée serait de développer un équivalent du *workflow* DRomics, avec les étapes de sélection des variables régulées, de sélection du meilleur modèle et la dérivation de la BMD, pour des données non-omiques de diverses natures. Il pourrait s'agir de mesures de traits ou de biomarqueurs, de données de type *time-to-event*, de données d'observation ou non d'un événement ou comportement donné, ou encore de données de type ratio (par exemple, part de temps passé dans une zone donnée évaluée par analyse vidéo).



## 6 Modélisation mécaniste en écotoxicologie transgénérationnelle

### 6.1 Contexte

Les travaux présentés dans cette partie ont été réalisés dans le cadre d'une collaboration au long cours avec Frédéric Alonzo, qui mène à l'IRSN (Cadarache) des expérimentations multigénérationnelles avec des daphnies *Daphnia magna* exposées à des radionucléides. En 2011, nous avons co-encadré le stage de M2 de Pierre-Albin Biron (Biron et al., 2012), qui avait pour objectif d'évaluer les conséquences, à l'échelle de la population, des effets de l'uranium appauvri observés sur la croissance et la reproduction des organismes de trois générations successives (Massarin et al., 2010).

Puis, suite à mon recrutement, nous avons construit un projet NEEDS intitulé DEB-RAD et financé en 2016 et 2017, qui visait à construire des modèles DEBtox transgénérationnels, afin de revisiter les données acquises à l'IRSN. Ces données ont l'originalité de couvrir plusieurs générations, et plusieurs régimes d'exposition, avec des phases d'exposition ou de récupération selon le stade de vie des daphnies (par exemple, exposition continue, exposition uniquement au stade embryon, etc.). Le projet DEB-RAD, qui est toujours en cours de valorisation, porte sur les effets de l'uranium appauvri (principalement chimiotoxique), du césium-137 (radiotoxique, émetteur de radiations gamma) et de l'américium-241 (radiotoxique, émetteur de radiations alpha) sur *D. magna*. Dans le cadre de DEB-RAD, nous avons co-encadré en 2016-2017 le stage de DU (post M2) d'Antoine Alonzo au LIEC, qui portait sur les effets de l'irradiation alpha et l'analyse des données publiées dans Alonzo et al. (2006), et Alonzo et al. (2008). Nous avons collaboré, lors de nombreuses sessions de travail à Metz et à Cadarache, pour le volet modélisation de la thèse de Marie Trijau (IRSN, 2015-2018, Direction Jean-Christophe Poggiale, Co-direction Frédéric Alonzo), qui a mis en équations DEBtox les effets de l'irradiation gamma. Mais j'ai choisi de présenter ici les travaux portant sur les effets de l'uranium appauvri (Alonzo et al., submitted), le même contaminant que dans Biron et al. (2012), et pour lequel un très riche ensemble de données est disponible.

Après une brève présentation du modèle biologique *D. magna*, ce chapitre est organisé en trois parties :

- Une partie sur le changement d'échelle, visant à extrapoler les conséquences des effets de l'uranium appauvri observés sur la croissance et la reproduction des organismes en termes de dynamique de population.
- Une partie proposant un modèle DEBtox transgénérationnel, avec un compartiment de dommages transmis à la descendance et deux modes d'action physiologiques.
- Une partie de bilan et perspectives.

## Cycle de vie de *D. magna*

La compréhension du présent chapitre sera certainement plus aisée après quelques éléments de présentation du cycle de vie du modèle biologique. *D. magna* est communément utilisée en écotoxicologie aquatique réglementaire. Il existe des normes ISO et OCDE pour guider les tests. Sa facile maintenance en laboratoire, sa maniabilité et son cycle de vie relativement rapide et parthénogénétique sont appréciés par les expérimentateurs. Le génome de *D. magna* est disponible, sa biologie est bien caractérisée, ce qui en fait une espèce modèle.

Les daphnies grandissent par mues successives. A partir de la maturité sexuelle, les mues sont synchronisées aux évènements de reproduction. Quand les conditions environnementales sont favorables, en termes de température, de lumière, de nourriture, etc. la reproduction est asexuelle, par parthénogénèse donnant naissance à des générations clonales de femelles génétiquement identiques. Les œufs parthénogénétiques sont déposés dans la poche incubatrice des mères, située au niveau dorsal. Ils y restent durant environ trois jours de développement embryonnaire, puis éclosent sous forme de juvéniles (appelés néonates les premières 24 h) qui sont relargués dans l'eau. Quelques (dizaines de) minutes après la fin du relargage, les mères muent et pondent à nouveau. Ce cycle parthénogénétique est représenté en Figure 32.

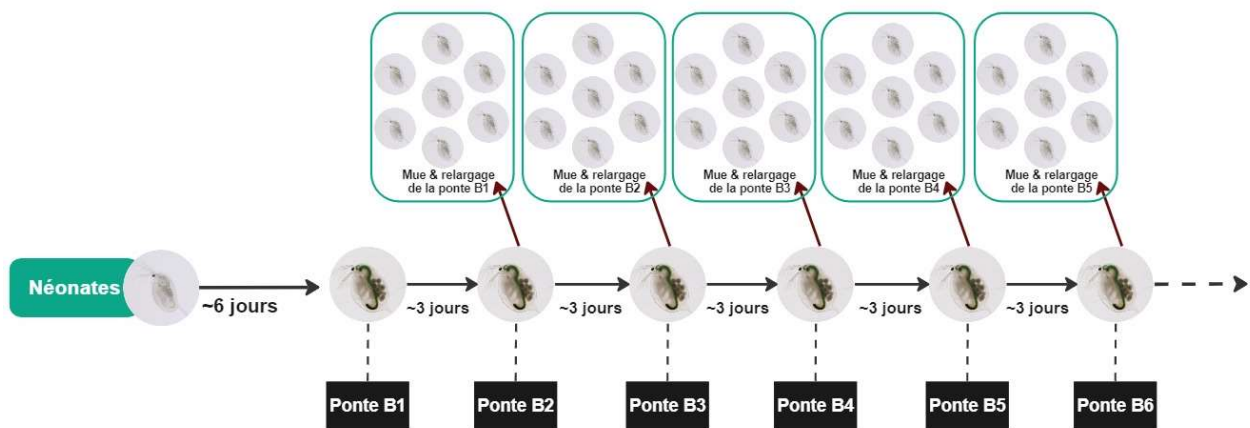


Figure 32 - Schéma du cycle de vie parthénogénétique de *D. magna*. D'après Jérémie Ohanessian.

## 6.2 Couplage de modèles TK-TD et de modèles de dynamique de population

### 6.2.1 Introduction

Il est reconnu que l'évaluation des risques écotoxicologiques peut améliorer sensiblement sa pertinence écologique en considérant les réponses au niveau de la population plutôt qu'au niveau de l'organisme (Stark et al., 2004). Dans cette perspective, les modèles de population sont des outils particulièrement utiles qui permettent de combiner de multiples effets toxiques observés lors d'expériences de laboratoire sur la survie et la fécondité des organismes en un seul critère d'évaluation au niveau de la population, tel que le taux de croissance asymptotique de la population. Les modèles matriciels de population (Caswell, 1996) sont attractifs pour leur potentiel prospectif dans la modélisation de la santé des populations, ils permettent d'inclure explicitement les effets des composés toxiques sur les différents âges ou stades de développement des organismes au sein des populations (Klanjscek et al., 2006, Charles et al., 2009, Raimondo et al., 2009, Ducrot et al., 2010).

L'étude des effets toxiques dans le cadre de régimes d'exposition multigénérationnels représente une autre clé pour améliorer la pertinence écologique de l'évaluation des risques, car les populations naturelles sont souvent exposées à des substances toxiques sur plusieurs générations. Jusqu'à présent, ces études multigénérationnelles sont rares et leurs résultats varient selon les polluants testés. Chez *D. magna*, l'exposition au nickel en suspension dans l'eau a eu des effets de plus en plus importants sur la croissance sur deux générations (Pane et al., 2004) et sur la taille de la progéniture sur sept générations (Münzinger, 1990). De même, une sensibilité croissante de la reproduction et de la survie des daphnies exposées à l'américium-241 a été observée sur trois générations (Alonzo et al., 2008). En revanche, les résultats obtenus avec le cuivre suggèrent que les daphnies peuvent développer une résistance avec un taux de survie supérieur lorsque les parents ont été exposés précédemment (LeBlanc, 1982). Ces résultats contrastés soulignent la nécessité de tests multigénérationnels, car les effets toxiques observés sur une génération peuvent sous-estimer ou surestimer les effets réels des polluants sur un plus long terme. Dans le cas de l'uranium appauvri (UA), une étude antérieure a démontré une augmentation de la sensibilité sur trois générations de *D. magna* (Massarin et al., 2010). Une approche DEBtox a été utilisée pour étudier les mécanismes d'action possibles de l'UA (Massarin et al., 2011). Les modèles DEBtox décrivent mécaniquement comment les coûts métaboliques induits par l'exposition à un toxique se font au détriment des processus dépendant de l'énergie, comme la croissance somatique, la maintenance et la reproduction (Kooijman et Bedaux, 1996, Kooijman, 2000). L'étude précédente montre qu'une diminution de l'efficacité de l'assimilation est probable et suffisante pour expliquer les effets observés chez *D. magna* exposée à l'UA. Ce mécanisme a été confirmé par des mesures complémentaires de l'assimilation utilisant des aliments radiomarqués et des observations au microscope de dommages histologiques sur l'épithélium intestinal (Massarin et al., 2010, 2011).

Après avoir décrit les effets toxiques de l'UA sur le budget énergétique et la physiologie de *D. magna*, il reste à examiner les conséquences au niveau de la population. L'objectif de cette étude est d'explorer comment l'augmentation des effets de l'UA au niveau individuel au cours des trois générations successives peut modifier la réponse populationnelle. Pour ce faire, des modèles TKTD de survie et DEBtox sont couplés à des modèles de dynamique de population.



## 6.2.2 Matériel et méthodes

### Données

Les données de survie, de fécondité et de croissance de *D. magna* exposées à l'UA sont issues de bioessais réalisés à l'IRSN durant la thèse de Sandrine Massarin (Massarin et al., 2010). Des daphnies ont été continuellement exposées pendant trois générations appelées F0, F1 et F2, à quatre concentrations d'UA (0, 10, 25 et 75 µg/L). La génération F0 a été initiée avec des néonates fraîchement relargués (< 24 h) suite à la cinquième ponte dans l'élevage. Les générations F1 et F2 ont été lancées avec des néonates fraîchement relargués (< 24 h) issus de la cinquième ponte des générations précédentes, et ont été exposées aux mêmes concentrations que leurs parents. La survie et la reproduction ont été suivies quotidiennement durant 21-24 jours (jusqu'à la cinquième ponte), dans trois béchers par condition contenant 20 daphnies chacun. La taille des daphnies a été mesurée chez les néonates et chez les adultes aux première, troisième et cinquième pontes (appelées B1, B3 et B5), avec cinq réplicats par traitement. Les expérimentations ont été réalisées dans des conditions de laboratoire optimales pour *D. magna* (cf Massarin et al., 2010, pour les détails).

### Modélisation des effets à l'échelle des individus

Les effets toxiques de l'UA sur la croissance somatique et la reproduction ont été modélisés par les équations du modèle DEBtox (Kooijman et Bedaux, 1996) modifiées par Billoir et al., 2008a. Massarin et al. (2011) ont montré que parmi les cinq modes d'action physiologiques proposés par l'approche DEBtox, l'UA cause vraisemblablement une diminution de l'assimilation chez *D. magna*. Dans les modèles toxicocinétiques-toxicodynamiques, dont fait partie le DEBtox, les fonctions de stress décrivant les effets toxiques sont supposées dépendre de la concentration interne dans les organismes. Pour l'UA chez *D. magna*, Massarin et al. (2011) ont montré que la cinétique de bioaccumulation était très rapide, c'est-à-dire que l'équilibre entre la concentration interne et la concentration d'exposition est atteint en quelques heures. Ainsi, la fonction de stress sur l'assimilation  $str_A$  peut être directement reliée à la concentration d'exposition par :

$$str_A = k_A \cdot \max(0, c - NEC_A) \quad (\text{Equation 6.2.1})$$

en d'autres termes, le stress induit par le contaminant est nul en dessous d'une concentration seuil  $NEC_A$ , puis proportionnel à la différence  $c - NEC_A$  au-delà de la  $NEC_A$ , avec un coefficient de proportionnalité (*i.e.* d'intensité des effets)  $k_A$ .

Les processus de croissance et de reproduction ont été modélisés par les équations DEBtox suivantes, données pour des conditions *ad libitum*. Les variables modélisées sont fonctions du temps  $t$  et de la concentration d'exposition  $c$ . Il s'agit de  $l$  (-), la taille structurelle normalisée, c'est-à-dire exprimée relativement à la taille maximum  $L_m$  (mm), et de  $\dot{R}$ , le taux de reproduction (nombre d'œufs par mère et par jour).

$$\frac{dl}{dt} = \dot{r}_B \frac{2}{2 - str_A} (1 - str_A - l) \quad (\text{Equation 6.2.2})$$

avec  $l(t_0) = l_b = \frac{L_b}{L_m}$ .

$$\dot{R} = \frac{\dot{R}_m}{1 - l_p^3} \left[ (1 - str_A) l^2 \left( \frac{1+l}{1+(1-str_A)} \right) - l_p^3 \right] \text{ si } l \geq l_p \text{ et } \dot{R} = 0 \text{ si } l < l_p \quad (\text{Equation 6.2.3})$$

La reproduction ne commence qu'une fois la taille structurelle de puberté (normalisée)  $l_p$  atteinte. Les paramètres des Equations 6.2.1 à 6.2.3 sont définis dans le Tableau 11.

Pour les témoins, la probabilité de survie quotidienne a été supposée indépendante de l'âge sur la durée des tests d'exposition. Pour les organismes exposés, les effets potentiels sur la survie sont modélisés par une fonction de stress  $str_S$ , analogue à  $str_A$  :

$$str_S = k_S \cdot \max(0, c - NEC_S) \quad (\text{Equation 6.2.4})$$

La probabilité  $S$  d'être en vie au temps  $t$  exprimé en jour et à la concentration  $c$  est donnée par :

$$S = ((1 - m)(1 - str_S))^t \quad (\text{Equation 6.2.5})$$

Les paramètres des Equations 6.2.4 et 6.2.5 sont définis dans le Tableau 11.

Tableau 11 - Paramètres impliqués dans les modèles à l'échelle des organismes (DEBtox en partie haute et survie en partie basse). - signifie sans dimension.

Symbole	Dimension	Interprétation
$L_b$	mm	Taille structurelle initiale à la naissance
$L_m$	mm	Taille structurelle maximum
$\dot{r}_B$	d <sup>-1</sup>	Taux de croissance de Von Bertalanffy
$l_p$	-	Taille structurelle normalisée à la puberté
$\dot{R}_m$	egg d <sup>-1</sup>	Taux de reproduction maximum
$NEC_A$	µg L <sup>-1</sup>	No Effect Concentration, concentration seuil pour les effets sur l'assimilation
$k_A$	µg <sup>-1</sup> L	Coefficient d'intensité pour les effets sur l'assimilation
$m$	-	Probabilité de mortalité quotidienne chez les témoins
$NEC_S$	µg L <sup>-1</sup>	No Effect Concentration, concentration seuil pour les effets sur la survie
$k_S$	µg <sup>-1</sup> L	Coefficient d'intensité pour les effets sur la survie

Les paramètres des modèles DEBtox ont été estimés séparément pour chaque génération, F0, F1 et F2. L'estimation a été effectuée par inférence Bayésienne, une méthode qui combine des distributions *a priori* définies pour chaque paramètre et la vraisemblance des données. Les distributions *a priori* ont été choisies selon les informations disponibles et sont identiques pour toutes les générations. Des modèles d'erreur adaptés à chaque type de données ont été considérés : Binomial pour la survie, Normal pour les mesures de taille, et Négatif Binomial pour les données de reproduction, exprimées en nombre cumulé d'œufs par mère. Les équations de croissance et de reproduction ont été ajustées simultanément du fait de leur interdépendance et de leurs paramètres communs. L'inférence Bayésienne a été pratiquée *via* R et le package rjags, au moyen des algorithmes MCMC (Markov Chains Monte Carlo) implémentés dans JAGS (Plummer, 2010). Les détails pratiques sont dans Biron et al. (2012). Une fois la convergence des algorithmes atteinte, de nouvelles données répliquées par le modèle (modèle mécaniste + modèles d'erreur) ont été simulées, pour comparaison aux données expérimentales. Pour cela, 1000 tirages aléatoires sont effectués dans la distribution conjointe *a posteriori* des paramètres, reflétant l'incertitude liée aux modèles.

## Modélisation des effets à l'échelle de la population

Les sorties du modèle mécaniste ont été projetées à l'échelle de la population au moyen de modèles de population structurés en classes d'âge avec un pas de temps d'un jour. Les graphes de cycle de vie sont représentés avec 21 classes d'âge par génération (Figure 33). Les taux de survie et de fécondité sont spécifiques à l'âge et à la génération.

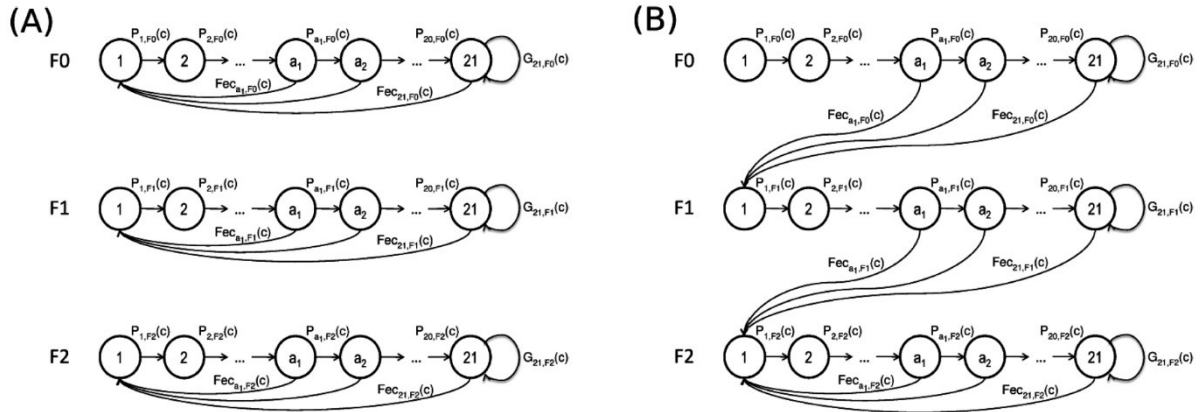


Figure 33 - Graphes de cycle de vie considérés dans les deux approches de modélisation au niveau de la population : (A) populations basées sur F0, F1, ou F2 et (B) population basée sur F0, F1, puis F2.  $a_1$  indique la première classe d'âge adulte.

Dans chaque génération  $F$ , les daphnies sont supposées passer d'une classe d'âge  $i$  à la suivante selon des taux de survie  $P_{i,F}$  calculés en considérant la fonction de survie (Equation 6.2.5) calibrée pour chaque génération et un modèle matriciel de type *birth pulse* (naissances synchronisées) avec un *prebreeding census* (recensement des individus juste avant les naissances) :

$$P_{i,F}(c) = \frac{S_F(t(i+1), c)}{S_F(t(i), c)} \quad (\text{Equation 6.2.6})$$

Un terme  $G_{21,F}(c) = 0.95 P_{20,F}(c)$  a été ajouté pour boucler sur la dernière classe d'âge jusqu'à une espérance de vie plausible pour des daphnies.

Des taux de fécondité  $Fec_{i,F}$  ont été calculés à partir du modèle DEBtox de reproduction (Equation 6.2.3) calibrée pour chaque génération. Les daphnies néonates sont relarguées trois jours après le dépôt des œufs dans la poche incubatrice des mères. Pour cette raison, un délai de trois jours a été introduit dans l'Equation 6.2.7 pour prendre en compte le temps de maturation nécessaire pour passer des œufs aux néonates.

$$Fec_{i,F}(c) = \int_i^{i+1} P_{1,F}(c) \dot{R}_F(t-3, c) dt \quad (\text{Equation 6.2.7})$$

Deux approches différentes ont été considérées pour extrapoler les effets toxiques de l'échelle de l'individu à celle de la population. Premièrement, des dynamiques de population ont été déduites, séparément, des observations expérimentales en F0, F1 et F2 (Figure 33, A). Le taux d'accroissement asymptotique de la

population,  $\lambda$ , a été calculé comme la valeur dominante de la matrice de Leslie (21 \* 21) où les taux de fécondité sont reportés dans la première ligne, et les taux de survie dans la sous-diagonale. Cette approche a pour but d'évaluer et de comparer l'ampleur des conséquences de l'exposition à l'UA sur  $\lambda$ , que l'on considère les effets observés en F0, F1 ou en F2. Dans la théorie des modèles de Leslie (Caswell, 2001), la population va vers l'extinction si  $\lambda$  est strictement inférieur à 1. Deuxièmement, les effets observés chez les différentes générations ont été considérés conjointement, en utilisant un modèle qui prend en compte les trois générations successivement (Figure 33, B), F0-F1-F2. Pour cela, les daphnies F0 (respectivement F1) produisent une progéniture F1 (respectivement F2), et les générations suivantes sont supposées avoir des taux de survie et de reproduction similaires à F2. D'après le graphe de cycle de vie, trois critères d'extinction ont été considérés :

- Critère C1 : extinction en F0 si  $Fec_{i,F0}(c) = 0$  quel que soit l'âge  $i$
- Critère C2 : extinction en F1 si  $Fec_{i,F1}(c) = 0$  quel que soit l'âge  $i$
- Critère C3 : extinction dans les générations suivantes si la population survie à F0 et F1 et le  $\lambda$  basé sur F2 devient inférieur à 1

Des simulations de type Monte Carlo ont été effectuées de manière à prendre en compte l'incertitude des modèles mécanistes ajustés à l'échelle individuelle. Pour chaque génération F0, F1 et F2, 1000 jeux de paramètres ont été tirés aléatoirement dans leur distribution conjointe *a posteriori*. Pour chaque jeu de paramètres, les taux de survie et de reproduction ont été calculés pour la gamme de concentration d'UA allant de 0 à 75  $\mu\text{g/L}$ , et les  $\lambda$  et les probabilités d'extinction en ont été dérivés.

## 6.2.3 Résultats

### Modélisation des effets à l'échelle des individus

Les estimations des paramètres obtenues pour les trois générations F0, F1 et F2, ont été comparées selon leurs intervalles de crédibilité à 95% (définis par les percentiles à 2.5 et 97.5% des distributions *a posteriori*). Concernant les paramètres non toxicologiques ( $L_b, L_m, \dot{r}_B, l_p$ ), les estimations obtenues pour les trois générations ne sont pas significativement différentes entre générations, à l'exception du taux de croissance  $\dot{r}_B$  plus élevé pour F0 que pour F1. Les estimations des seuils de toxicité ( $NEC_A, NEC_S$ ) ne sont pas significativement différentes entre générations. En revanche, les coefficients d'intensité des fonctions de stress sublétales sur l'assimilation ( $k_A$ ) sont significativement plus élevés en F1 et F2 qu'en F0, indiquant une augmentation de la sensibilité à l'UA en cas de pré-exposition maternelle. Pour les trois traits de vie considérés (croissance, reproduction et survie), la Figure 34 permet de juger de la qualité d'ajustement des modèles mécanistes à l'échelle des individus. Les organismes F1 exposés à 75  $\mu\text{g/L}$  d'UA ne se sont pas reproduits. C'est pourquoi il n'y a pas de données pour la génération F2 à cette concentration. Sur la base de cette Figure 34, la qualité d'ajustement est bonne, presque toutes les données expérimentales sont dans les intervalles de crédibilité à 95% des données répliquées.

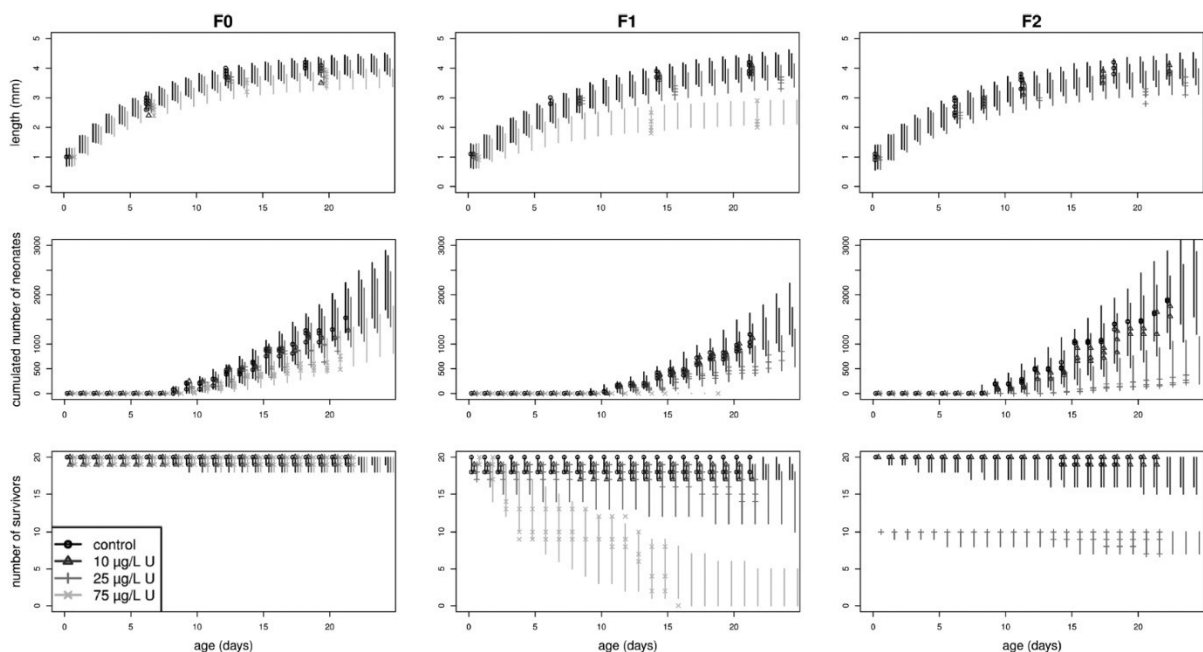


Figure 34 - Effets de l'uranium appauvri chez *D. magna* avec la comparaison des données observées (points) et données répliquées par le modèle (segments correspondant aux intervalles de crédibilité à 95% des distributions de probabilité). La croissance, la reproduction et la survie sont représentées sur les première, deuxième et troisième lignes, respectivement, et les générations F0, F1 et F2 sont en colonnes. Les différents traitements sont légèrement décalés en abscisse pour faciliter leur visualisation.

## Modélisation des effets à l'échelle de la population

Le taux d'accroissement asymptotique de la population,  $\lambda$ , exprimé relativement à sa valeur en condition témoin, varie significativement entre les générations sur la gamme de concentration en UA (Figure 35, A). La population théorique basée sur F0 est moins sensible que celles basées sur F1 et F2. Les intervalles de confiance se chevauchent pour les populations théoriques basées sur F1 et sur F2, indiquant une sensibilité non significativement différente. L'incertitude est plus grande pour les projections issues de F2 que de F1. Dans la génération F0, les effets de l'UA à l'échelle des individus sont limités aux traits sublétaux (aucune mortalité) et les impacts extrapolés à l'échelle de la population restent faibles. Dans les générations F1 et F2, les impacts populationnels sont beaucoup plus forts (Figure 35, A), résultant d'effets sublétaux et létaux à l'échelle individuelle.

La probabilité d'extinction de la population théorique basée sur F0-F1-F2 reste nulle en dessous de 26  $\mu\text{g/L}$ , puis augmente de 0 à 1 entre 26 et 72  $\mu\text{g/L}$  (Figure 35, B). Aux concentrations d'exposition de 26 à 68  $\mu\text{g/L}$ , l'extinction de la population est exclusivement due au critère C3 ( $\lambda$  basé sur F2 < 1). Entre 68 et 72  $\mu\text{g/L}$ , l'extinction est causée soit par le critère C2 (pas de reproduction en F1), soit par le critère C3. Au-delà de 72  $\mu\text{g/L}$ , l'extinction de la population est exclusivement due au critère C2. Le critère C1 n'est jamais la cause de l'extinction de la population dans la gamme d'exposition considérée.

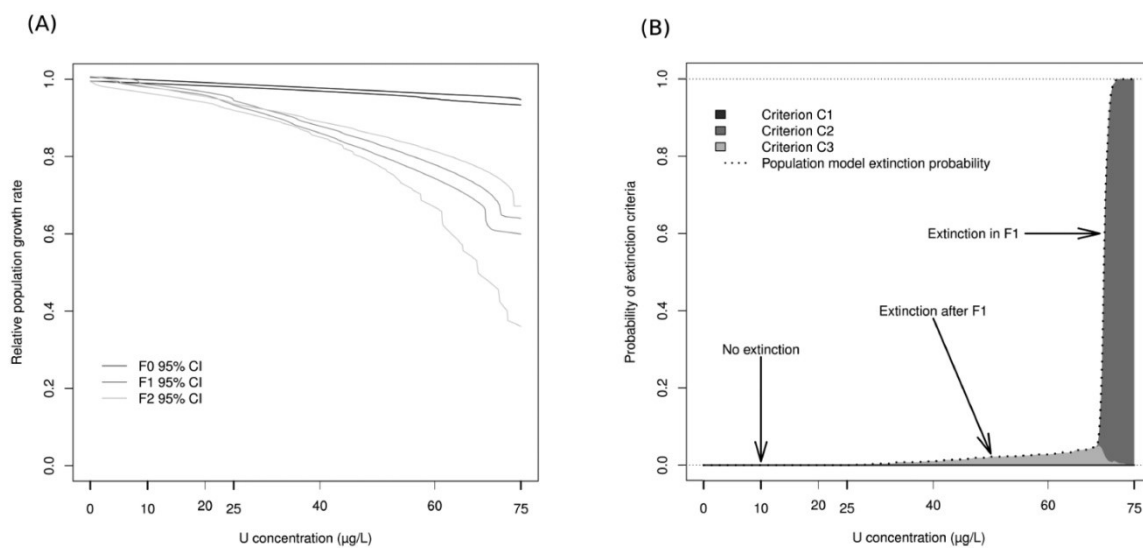


Figure 35 - Indicateurs dérivés des deux approches de modélisation à l'échelle de la population : (A) taux d'accroissement asymptotique des populations basées sur F0, F1, et F2 et (B) probabilité d'extinction issue du modèle F0-F1-F2 avec les aires correspondant aux trois critères (C1-C3).

## 6.2.4 Discussion

D'un point de vue statistique, la plus grande incertitude obtenue pour les résultats de F2 par rapport à F0 et F1 s'explique par le nombre de données plus restreint, avec une concentration testée de moins (75 µg/L) et un nombre initial d'individus réduit à 10 au lieu de 20 à 25 µg/L d'UA. Dans le cadre Bayésien, les paramètres sont estimés sous forme de distributions de probabilité qui reflètent l'incertitude. Cela fournit des informations complètes et explicites pour les comparaisons d'intérêt, par exemple entre générations dans notre cas, et permet de répercuter l'incertitude lors de projections ou d'extrapolations, comme ici pour évaluer les impacts à l'échelle de la population.

A l'échelle de la population, notre première approche peut sembler incohérente dans le contexte d'une étude multi-génération. En effet, les modèles matriciels sont censés décrire la dynamique d'une population au cours de générations successives, alors qu'ici ils sont utilisés comme des outils de projection et d'intégration des effets observés expérimentalement dans chaque génération séparément (Figure 35, A), comme dans Raimondo et al. (2009). Une telle approche ne permet d'aborder que les scénarios suivants : et si l'évaluation du risque reposait sur des projections à l'échelle de la population à partir de tests effectués avec des organismes dont les parents n'étaient pas exposés (comme les F0) ? dont les parents étaient exposés (comme les F1) ? dont les parents et les grands-parents étaient exposés (comme les F2) ?

Dans la seconde approche proposée, le modèle F0-F1-F2 tente de mimer le lien entre les générations, et prend en compte toutes les observations expérimentales chez les générations successives. L'extinction de la population se produit parfois avant que la troisième génération ne soit atteinte (Critère C2), ou à une génération ultérieure (Critère C3). Cela démontre que les effets observés chez des générations successives doivent être pris en compte de manière combinée.

Notre modèle F0-F1-F2 décrit la dynamique d'une population théorique dans laquelle les deux premières générations se comportent comme F0 et F1, et toutes les générations suivantes comme F2. Cette hypothèse simple a été choisie pour une première tentative d'extrapolation des résultats de tests de toxicité multigénérationnels à un niveau d'organisation biologique supérieur. Simuler des changements dans la sévérité des effets à partir de F3 serait pertinent, mais resterait hautement spéculatif en l'absence de résultats expérimentaux. Les effets de l'uranium pourraient encore augmenter au cours des générations ou refléter le développement d'une résistance chez *D. magna*. Comprendre les mécanismes sous-jacents à l'augmentation observée des effets au cours des générations permettrait d'extrapoler d'une génération à la suivante, mais les expérimentations conduites par Massarin et al. (2010) n'avaient pas été planifiées dans ce but. La sensibilité accrue à l'uranium au cours des générations pourrait être due à des altérations génétiques dans les cellules germinales et donc des dommages transmis à la progéniture, et/ou à l'exposition des embryons dans la poche incubatrice chez les générations F1 et F2 (mais pas pour la génération F0 exposée à partir du stade néonate). Des expérimentations supplémentaires sont nécessaires pour aborder ces hypothèses et examiner les effets sur un plus long terme.

L'échelle de la population est reconnue comme plus pertinente écologiquement que celle de l'organisme. Dans ce contexte, l'évaluation du risque écologique gagnerait à considérer des conditions environnementales réalistes (Forbes et al., 2011), en particulier des scénarios de disponibilité de nourriture dans notre étude, dans laquelle le contaminant altère l'acquisition et l'assimilation de nourriture. Un régime constamment *ad libitum*

n'est pas représentatif de la situation naturelle dans laquelle les réponses de la population à l'uranium peuvent différer lors d'épisodes de limitation des ressources. Inclure des régimes réalistes dans le modèle requerrait de nouvelles études expérimentales. La sévérité des effets de l'uranium pourrait être réduite en condition *sub libitum*, comme observé avec d'autres contaminants (Antunes et al., 2004, Smolders et al., 2005).

Le couplage de modèles DEBtox et de modèles TKTD de survie avec des modèles matriciels de population s'avère être une approche efficace pour intégrer les effets toxiques touchant plusieurs traits d'histoire de vie. Cependant, nos résultats suggèrent que les projections à l'échelle de la population peuvent être trompeuses si les aspects multigénérationnels sont ignorés. Dans le cas de l'uranium, ne considérer que la première génération de daphnies exposées sous-estime grandement la réponse de la population (Figure 35, A). De plus, nos résultats montrent que la dynamique de population ne peut pas être simplifiée à l'examen seul de la génération la plus affectée parmi plusieurs générations. Ces constatations rejoignent d'autres études qui ont montré l'intérêt d'intégrer des observations sur plusieurs générations dans les modèles de dynamique des populations en écotoxicologie (Prud'homme et al., 2017), que l'exposition soit maintenue (Raimondo et al., 2009) ou qu'il s'agisse d'effets induits par une exposition (grand-)parentale (Cribiu et al., 2020).



## 6.3 Modèles DEBtox avec transmission de dommages transgénérationnels

### 6.3.1 Introduction

Tous les modèles TKTD décrivent les effets toxiques au cours du temps. Dans une première étape, la toxicocinétique (TK) schématise la façon dont un contaminant est internalisé depuis le milieu d'exposition, et donc comment sa concentration interne dans les organismes varie au cours du temps. Dans une deuxième étape, la toxicodynamique (TD) décrit comment la concentration interne cause un stress toxique qui altère la survie (dans les modèles GUTS) ou la croissance et la reproduction (dans les modèles DEBtox). Différents modes d'action physiologiques sont proposés dans les modèles DEBtox standard, pour détailler comment le stress toxique affecte un des processus du budget énergétique, de l'assimilation de l'énergie à partir de la nourriture à l'allocation de l'énergie aux fonctions biologiques que sont la maintenance, la croissance, la maturation et la production de descendance.

Dans les premiers modèles DEBtox, le niveau de stress toxique dans les organismes ne dépend que de la concentration internalisée (Kooijman et Bedaux, 1996, Jager et Zimmer, 2012). Plus récemment, Jager (2020) a suggéré de lier le stress toxique à un compartiment de dommage, pour les cas où les changements des effets toxiques ne peuvent pas être reliés aux changements de concentration interne observés. Au départ, ce concept de dommage a été défini dans le cadre GUTS (Jager et al., 2011). Le dommage est une variable toxicocinétique additionnelle qui intègre toute sorte d'altérations biochimiques et physiologiques impliquées dans la toxicité. Cette définition est volontairement abstraite, pour que le concept de dommage soit générique. Le dommage ne peut donc pas être mesuré directement, dans certains cas il pourrait être approché par un marqueur spécifique à un mécanisme d'action connu.

Les premières analyses DEBtox des effets de l'uranium appauvri (UA) suggèrent que les perturbations en termes de croissance et de reproduction sont vraisemblablement dues à une réduction de l'assimilation. Ce mode d'action se retrouve chez toutes les espèces testées : la daphnie *D. magna* (Massarin et al., 2011), le nématode *C. elegans* (Goussen et al., 2015a) et le poisson zèbre *D. rerio* (Augustine et al., 2012), et est corroboré par des observations microscopiques et des mesures ciblées d'assimilation du carbone chez *D. magna* et *D. rerio*. De plus, il est observé une aggravation des effets, sur trois générations chez *D. magna*, et sur plus de vingt générations chez *C. elegans*. Cela peut être imputable à des réponses évolutives dans une population génétiquement diverse de nématodes (Goussen et al., 2015b), mais dans une population monoclonale de daphnies, l'augmentation de la toxicité relève nécessairement d'un autre mécanisme. Plaire et al. (2013) a montré que l'UA internalisé n'augmente pas entre les générations F1 et F2, et que des altérations significatives de l'ADN sont détectées à des concentrations de plus en plus faibles au cours des générations. Ainsi ces altérations de l'ADN pourraient être transmises des mères exposées à leurs œufs, et accumulées au cours des générations. Reste à explorer dans le cadre d'un modèle DEBtox comment ces dommages génétiques héréditaires peuvent agir comme un facteur de stress transgénérationnel.

Dans cette étude, nous avons construit un modèle DEBtox incluant un compartiment de dommage héréditaire. Nos objectifs sont les suivants :

- Evaluer si le concept TKTD de compartiment de dommage peut expliquer l'augmentation de la sévérité des effets au cours des générations.
- Identifier l'éventuel mode d'action physiologique associé à ce compartiment de dommage.

## 6.3.2 Matériel et méthodes

### Données

Les jeux de données proviennent de deux expérimentations, qui ont mis en évidence les effets de l'UA sur la croissance et la reproduction de *D. magna* au cours de deux à trois générations successives (F0 et F1 ou F0, F1 et F2) (Massarin et al., 2010, Plaire et al., 2013). Les tests d'exposition ont tous été menés dans des conditions standard et optimales de renouvellement de milieu, densité, température, nourrissage, etc. Les parents et leurs descendants sont exposés à la même concentration. Les gammes de concentrations d'UA testées sont 10, 25 et 75  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Massarin et al., 2010) et 2.0, 9.9, 22.2 et 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Plaire et al., 2013), en plus des témoins non exposés. La reproduction a été suivie quotidiennement et convertie en masse sèche ( $\mu\text{g dw}$  par femelle) en se basant sur la masse sèche par œuf ponte- et traitement-spécifique. Pour chaque génération et chaque traitement, la taille corporelle a été mesurée chez les néonates et chez les adultes aux première, troisième et cinquième pontes.

Trois régimes d'exposition ont été distingués (Tableau 12) : l'exposition embryonnaire, l'exposition post-éclosion et l'exposition continue. Dans les cas d'exposition embryonnaire (appelés F0<sub>E</sub>, F1<sub>E</sub>, ou F2<sub>E</sub>), l'exposition à l'UA a commencé avec des œufs fraîchement déposés dans la poche incubatrice des mères (< 24 h après le dépôt) et a été arrêtée après relargage, en remettant les néonates en milieu propre (< 24 h après relargage). Dans les cas d'exposition post-éclosion (appelés F0<sub>H</sub> ou F1<sub>H</sub>), les embryons dans la poche maternelle ont été gardés dans un milieu propre, l'exposition à l'UA a commencé avec des néonates fraîchement relargués (< 24 h après relargage) et a été maintenue jusqu'à la production de la cinquième ponte. Dans les cas d'exposition continue (F0<sub>C</sub>, F1<sub>C</sub>, ou F2<sub>C</sub>), l'exposition à l'UA a commencé avec des œufs fraîchement déposés dans la poche incubatrice des mères (< 24 h après le dépôt) et a été maintenue après le relargage jusqu'à la production de la cinquième ponte.

*Tableau 12 - Liste de jeux de données, succession des régimes d'exposition et utilisation pour la modélisation. Exposition post-éclosion signifie que les organismes sont exposés depuis le stade néonate, exposition continue signifie que les organismes sont exposés depuis le début du stade embryonnaire jusqu'à la fin de l'expérimentation, exposition embryonnaire signifie que les organismes ne sont exposés qu'au stade embryonnaire avant d'être remis en condition témoin.*

Source	Description	Régime(s) d'exposition	Utilisation
Massarin et al., 2010	Exposition post-éclosion en F0	F0 <sub>H</sub>	Calibration
	Exposition continue en F1	F0 <sub>H</sub> → F1 <sub>C</sub>	Calibration
	Exposition continue en F2	F0 <sub>H</sub> → F1 <sub>C</sub> → F2 <sub>C</sub>	Calibration
	Exposition embryonnaire en F1	F0 <sub>H</sub> → F1 <sub>E</sub>	Validation
	Exposition embryonnaire en F2	F0 <sub>H</sub> → F1 <sub>C</sub> → F2 <sub>E</sub>	Validation
Plaire et al., 2013	Exposition continue en F0	F0 <sub>C</sub>	Calibration
	Exposition continue en F1	F0 <sub>C</sub> → F1 <sub>C</sub>	Calibration
	Exposition embryonnaire en F0	F0 <sub>E</sub>	Validation
	Exposition embryonnaire en F1	F0 <sub>E</sub> → F1 <sub>E</sub>	Validation
	Exposition post-éclosion en F0	F0 <sub>H</sub>	Validation
	Exposition post-éclosion en F1	F0 <sub>H</sub> → F1 <sub>H</sub>	Validation

### Description du modèle mécaniste

En accord avec de précédentes études (Massarin et al., 2011, Augustine et al., 2012, Goussen et al., 2015a) nous sommes partis d'un modèle DEBtox considérant que l'exposition à l'UA induit une réduction de l'assimilation, en fonction de la concentration interne  $C_i$ . Ensuite, pour tester si un dommage transgénérationnel peut expliquer l'augmentation observée des effets de l'UA au cours des générations, nous avons introduit un dommage  $D$ , qui agit au travers d'un second mode d'action physiologique et qui est transmis d'une génération à la suivante. Comme proposé dans les modèles DEBtox (Kooijman et Bedaux, 1996, Jager et Zimmer, 2012, Jager, 2020), la concentration interne et le niveau de dommage normalisés (notés  $C_i^*$  et  $D^*$  et ayant la même unité que l'UA dans l'eau) sont décrits par des modèles à un compartiment régis par des cinétiques de premier ordre. Sur cette base, la cinétique de  $C_i^*$  est donnée par l'équation TK classique, incluant un terme de dilution par la croissance :

$$\frac{dC_i^*}{dt} = \frac{\dot{k}_e}{l} (C_w - C_i^*) - C_i^* \frac{3 dl}{l dt} \quad (\text{Equation 6.3.1})$$

où  $\dot{k}_e$  ( $d^{-1}$ ) est le taux d'élimination surface-spécifique,  $C_w$  ( $\mu g L^{-1}$ ) la concentration d'exposition dans l'eau et  $l$  (-) la taille structurelle normalisée, c'est-à-dire divisée par la taille structurelle maximale  $L_m$  (mm).

Deux possibles modèles TK ont été considérés pour la cinétique de  $D^*$ . Le premier est un modèle TK « réduit », qui, comme pour  $C_i^*$ , relie l'accumulation du niveau de dommage ( $D^*$ ) à la concentration en UA dans l'eau ( $C_w$ ) directement :

$$\frac{dD^*}{dt} = \dot{k}_d (C_w - D^*) \quad (\text{Equation 6.3.2a})$$

avec  $\dot{k}_d$  ( $d^{-1}$ ) le taux dominant. L'utilisation d'un modèle réduit est recommandée dans les cas où l'on ne dispose pas de mesures de concentration interne au cours du temps (Jager, 2020). Cependant, nous avons pressenti que les données d'effets observés sur plusieurs générations successives pourraient être suffisamment informatives pour calibrer un second modèle TK « complet », qui relie l'accumulation des dommages à la concentration interne normalisée  $C_i^*$ :

$$\frac{dD^*}{dt} = \dot{k}_r (C_i^* - D^*) \quad (\text{Equation 6.3.2b})$$

avec  $\dot{k}_r$  ( $d^{-1}$ ) le taux de réparation des dommages. Comme recommandé dans (Jager, 2020), nous avons supposé que la mise à l'échelle surface:volume et la dilution par la croissance ne sont pas pertinents pour une forme abstraite de dommage accumulé.

Les changements de  $C_i^*$  et  $D^*$  sont simulés au cours du cycle de vie des organismes, y compris le stade embryon. Pour cela, toutes les générations sont initiées dans le modèle au moment du dépôt des œufs (temps  $t_E$ ), comme suit :

$$\text{- En génération } F_0 : \quad \begin{cases} C_i^*(F_0, t_E) = 0 \\ D^*(F_0, t_E) = 0 \end{cases} \quad (\text{Equation 6.3.3a})$$

$$\text{- Dans les générations suivantes } F_n : \quad \begin{cases} C_i^*(F_n, t_E) = C_i^*(F_{n-1}, t_F) \\ D^*(F_n, t_E) = D^*(F_{n-1}, t_F) \end{cases} \quad (\text{Equation 6.3.3b})$$

où  $t_F$  est l'âge des femelles au moment du dépôt des œufs et les niveaux de  $C_i^*$  et  $D^*$  sont transmis de la génération  $F_{n-1}$  à la génération  $F_n$ . Chez *D. magna*, les œufs sont déposés trois jours avant l'éclosion, donc  $t_E = -3$  jours (si l'on considère que le temps 0 correspond à l'éclosion).

Les deux facteurs de stress,  $C_i^*$  et  $D^*$  sont supposés agir indépendamment *via* deux fonctions de stress  $s_1$  et  $s_2$ , calculées par les équations ci-dessous :

$$\begin{cases} s_1 = b_1 \cdot \max(0, C_i^* - z_1) \\ s_2 = b_2 \cdot \max(0, D^* - z_2) \end{cases} \quad (\text{Equation 6.3.4})$$

avec  $b_1$  et  $b_2$  ( $\mu\text{g}^{-1}\text{L}$ ) les pentes des fonctions de stress et  $z_1$  et  $z_2$  les concentrations seuils à partir desquelles chaque mode d'action physiologique est amorcé.

Pour l'identification du mode d'action associé au dommage transgénérationnel  $D^*$ , nous rappelons que à la fois les effets sur la reproduction et ceux sur la croissance augmentent en intensité au cours des générations (Massarin et al., 2010, Plaire et al., 2013). Cela suggère que trois des cinq modes d'action proposés par la modélisation DEBtox peuvent être de bons candidats : *Assimilation model* (réduction de l'assimilation), *Maintenance model* (augmentation des coûts de maintenance somatique et de la maturité) et *Growth model* (augmentation des coûts de croissance et de maturation). Les deux autres sont éliminés car ils n'induisent des effets que sur la reproduction : le *Hazard model* (augmentation de la mortalité durant l'ovogénèse) et *Cost model* (augmentation du coût de production d'un œuf). En conséquence, trois combinaisons de modes d'action ont été testées : *Assimilation-Growth*, *Assimilation-Maintenance* et *Assimilation-Assimilation*.

Des jeux d'équations adaptés à chaque combinaison de modes d'action ont été implémentés pour décrire la taille structurelle normalisée  $l$  (-) et le taux de reproduction  $\dot{R}$  ( $\mu\text{g dw d}^{-1}$ ) en fonction du temps et de la concentration d'exposition. Ces équations diffèrent dans la manière dont les fonctions de stress  $s_1$  et  $s_2$  sont impliquées. Les exemples suivants illustrent la combinaison *Assimilation-Growth*, les autres sont détaillées dans Alonzo et al. (submitted).

$$\frac{dl}{dt} = \dot{r}_B \frac{f + g}{f(1 - s_1) + g(1 + s_2)} (f(1 - s_1) - l) \quad (\text{Equation 6.3.5})$$

$$\dot{R}(l \geq l_p) = \frac{\dot{R}_m}{1 - l_p^3} \left[ f(1 - s_1) l^2 \left( \frac{g(1 + s_2) + l}{g(1 + s_2) + f(1 - s_1)} \right) - l_p^3 \right] \quad (\text{Equation 6.3.6})$$

avec  $l(t \leq 0) = l_b$  et  $\dot{R}(l < l_p) = 0$ , et où  $\dot{r}_B$  ( $\text{d}^{-1}$ ) est le taux de croissance de Von Bertalanffy,  $f$  (-) la réponse fonctionnelle normalisée de l'ingestion,  $g$  (-) le ratio d'investissement énergétique,  $\dot{R}_m$  ( $\mu\text{g dw d}^{-1}$ ) le taux de reproduction maximum et  $l_b$  et  $l_p$  (-) les tailles structurelles normalisées à la naissance et à la puberté. Nous avons supposé qu'il n'y a pas de croissance au stade embryon ( $\frac{dl}{dt} = 0$  quand  $t \leq 0$ ), car la masse sèche des œufs n'est pas significativement différente entre le dépôt dans la poche incubatrice et l'éclosion (Massarin et al., 2010, Plaire et al., 2013).

### Modèle d'erreur et inférence Bayésienne

Comme dans l'étude précédente (Partie 6.2), l'estimation des paramètres a été réalisée par inférence Bayésienne, avec le logiciel R (3.6.3), le package R rjags (4.10) et les algorithmes implémentés dans JAGS (4.3.0) (R Core Team, 2020, Plummer, 2010). Différents modèles d'erreur sont utilisés pour relier les données observées aux prédictions du modèle : une distribution Normale avec un paramètre de précision  $\tau_{\sigma}$  (inverse de la variance) pour la croissance (taille corporelle), une distribution Négative Binomiale avec un paramètre de dispersion  $p_R$  pour la reproduction (masse sèche cumulée d'œufs). Une partie des données expérimentales est utilisée pour la calibration du modèle, autrement dit pour l'estimation des paramètres, tandis qu'une autre partie est réservée à l'évaluation de la capacité prédictive du modèle calibré, comme détaillé en Tableau 12.

Tous les paramètres sont estimés conjointement. Les paramètres des équations de croissance et de reproduction ( $\dot{r}_B$ ,  $L_m$ ,  $l_p$  et  $\dot{R}_m$ ) (Equations 6.3.5 et 6.3.6) sont génération- et expérimentation-spécifiques, pour tenir compte d'éventuelles différences dans les conditions environnementales. Les paramètres TKTD ( $\dot{k}_e$ ,  $\dot{k}_d$  ou  $\dot{k}_r$ ,  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $z_1$  et  $z_2$ ) sont communs à toutes les générations et expérimentations. Plusieurs paramètres ont été fixés : le ratio d'investissement énergétique  $g$ , fixé à 1 en accord avec de précédentes analyses DEBtox chez *D. magna* (Billoir et al., 2008, Massarin et al., 2011), la réponse fonctionnelle normalisée de l'ingestion  $f$ , fixée à 1 car les daphnies sont nourries *ad libitum*, et les tailles structurales à la naissance  $L_b$ , fixées aux moyennes des observations à chaque concentration dans chaque génération.

Les détails de mise en œuvre de l'inférence Bayésienne sont décrits dans Alonzo et al. (submitted). Six modèles (deux modèles TK \* trois modes d'action) sont comparés au moyen du Deviance Information Criterion (DIC) (Spiegelhalter et al., 2002) qui traduit la qualité d'ajustement.

### 6.3.3 Résultats

#### Sélection de modèles, qualité d'ajustement et capacité prédictive

La comparaison des DIC suggère qu'un modèle TK « complet » avec une combinaison de modes d'action *Assimilation-Growth* donne une meilleure qualité d'ajustement que les autres variantes testées. Ce résultat indique donc que les données d'effets observés sur plusieurs générations ont été suffisamment informatives pour calibrer un modèle DEBtox avec un modèle TK complexe et que les dommages transgénérationnels induisent vraisemblablement une augmentation des coûts de croissance et de maturation.

Le modèle DEBtox sélectionné (TK complet et *Assimilation-Growth*) décrit correctement les effets de l'UA sur la croissance et la reproduction, aux différentes concentrations d'exposition et au cours des trois générations successives. Les prédictions du modèle s'ajustent particulièrement bien aux données utilisées pour la calibration (Figure 36).

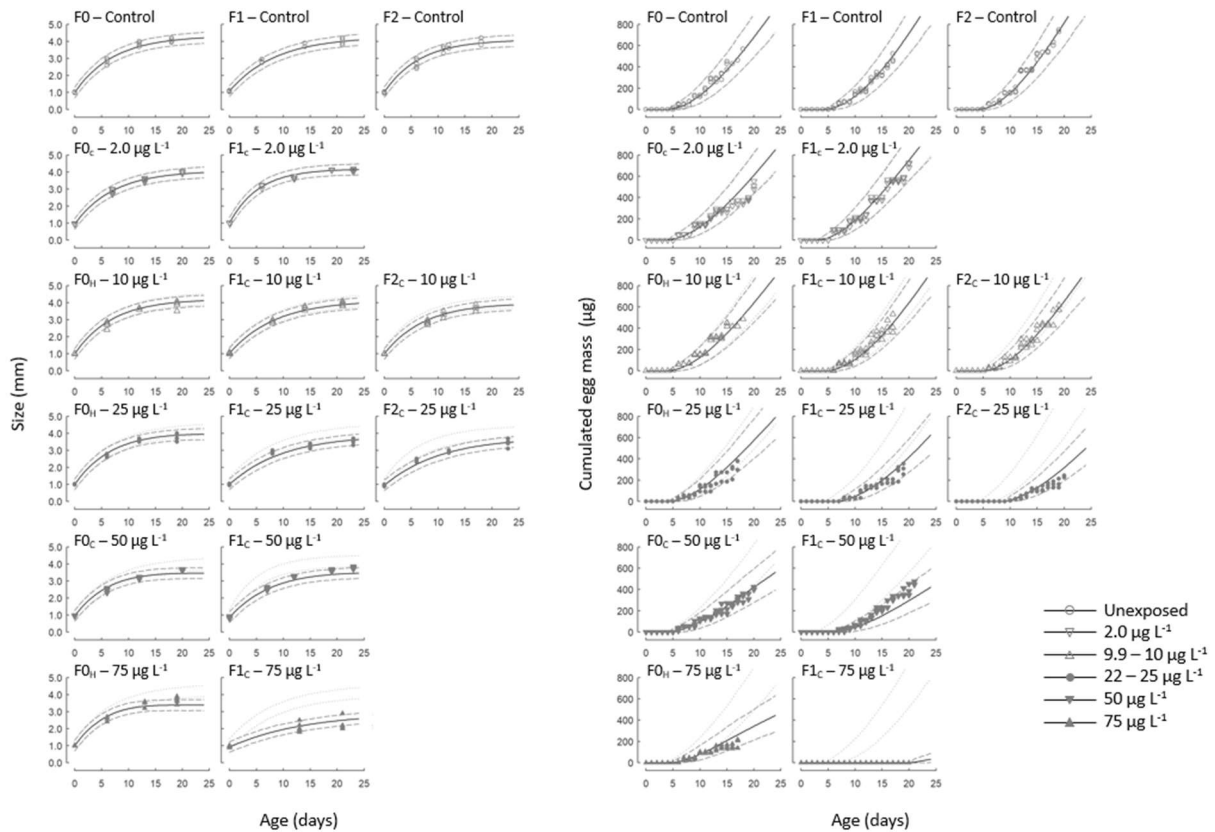


Figure 36 - Résultats de la calibration du modèle : meilleurs ajustements, obtenus avec le modèle TK complet et la combinaison de modes d'actions *Assimilation-Growth* pour décrire les effets observés de l'UA sur la croissance et la reproduction de *D. magna*. Les symboles représentent les données expérimentales, les lignes pleines et pointillées représentent les prédictions du modèle (médianes et IC à 95%). Les lignes en gris clair rappellent le modèle en condition témoin pour comparaison. Des graphes pour davantage de traitements sont disponibles dans Alonzo et al., submitted.

Les prédictions du modèle sont aussi en bonne adéquation avec les données utilisées pour la validation (Figure 37). Le modèle produit des prédictions pertinentes pour les régimes d'exposition post-éclosion indicés H (Figure 37, trois lignes du bas). Les effets prédits sont légèrement sous-estimés quand les individus ne sont exposés qu'au stade embryonnaire, situations indicées E (Figure 37, trois lignes du haut).

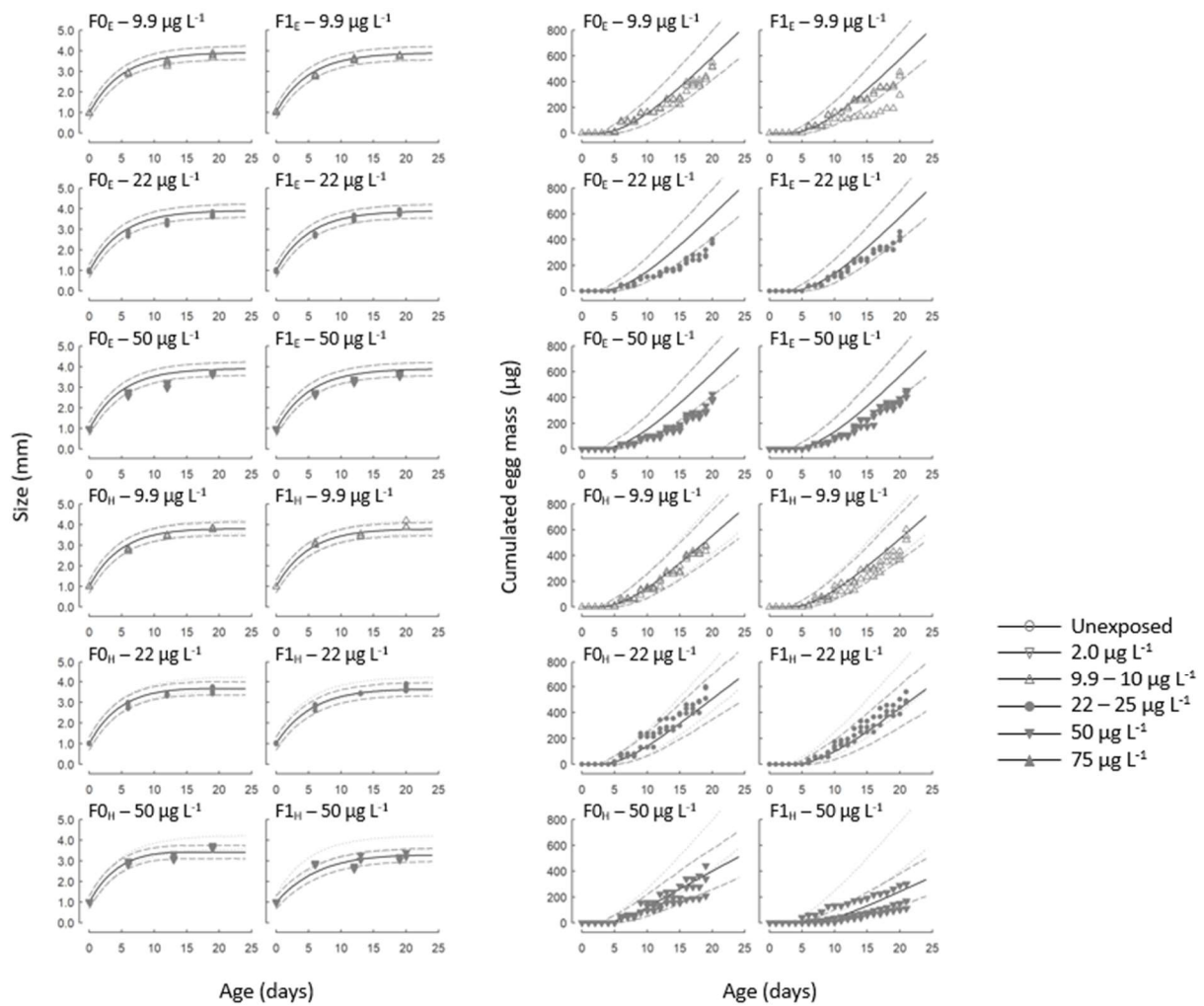


Figure 37 - Résultats de la validation du modèle : adéquation entre les prédictions effectuées avec le modèle TK complet et la combinaison de modes d'actions Assimilation-Growth et les effets observés de l'UA sur la croissance et la reproduction de *D. magna*. Les symboles représentent les données expérimentales, qui n'ont pas été utilisées pour la calibration du modèle. Les lignes pleines et pointillées représentent les prédictions du modèle (médianes et IC à 95%). Les lignes en gris clair rappellent le modèle en condition témoin pour comparaison. Des graphes pour davantage de traitements sont disponibles dans Alonzo et al., submitted.



## Toxicocinétique et toxicodynamique transgénérationnelles

L'estimation du paramètre  $\dot{k}_e$  dans un intervalle de crédibilité (IC) à 95% de 0.091-0.104 d<sup>-1</sup> indique que la réduction de l'assimilation est régie par une cinétique relativement rapide (Figure 38, partie haute). La concentration interne normalisée  $C_i^*$ , sous exposition prolongée à l'UA, peut quasiment atteindre un état d'équilibre (i.e.  $C_i^*$  à son maximum) en une génération. En conséquence, les générations F1 et F2 partent du même niveau. Notons toutefois que la cinétique est fortement ralentie du fait de la dilution par la croissance, cela est particulièrement notable chez les juvéniles (Figure 38, en haut à gauche). Aux plus fortes concentrations, l'assimilation est fortement réduite (*via* la fonction de stress  $s_1$ ) à la fin des générations F0 et F1, d'environ 25% et 15% respectivement à 75 et 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Figure 38, en haut à droite).

L'estimation du taux de réparation des dommages  $\dot{k}_r$  dans un IC à 95% de 0.006-0.008 d<sup>-1</sup> indique que l'augmentation des coûts de croissance et de maturation est régie par une cinétique très lente (Figure 38, partie basse). Le niveau de dommage normalisé  $D^*$ , sous exposition prolongée à l'UA durant trois générations, n'atteint que 20% de son maximum. Par conséquent le niveau de dommage  $D^*$  augmente constamment au cours des trois générations, et ne diminue que très doucement en cas de dépuración en milieu propre (Figure 38, en bas à gauche). Aux plus fortes concentrations, les coûts pour la croissance et la maturation sont multipliés (*via* la fonction de stress  $s_2$ ), en génération F1, par un facteur 5.5 et 3.5 respectivement à 75 et 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ , et en génération F2, par un facteur 3 à 25  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Figure 38, en bas à droite).

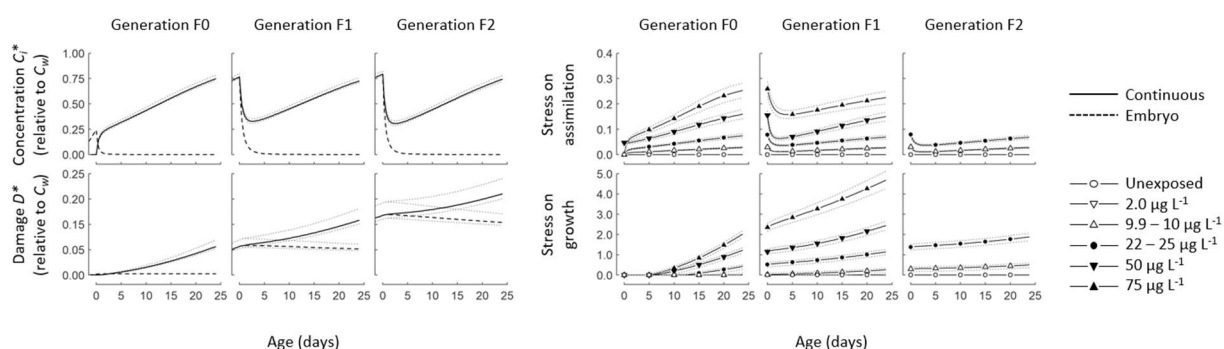


Figure 38 – Variations de la concentration interne et du niveau de dommage normalisés au cours du temps chez *D. magna* exposée à différents régimes d'exposition : exposition continue (lignes pleines) ou exposition uniquement au stade embryonnaire puis remise en milieu témoin (lignes pointillées). Variations des intensités de stress sur l'assimilation et sur les coûts de croissance et de maturation au cours du temps, selon une exposition continue et un modèle TK complet. Les lignes pleines et les symboles représentent les prédictions médianes du modèle, les lignes pointillées les IC à 95%.



### 6.3.4 Discussion

Les précédentes tentatives de modélisation DEBtox de la toxicité de l'UA chez *D. magna* (Massarin et al., 2011, Biron et al., 2012), considérant chaque génération séparément, montrent que des coefficients d'intensité de plus en plus élevés pouvaient expliquer des effets accrus de génération en génération. Cette approche nécessite l'estimation de paramètre TKTD pour chaque nouvelle génération. Le modèle présenté ici introduit un dommage transgénérationnel, et définit des paramètres TKTD communs à toutes les générations. La méthode apparaît adéquate pour des prédictions dans tout type de scénario, y compris des générations et des régimes d'exposition non testés.

La présente étude estime  $\dot{k}_e$  à une valeur de 0.094 d<sup>-1</sup> pour la concentration interne, ce qui implique que la cinétique de l'UA est suffisamment rapide pour causer une réduction de l'assimilation rapidement après le début de l'exposition. La cinétique estimée est cohérente avec les récentes mesures d'UA dans les tissus et la cuticule des daphnies (Scheibener et al., 2021), concluant à une absorption rapide avec un taux de dépuraction ( $\pm$  équivalent  $\dot{k}_e$  sans dilution par la croissance) de 0.75 d<sup>-1</sup>. La cinétique estimée implique également que les effets sur l'assimilation devraient avoir des niveaux similaires en générations F1 et F2, puisque la concentration interne a atteint un équilibre. Ce résultat contraste avec les analyses DEBtox de Massarin et al. (2011), et Biron et al. (2012) (Partie 6.2), qui imputent l'augmentation des effets de l'UA de F1 à F2 entièrement à une assimilation diminuée.

La présente étude estime le taux de réparation des dommages  $\dot{k}_r$  à une valeur de 0.007 d<sup>-1</sup>, suggérant que les effets de l'UA sur les coûts de croissance et de maturation est la clé pour comprendre la réponse à long terme de *D. magna* face à une exposition multigénérationnelle. Le niveau de dommage normalisé n'atteint que 20 à 25 % de son niveau maximum à la fin de la génération F2. Si nos valeurs de  $\dot{k}_r$  et  $z_2$  sont correctes, on peut donc s'attendre à une augmentation du niveau de dommage au cours d'expositions excédant trois générations, avec des conséquences sur la croissance et la reproduction, même à des concentrations d'exposition faibles, car la concentration seuil  $z_2$  est estimée à 0.71 [0.44 – 1.11] µg L<sup>-1</sup>.

L'exposition au stade embryonnaire a pour résultat une toxicité augmentée de l'UA pour la croissance et la reproduction des daphnies. Cela a d'importantes implications pour l'interprétation de précédents résultats expérimentaux et de précédentes modélisations DEBtox. En effet, cela invalide l'hypothèse selon laquelle l'intensité des effets peut être directement reliée à la concentration en UA dans l'eau, suggérant au contraire que l'UA peut être internalisé, et un dommage accumulé dès le développement embryonnaire, avec une cinétique suffisamment lente pour affecter la croissance et la reproduction après l'éclosion. Ce nouveau modèle propose une manière simple de considérer l'exposition embryonnaire, comme une partie du modèle TK, sans introduire de paramètres supplémentaires. L'influence du stade embryonnaire est mécaniquement expliquée *via* les changements en termes de concentration interne et de dommage durant les trois jours avant l'éclosion. De plus, cette influence de l'exposition des œufs reste visible longtemps après une remise en milieu propre, appuyant la plausibilité qu'un dommage avec une cinétique lente soit impliqué.

## 6.4 Bilan et perspectives

### Bilan

La première étude de cette partie sur la modélisation mécaniste reprend une idée qui n'est pas neuve : coupler des modèles TKTD et des modèles de dynamique des populations (Lopes et al., 2005, Klanjscek et al., 2006, Billoir et al., 2007). L'originalité tient ici à l'intégration de données multigénérationnelles. Nos résultats suggèrent que les projections à l'échelle de la population peuvent être trompeuses si les aspects multigénérationnels sont ignorés. De plus, nos résultats montrent que la dynamique de population ne peut pas être simplifiée à celle de la génération la plus sensible, cette dernière n'étant pas toujours atteinte, compte tenu de l'incertitude.

La proposition d'un modèle DEBtox avec un compartiment de dommage transgénérationnel est ensuite avancée pour analyser les effets toxiques sublétaux au cours de générations successives. Le modèle intègre l'influence de l'exposition au stade embryonnaire, pour correctement décrire les différents régimes d'exposition pris en compte. Ainsi, ce cadre de modélisation a permis d'estimer, dans notre cas d'étude, les contributions aux effets observés de la concentration internalisée et du niveau de dommage transmis des mères à leur progéniture, *via* deux modes d'action physiologiques distincts.

### Remarques

Les modèles matriciels de population, dans leur version où les taux vitaux (taux de survie, taux de fécondité) sont constants, se basent sur des hypothèses ostensiblement fausses. Et pourtant, ils permettent d'atteindre l'objectif, l'échelle de la population. Ils illustrent parfaitement la célèbre maxime "*All models are wrong but some are useful*" attribué à George Box. Leur apparente simplicité et leur aspect ludique sont de gros atouts en leur faveur.

Les modèles TKTD, et en particulier les modèles DEBtox, sont quant à eux d'une toute autre complexité à prime abord. Ils reposent eux aussi sur des hypothèses qui sont simplistes (et critiquables), mais le grand nombre d'hypothèses, leur articulation et la formalisation de variables « abstraites » aboutit à un tout compliqué. Le grand nombre de paramètres qu'il faut estimer peut laisser penser que ces modèles sont parfois trop compliqués (sur-paramétrés) par rapport aux données disponibles pour les calibrer. L'application transgénérationnelle met en valeur l'utilité des concepts de niveau de dommage et de niveau de stress. Le fait de mettre le modèle à l'épreuve de la prédiction sur une partie réservée du jeu de données est un garde-fou rassurant.

Les deux types de modèles peuvent être qualifiés de mécanistes, même s'ils décrivent des mécanismes très différents : le parcours d'un cycle de vie dans le cas des modèles de dynamique de population, et des mécanismes biophysiques et bioénergétiques dans le cas des modèles DEBtox.

### Perspectives

D'un point de vue modélisation, maintenant que le modèle DEBtox pour *D. magna* exposée à l'uranium appauvri a été perfectionné, une perspective à court terme est de reprendre l'étape de projection à l'échelle de la population. Le fait que ce nouveau modèle ne soit pas génération-spécifique permet d'envisager une

extrapolation des effets à l'échelle des organismes au-delà de trois générations, en suivant les trajectoires pré-dessinées ou en testant d'autres scénarios. Cela est prévu dans le cadre du projet DEB-RAD, qui n'est pas terminé. Il nous reste également à finaliser la même démarche (DEBtox transgénérationnel + modèle de dynamique des populations) pour les deux autres radionucléides étudiés (césium-137 et américium-241). D'un point de vue biologique, les mécanismes de transmission des dommages d'une génération à la suivante restent à approfondir.

Une autre perspective, que je détaillerai dans la partie projet (Partie 8), ambitionne de mettre en vis-à-vis le(s) mode(s) d'action physiologique(s), mis en évidence par une analyse DEBtox des traits d'histoire de vie de *D. magna* exposée à un phtalate, et les mode(s) d'action identifiables à des échelles sub-individuelles, par des analyses transcriptomiques non ciblées. C'est le thème du projet ANR JCJC Chroco que je mène depuis 2022.

Enfin, une perspective qui s'éloigne du modèle daphnie : nous souhaitons développer, avec mon collègue Martin Laviale au LIEC et avec des collaboratrices du LEFE à Toulouse (Joséphine Leflaive, Stéphanie Boulêtreau, et Camille Courcoul) des modèles TKTD pour décrire et prédire les effets, au cours du temps, de stress thermiques (canicules) sur les communautés de biofilms aquatiques. L'internalisation de la température n'a pas de sens (surtout pour des microorganismes), mais le concept de niveau de dommage et son augmentation (ou sa diminution) due à l'exposition prolongée (ou levée) à températures élevées (sub-optimales), peuvent être formalisés dans un modèle TK. Les conséquences en termes de fonctionnalité (capacité photosynthétique dans le cas de nos biofilms) des microorganismes sont ensuite l'objet d'un modèle TD, dépendant du niveau de dommage accumulé. Les premiers essais de modélisation effectués sont encourageants.

## 7 Discussion générale

### Complexité des données, des modèles et parcimonie

Dans cette HDR sont présentés des modèles mathématiques de plus en plus complexes, tandis que les jeux de données associés vont eux plutôt dans un sens de complexité inverse. En résumé : à jeu de données complexe, modèle simple, à jeu de données simple, modèle complexe.

Dans le Chapitre 3, les données sont d'une grande complexité, en termes de taille des jeux de données, de nature des données (abondance des taxons, traits des taxons, etc.) et surtout de contexte d'acquisition : dans les études de terrain, au contraire d'un plan d'expérience scientifique classique, de nombreux facteurs environnementaux ne sont pas contrôlés, et les données sont inévitablement empreintes d'une grande variabilité. Dans ce contexte, des modèles descriptifs « basiques » de la famille des modèles linéaires (*community weighted means* et méthodes d'ordination en Partie 3.2, régressions linéaires en Partie 3.3) ont été utilisés pour établir ou explorer des tendances vis-à-vis d'un ou deux facteurs de stress d'intérêt particulier (concentration en phosphore, température). L'idée est de voir si malgré la diversité des situations écologiques et la variabilité des données, des relations peuvent être observées. Selon le principe de parcimonie, il est donc logique de commencer par des relations linéaires, les plus simples possible. A l'échelle des communautés et des écosystèmes, le développement de modèles mécanistes est une tâche ardue, tant les processus à intégrer sont nombreux et difficiles à hiérarchiser (McFadden et al., 2023).

Dans les Chapitres 4 et 5, les jeux de données sont d'une complexité moindre dans la mesure où ils sont issus de bioessais de toxicité en laboratoire. Néanmoins, dans les deux cas, le nombre de traits/items est tel qu'il serait impossible de procéder à une inspection complète des données, c'est pourquoi nous avons développé des approches systématisées. Dans ces deux chapitres sont mobilisés des modèles descriptifs non-linéaires décrivant des relations dose-réponse. La modélisation dose-réponse est un des outils de base des écotoxicologues : ici ce cadre de modélisation a été élargi, *via* un modèle hiérarchique incluant des hypothèses mécanistes dans le Chapitre 4, *via* la diversification des formes de réponse dans le Chapitre 5. Les choix des meilleurs modèles reposent sur le principe de parcimonie.

Dans le Chapitre 6, le nombre de traits d'histoire de vie considérés est limité, il est donc possible de représenter toutes les données pour les observer. Les plans expérimentaux couvrent plusieurs générations successives et plusieurs régimes d'exposition, une richesse d'information exploitée par des approches de modélisation mécaniste. Les modèles de dynamique des populations reposent sur une schématisation du cycle de vie des organismes. Les modèles DEBtox décrivent, à l'échelle des organismes, et sur la base de nombreuses hypothèses bio-physico-chimiques, les perturbations engendrées par un contaminant en termes d'énergie allouée aux fonctions métaboliques majeures que sont la survie, la croissance et la reproduction. Dans notre démarche de modélisation mécaniste, les questions posées sont : si on accepte d'assumer toutes ses hypothèses, notre modèle DEBtox est-il capable de décrire et de prédire les observations ? Quels sont les impacts de l'exposition à l'échelle de la population selon notre modèle de changement d'échelle ? Le maniement du principe de parcimonie ne porte alors que sur l'ajustement du modèle aux données, et non sur les modèles dans leur ensemble : il faut limiter le nombre de paramètres à estimer par inférence statistique, quitte à fixer certains autres paramètres.

### Des modèles au service de questions biologiques

Dans le Chapitre 3, les questions biologiques proviennent de la théorie de la stœchiométrie écologique. Les hypothèses sont construites à partir de considérations biologiques et écologiques (par exemple, le %P corporel augmente avec le taux de croissance des organismes, les taxons riches en P sont favorisés dans des environnements riches en P). C'est l'étayage réalisé avec ces hypothèses qui constitue le moteur de la réflexion scientifique, les outils d'analyse sont ensuite adaptés aux hypothèses formulées et aux données disponibles. Pour des attentes n'étant définies que qualitativement : en termes de relation pression-impact (le %P à l'échelle de la communauté devrait être plus élevé dans les sites où la concentration en P dans l'eau est élevée), ou en termes d'association (les traits liés à un développement rapide sont associés à la concentration en P dans l'eau) des modèles linéaires et des méthodes d'ordination sont des outils appropriés.

Dans le Chapitre 4, les questions biologiques s'inscrivent dans le champ de l'écotoxicologie « classique », avec l'objectif de quantifier la sensibilité des organismes, et de l'écologie, afin d'évaluer l'effet d'une interaction de compétition interspécifique. Les modèles dose-réponse non-linéaires sont les outils dédiés à l'estimation de seuils de sensibilité. Ils sont couplés en Partie 4.2 avec des modèles descriptifs de distribution des sensibilités de différentes espèces (SSD) afin d'extrapoler les résultats à l'échelle de la communauté. Dans cette partie qui ne fait « que » reproduire une démarche classique d'évaluation des risques, l'impact de la compétition apporte un intérêt éco(toxico)logique, la comparaison de différentes options aux étapes successives apporte un intérêt méthodologique. En Partie 4.3, la modélisation est déployée pour permettre de répondre finement aux questions du positionnement et de la généralité des effets de la compétition dans la réponse à un contaminant. Les outils modernes que sont les modèles hiérarchiques, la distinction de paramètres fixes ou aléatoires, et les méthodes de choix de modèles sont mis en oeuvre *ad hoc*.

Dans le Chapitre 5, les questions biologiques sont à l'intersection entre l'écotoxicologie « classique » et la biologie moléculaire. L'intérêt de la modélisation dans le Chapitre 5 est indirect. En soi, les courbes dose-réponse descriptives ne sont pas des chefs d'œuvre de modélisation. L'affaire se complique quand il faut les ajuster automatiquement pour des milliers d'items omiques aux tendances de réponse variées. Et c'est la quantité de courbes dose-réponse issues de l'approche implémentée dans DRomics, combinée avec les annotations fonctionnelles, qui servent les questions biologiques investiguées. Nous avons constamment le souci de fournir des résumés, des représentations graphiques, de manière à aider les biologistes dans l'interprétation des sorties de DRomics.

Dans le Chapitre 6, les questions biologiques relèvent de la physiologie, de l'écotoxicologie, et de l'écologie. La théorie DEB et les modèles DEBtox proposent un cadre d'interprétation des effets observés au cours du temps sur les traits d'histoire de vie des organismes. Les développements proposés visent à prolonger l'interprétation jusqu'à l'échelle de la population, et à expliquer l'amplification des effets au cours des trois générations suivies. Ils mobilisent des concepts, comme le niveau de dommage, propres aux modèles TKTD GUTS et DEBtox. Ce cadre peut être vu comme contraignant mais a l'avantage de fournir une base de travail connue et reconnue par une communauté de modélisateurs TKTD. Les extensions proposées servent spécifiquement les questions biologiques propres, en essayant de décrire, expliquer et prédire les effets transgénérationnels et leurs conséquences.

## La modélisation dans la démarche scientifique

Une démarche de modélisation oblige à formuler et formaliser des idées, et en cela contribue à notre compréhension scientifique d'un phénomène étudié. Par exemple, dans l'étude des effets couplés de l'exposition chimique et de la compétition sur les espèces des bandes enherbées (Chapitre 4), au départ du projet, les questions biologiques ne portaient que sur l'impact de la compétition en termes d'évaluation des risques chimiques (Partie 4.2). Ce sont ensuite des réflexions sur les limites de cette approche, et le dialogue entre les possibles hypothèses statistiques (comment modéliser tel paramètre ? fixe ou aléatoire ?) et leur interprétation en termes biologiques (effets communs à toutes les espèces ? ou spécifiques ?) qui ont donné une nouvelle impulsion à l'analyse des données (Partie 4.3). Autre exemple, dans l'étude des effets transgénérationnels de l'uranium appauvri chez *D. magna* (Chapitre 6), les premières tentatives de modélisation (DEBtox sans compartiment de dommage transgénérationnel) ont été une étape nécessaire pour, après réflexion, constater qu'elles n'étaient pas cohérentes avec toutes les observations, et proposer d'autres idées.

Les modèles fournissent une base pour prédire ou extrapoler des résultats, et pour orienter des mesures complémentaires. Par exemple, dans le Chapitre 3, en combinant les résultats avec des biomasses moyennes des taxons, on peut estimer la part de nutriments stockée dans le milieu aquatique ou perdue par exportation du fait de l'émergence des insectes, et ainsi extrapoler les effets de changements globaux relatifs aux nutriments sur les cycles du N et du P au-delà de l'échelle des communautés. Autre exemple, dans le Chapitre 5, sont analysées des données omiques, qui sont par définition non ciblées. Le *workflow* DRomics met en avant des mécanismes d'action potentiels, qui doivent ensuite être validés expérimentalement. C'est un exemple où la modélisation va orienter le choix de mesures ciblées complémentaires.

Je dis aux étudiants que la modélisation est un jeu d'enfant, une activité dont vous êtes le héros (pour les motiver !), mais également que la modélisation est délicate. Je m'efforce, autant que possible, de pratiquer (et de transmettre) la modélisation dans les règles de l'art, qui sont pour moi :

- 1) L'expression des intentions, des hypothèses sous-jacentes à un modèle et leur justification
- 2) La pédagogie dans la présentation du formalisme
- 3) La complète expression des détails de mise en œuvre (quelqu'un d'autre doit pouvoir retrouver les mêmes résultats). Idéalement, dans une démarche de science transparente et reproductible, il faudrait systématiquement fournir l'ensemble du script d'analyse des données.
- 4) La vérification soigneuse et critique des résultats, tant il est inévitable que des erreurs se glissent dans les lignes de codes comme partout ailleurs.
- 5) Et enfin le juste positionnement des interprétations, en gardant en tête que toute conclusion est restreinte au cadre des hypothèses.

### Une activité à part entière

La modélisation en sciences de la vie est parfois vue comme « accessoire », une petite chose en plus qui fait joli dans un projet. Dans la réalité des modélisateurs, c'est une activité à part entière, qui prend du temps. Certes l'ajustement d'un modèle linéaire peut être rapidement réalisé. En revanche, la conception de modèles *ad hoc* (hiérarchiques, mécanistes, etc.), leur implémentation et l'estimation de leurs paramètres peut occuper pendant des mois, des années. On peut remplir des thèses et des carrières entières avec des travaux de modélisation. Il est parfois difficile de trouver les moyens nécessaires à la modélisation dans les appels à projet, qui financent plus volontiers des frais de fonctionnement que des ressources humaines.

### Petite conclusion personnelle

Parmi les célèbres citations sur les statistiques, celle qui me plait le plus est attribuée à John Tukey “*The best thing about being a statistician is that you get to play in everyone's backyard.*” C'est exactement cela, j'aime travailler avec des collègues, aller jouer dans leur cour, profiter et m'imprégner de leurs connaissances dans les disciplines passionnantes que sont l'écologie et l'écotoxicologie. Je m'efforce en retour de partager ce que la modélisation peut apporter, avec une réflexion sur mesure pour chaque projet, et de former les jeunes et moins jeunes.

## 8 Projet

### Cadre

Je souhaite ici détailler un peu les perspectives adossées au projet ANR JCJC dont je suis responsable : Chroco (« Chronologie des effets et des réactions face à un stress toxique, de la réponse omique à apicale »), projet sur 4 ans de 2022 à 2026 et financé à hauteur de 283 k€. Il s'inscrit dans le cadre de collaborations avec Marie Laure Delignette-Muller (Prof. à VetAgro Sup, LBBE, Lyon), et mes collègues du LIEC Sophie Prud'homme (MCF), experte en analyse mécaniste des effets toxiques des micropolluants chez les invertébrés, du niveau transcriptomique aux traits d'histoire de vie, Vincent Felten (MCF), expert en écophysiologie des crustacés et Simon Devin, (Prof.), écologue du stress. Deux doctorants sont impliqués dans ce projet : Jérémie Ohanessian (depuis octobre 2022), financé à 100% par Chroco, et Ellis Franklin (depuis octobre 2023), financé à 50% par Chroco et à 50% par VetAgro Sup.

### Contexte

L'étude d'un gradient de concentration d'exposition est la vocation des bioessais écotoxicologiques destinés à établir des relations dose-réponse. Mais qui n'a jamais hésité sur la durée d'exposition la plus pertinente ? La temporalité est essentielle dans les processus toxicologiques : « *Time is of the essence* » comme titrent Heckmann et al. (2010). Pourtant, la plupart des études en écotoxicologie se focalisent sur des mesures effectuées à un unique temps  $t$ . Pour les effets phénotypiques, on peut se baser sur les normes (ISO, OCDE) et les usages pour définir la durée des tests aigus ou chroniques. Avec l'essor du cadre AOP (*Adverse Outcome Pathway*) (Ankley et al., 2010), de plus en plus d'approches moléculaires dites omiques sont utilisées, et la durée choisie pour observer des effets à ces niveaux est critique : les réponses observées auraient été différentes à un autre moment (Figure 39).

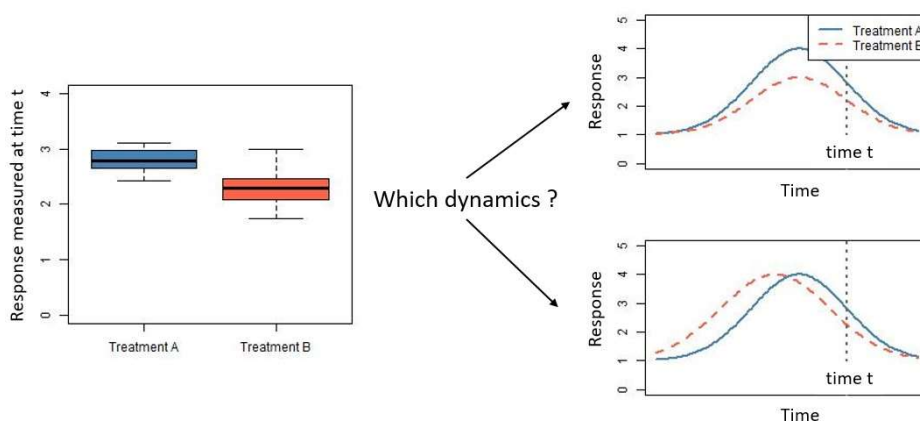


Figure 39 - Exemple d'une réponse mesurée à un temps  $t$  : une même observation ponctuelle pourrait être due à plusieurs situations. En haut : réduction de l'amplitude de réponse. En bas : changement du timing de réponse.



Le projet Chroco vise à investiguer simultanément les deux dimensions d'une exposition toxique, à savoir la concentration et le temps. Les impacts de la contamination seront caractérisés depuis le niveau moléculaire (expression des gènes) jusqu'aux effets sur la santé des organismes (survie, reproduction, etc.), avec des observations approfondies car contextualisées par l'intensité de l'exposition et sa durée. Le projet aborde les questions suivantes.

Les changements temps- et dose-dépendants du transcriptome (représentant le niveau moléculaire)

- i. peuvent-ils être reliés, en termes de mode d'action, aux effets observés sur les traits et le budget énergétique des organismes (représentant l'échelle apicale) ?
- ii. peuvent-ils être considérés comme des indicateurs précoces des dommages en termes de santé des organismes et des populations ?
- iii. démontrent-ils des capacités d'adaptation physiologique des organismes ?

Le projet Chroco s'appuie sur deux principales hypothèses.

(1) L'expression des gènes est dynamique et un temps d'observation ciblé influencera toute mesure transcriptomique/protéomique, puisque certaines voies inactives seront manquées.

(2) Au-delà des événements moléculaires directement induits par l'exposition à un contaminant, une réponse moléculaire orchestrée sera également induite pour faire face aux perturbations. Ces processus de régulation, impliqués dans la maintenance de l'homéostasie par les organismes placés dans un environnement stressant, vont s'appuyer notamment sur les voies de signalisation cellulaire qui permettent de réguler le compromis énergétique entre les principales fonctions métaboliques (croissance, reproduction, immunité, réponse globale au stress, etc.). Par conséquent, la réponse transcriptionnelle globale observée à un temps donné reflète à la fois les impacts directs du contaminant et les processus de régulation ayant pour but de maintenir ou restaurer une homéostasie physiologique globale. En particulier, on s'attend à de telles réponses pour des concentrations d'exposition modérées, tandis que les capacités de réaction des organismes seront probablement submergées à de fortes concentrations.

Le projet Chroco travaille, comme cas d'étude, sur le modèle crustacé *Daphnia magna* exposée au composé perturbateur métabolique di-n-butyle phtalate (DBP). *D. magna* est une espèce modèle en écotoxicologie, dont le génome est séquencé et dont la physiologie est bien connue. Le DBP est un ester d'acide phtalique (phtalate) utilisé comme plastifiant, et un des phtalates les plus fréquemment détectés et abondants dans les eaux de surface.

### Organisation

Le projet Chroco est organisé en trois tâches, résumées en Figure 40. Chaque tâche comprend du travail expérimental et de l'analyse de données. La Tâche 1 porte sur les effets à l'échelle apicale, la Tâche 2 sur les effets à l'échelle transcriptomique. Ces deux tâches ont pour objectif d'émettre des hypothèses quant aux mécanismes d'action du DBP, à différentes échelles. La Tâche 3 tentera d'apporter des éléments de validation.

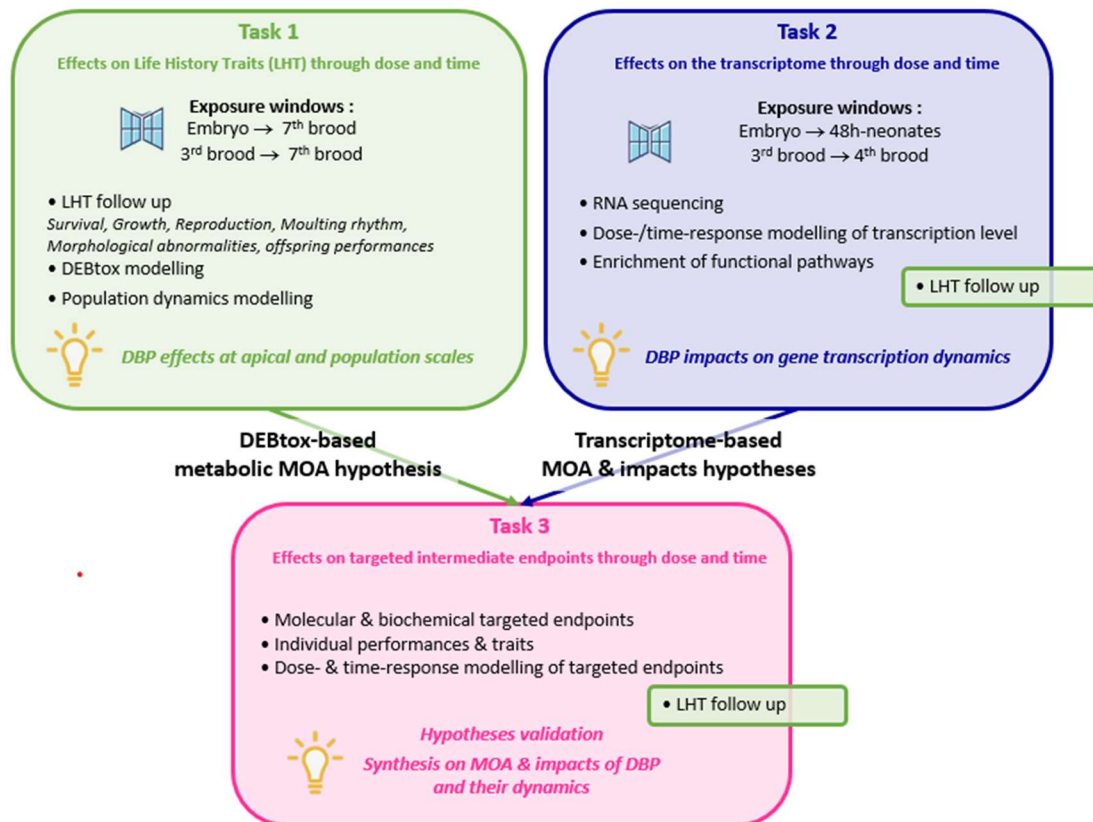


Figure 40 - Organisation du projet Chroco.

Chroco a pour objectif de disséquer la chronologie/"dosologie" des effets d'un composé perturbateur métabolique chez un modèle crustacé avec une profondeur sans précédent. Ces investigations requerront des développements en termes de modélisation, avec en particulier le challenge de construire une stratégie pour analyser finement des données omiques dose- et temps-dépendante.

### Analyse des traits d'histoire de vie

A l'échelle apicale, des outils existent pour modéliser les effets observés au cours du temps : les modèles toxicocinétiques-toxicodynamiques (TKTD). En particulier, nous utiliserons des modèles DEBtox (Kooijman et Bedaux, 1996) pour interpréter les effets sublétaux observés à l'échelle individuelle. Grâce à une description des flux d'énergie au sein d'un organisme et des perturbations métaboliques engendrées par l'internalisation d'un contaminant toxique, les modèles DEBtox considèrent les effets toxiques comme des processus dynamiques. L'approche permet d'émettre une hypothèse quant au mécanisme métabolique impliqué dans la perturbation des traits d'histoire de vie que sont la croissance et de la reproduction.

Les modèles toxicocinétiques (TK) relient la concentration internalisée au cours du temps par les organismes à la concentration d'exposition dans le milieu. Dans le cadre du projet Chroco, il est prématuré d'envisager la modélisation de ce lien, car les méthodes de dosage des phtalates dans des organismes aussi petits que des daphnies (5 mm max. à taille adulte) restent à mettre au point. Nous espérons pouvoir inférer la bioaccumulation *via* la modélisation DEBtox, à défaut nous relierons les équations TD (appelées fonctions de stress dans le cadre DEBtox) aux concentrations mesurées dans les milieux d'exposition.

## Analyse des données transcriptomiques

L'enjeu méthodologique de taille associé à ce projet Chroco est le développement de méthodes d'analyse de données omiques permettant d'étudier les relations temps-dose-réponse. Comme expliqué dans le Chapitre 5, les outils dédiés à l'analyse différentielle sont difficilement utilisables pour des résultats acquis en dose-réponse, et *a fortiori* en contexte temps-dose-réponse. Les études prenant en compte cette double dépendance des effets d'un toxique au temps et à la dose sont extrêmement rares (Aguayo-Orozco et al., 2018, Schüttler et al., 2019, Serra et al. 2020) et proposent soit une approche non intégrée basée sur l'étude des séries temporelles à quelques doses, soit une approche basée sur des modèles peu flexibles, peu susceptibles de décrire l'ensemble des réponses observables en fonction à la fois de la dose et du temps.

Nous nous appuyerons sur le package R DRomics (Larras et al., 2018) spécialement développé pour l'analyse dose-réponse de données omiques. L'intégration de la dimension temporelle au *workflow* DRomics ne concerne pas que l'étape de modélisation. En premier lieu, les tests de sélection des transcrits régulés proposés par DRomics devront être adaptés pour prendre en compte deux variables explicatives. Ensuite, pour chaque transcrit ainsi sélectionné, les modèles dose-réponse proposés par DRomics pourront, dans un premier temps, être utilisés en vue de décrire l'évolution temporelle de la sensibilité du gène et de la forme de sa réponse au gradient de dose (Figure 41). La construction de modèles temps-dose-réponse flexibles et robustes pourra être envisagée, guidée par l'observation de la diversité des réponses sur le jeu de données, comme nous l'avons fait pour construire la famille originale de modèles dose-réponse sur laquelle se base DRomics.

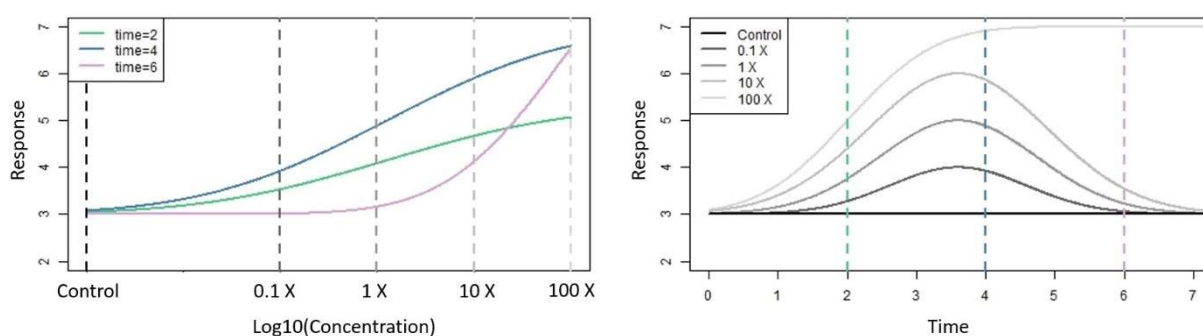


Figure 41 - Exemple de courbes dose-réponse (à gauche) à plusieurs temps d'exposition et les courbes temps-réponse correspondantes (à droite) à plusieurs doses. Cet exemple illustre un cas théorique où une réponse est induite par le contaminant à court terme (à  $t=2$  et  $t=4$ ), puis ( $t=6$ ) un mécanisme de réponse est activé, excepté à forte dose où les capacités de réactions sont dépassées.

Récemment, nous avons commencé à développer diverses fonctions pour aider à l'interprétation biologique des résultats, à la lumière d'une annotation fonctionnelle (par exemple à partir des bases de données GO - Gene Ontology - ou KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) mais il nous reste encore beaucoup à faire pour optimiser et rationaliser cette étape d'interprétation. Les méthodes modernes d'enrichissement (Wijesooriya et al., 2021, Wu et al., 2021) seront investiguées/comparées afin de choisir la méthode la plus adaptée pour prioriser les groupes de gènes dans notre contexte (temps)-dose-réponse. Les méthodes de caractérisation de la co-régulation de gènes (Langfelder et Horvath, 2008) pourront aussi être investiguées,

non pas comme à l'accoutumée avant annotation biologique, mais en aval dans le but de caractériser l'homogénéité de réponse à l'échelle de chaque groupe de gènes.

### Synthèse des résultats et validation

Les modèles DEBtox, ajustés aux données acquises dans le cadre du projet, permettront d'inférer le mode d'action métabolique probable à l'échelle des individus. Il sera intéressant de le confronter au mode(s) d'action mis en évidence à l'échelle moléculaire par la transcriptomique.

La philosophie des approches omiques est d'être non ciblée, ouvrant la voie à la découverte de mécanismes d'effets potentiellement imprévus. La méthodologie et les expérimentations de la Tâche 3 seront adaptés une fois les premiers résultats connus, dans le but d'une validation à de plus hauts niveaux d'intégration. La validation de modes d'action hypothétiques sera basée sur des mesures quantitatives de protéines et métabolites ciblées ou encore des activités d'enzymes.

Les hypothèses quant aux conséquences physiologiques et fonctionnelles de l'exposition au DBP seront validées au travers de mesures spécifiques de performance des individus. Des daphnies seront soumises, à des challenges physiologiques afin d'évaluer leur capacité à réagir face au stress toxique (par exemple au niveau de leur immunité, de la gestion de leurs ressources métaboliques, etc.).

### Plan d'expérience

Pour conclure, voici quelques détails sur l'acquisition des données transcriptomiques. Nous avons testé sept concentrations nominales en DBP : ~0, 0.5, 1, 10, 100, 280 et 500 µg/L. Les temps d'échantillonnage sont indiqués sur la Figure 42. Nous avons échantillonné les mères (pools de cinq individus) à cinq temps au sein d'un cycle de mue/reproduction, et les juvéniles (pools de 40 à 70 individus) à quatre temps successifs. L'étude de ce phtalate ubiquiste impose d'exclure tout plastique dans le matériel et de n'utiliser que de la verrerie, d'où la phase d'acclimatation « DBP-free ». Compte tenu de nos moyens logistiques, afin de constituer deux réplicats, nous avons répliqué l'expérience deux fois, en mai 2023 et juin 2023.

Les ANR extraits des 112 échantillons obtenus sont maintenant en cours de séquençage au Génomol. L'analyse des résultats devrait nous donner du grain à moudre.

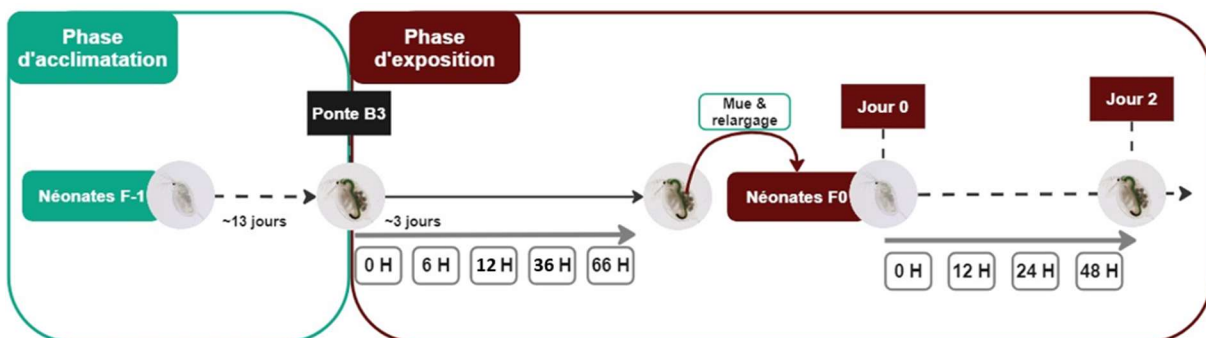


Figure 42 - Plan d'expérience pour l'étude des réponses transcriptomiques. D'après Jérémie Ohanessian.



## Références bibliographiques

- Accolla, C., Vaugeois, M., Grimm, V., Moore, A. P., Rueda-Cediel, P., Schmolke, A., & Forbes, V. E. (2021). A review of key features and their implementation in unstructured, structured, and agent-based population models for ecological risk assessment. *Integrated environmental assessment and management*, 17(3), 521-540.
- Acharya, K., Kyle, M., & Elser, J. J. (2004). Biological stoichiometry of *Daphnia* growth: an ecophysiological test of the growth rate hypothesis. *Limnology and Oceanography*, 49(3), 656-665.
- Aguayo-Orozco, A., Bois, F. Y., Brunak, S., & Taboureau, O. (2018). Analysis of time-series gene expression data to explore mechanisms of chemical-induced hepatic steatosis toxicity. *Frontiers in genetics*, 9, 396.
- Alberto, D., Couée, I., Pateyron, S., Sulmon, C., & Gouesbet, G. (2018). Low doses of triazine xenobiotics mobilize ABA and cytokinin regulations in a stress-and low-energy-dependent manner. *Plant Science*, 274, 8-22.
- Alonzo, F., Gilbin, R., Bourrachot, S., Floriani, M., Morello, M., & Garnier-Laplace, J. (2006). Effects of chronic internal alpha irradiation on physiology, growth and reproductive success of *Daphnia magna*. *Aquatic toxicology*, 80(3), 228-236.
- Alonzo, F., Gilbin, R., Zeman, F. A., & Garnier-Laplace, J. (2008). Increased effects of internal alpha irradiation in *Daphnia magna* after chronic exposure over three successive generations. *Aquatic toxicology*, 87(3), 146-156.
- Alonzo, F., Trijau, M., Plaire, S., Billoir, E. (submitted) A toxicokinetic–toxicodynamic model with a transgenerational damage to explain toxicity changes over generations (in *Daphnia magna* exposed to depleted uranium), submitted to *Science of the total environment*.
- Alonzo, F. (2019). Etude mécaniste et multi-échelle de la toxicité des radionucléides : Approches expérimentales et modélisation. Mémoire d'HDR de l'Université Aix-Marseille.
- Andersen, M. E., Pendse, S. N., Black, M. B., & McMullen, P. D. (2018). Application of transcriptomic data, visualization tools and bioinformatics resources for informing mode of action. *Current Opinion in Toxicology*, 9, 21-27.
- Ankley, G. T., Bennett, R. S., Erickson, R. J., Hoff, D. J., Hornung, M. W., Johnson, R. D., ... & Villeneuve, D. L. (2010). Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 29(3), 730-741.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., ... & Sherlock, G. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nature genetics*, 25(1), 25-29.
- Arts, G. H., Belgers, J. D. M., Hoekzema, C. H., & Thissen, J. T. (2008). Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests. *Environmental Pollution*, 153(1), 199-206.
- Augustine, S., Gagnaire, B., Adam-Guillermin, C., & Kooijman, S. A. L. M. (2012). Effects of uranium on the metabolism of zebrafish, *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology*, 118, 9-26.
- Baas, J., Jager, T., & Kooijman, B. (2010). A review of DEB theory in assessing toxic effects of mixtures. *Science of the Total Environment*, 408(18), 3740-3745.
- Back, J. A., & King, R. S. (2013). Sex and size matter: ontogenetic patterns of nutrient content of aquatic insects. *Freshwater Science*, 32(3), 837-848.
- Baillard, V., Sulmon, C., Bittebiere, A. K., Mony, C., Couée, I., Gouesbet, G., ... & Billoir, E. (2020). Effect of interspecific competition on species sensitivity distribution models: Analysis of plant responses to chemical stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 200, 110722.
- Baillard, V., Delignette-Muller, M. L., Sulmon, C., Bittebiere, A. K., Mony, C., Couée, I., ... & Billoir, E. (2021). How does interspecific competition modify the response of grass plants against herbicide treatment? A hierarchical concentration-response approach. *Science of the Total Environment*, 778, 146108.

- Baillard, V. (2021). Modélisation de Distribution de Sensibilité des Espèces pour la protection des communautés. Thèse de Doctorat de l'Université de Lorraine.
- Bartrons, M., Sardans, J., Hoekman, D., & Peñuelas, J. (2018). Trophic transfer from aquatic to terrestrial ecosystems: a test of the biogeochemical niche hypothesis. *Ecosphere*, 9(7), e02338.
- Battye, W., Aneja, V. P., & Schlesinger, W. H. (2017). Is nitrogen the next carbon? *Earth's future*, 5(9), 894-904.
- Beale, D. J., Karpe, A. V., Ahmed, W., Cook, S., Morrison, P. D., Staley, C., ... & Palombo, E. A. (2017). A community multi-omics approach towards the assessment of surface water quality in an urban river system. *International journal of environmental research and public health*, 14(3), 303.
- Beauvais-Fluck, R., Slaveykova, V. I., & Cosio, C. (2016). Transcriptomic and physiological responses of the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* during short-term exposure to subnanomolar methylmercury concentrations. *Environmental Science & Technology*, 50(13), 7126-7134.
- Beck, M., Mondy, C. P., Danger, M., Billoir, E., & Usseglio-Polatera, P. (2021). Extending the growth rate hypothesis to species development: Can stoichiometric traits help to explain the composition of macroinvertebrate communities? *Oikos*, 130(6), 879-892.
- Beck, M., Billoir, E., Felten, V., Meyer, A., Usseglio-Polatera, P., & Danger, M. (2022). A database of West European headwater macroinvertebrate stoichiometric traits. *Global Ecology and Biogeography*, 31(1), 4-9.
- Beck, M., Billoir, E., Felten, V., Meyer, A., Usseglio-Polatera, P., & Danger, M. (2022). Lessons from linking bio- and ecological traits to stoichiometric traits in stream macroinvertebrates. *Ecology and Evolution*, 12(12), e9605.
- Beck, M., Billoir, E., Flourey, M., Usseglio-Polatera, P., & Danger, M. (2023). A 34-year survey under phosphorus decline and warming: Consequences on stoichiometry and functional trait composition of freshwater macroinvertebrate communities. *Science of the Total Environment*, 858, 159786.
- Billoir, E., Péry, A. R., & Charles, S. (2007). Integrating the lethal and sublethal effects of toxic compounds into the population dynamics of *Daphnia magna*: A combination of the DEBtox and matrix population models. *Ecological Modelling*, 203(3-4), 204-214.
- Billoir, E., Delignette-Muller, M. L., Péry, A. R., Geffard, O., & Charles, S. (2008). Statistical cautions when estimating DEBtox parameters. *Journal of theoretical biology*, 254(1), 55-64.
- Billoir, E., Delignette-Muller, M. L., Péry, A. R., & Charles, S. (2008). A Bayesian approach to analyzing ecotoxicological data. *Environmental science & technology*, 42(23), 8978-8984.
- Billoir, E., Delhay, H., Forfait, C., Clément, B., Triffault-Bouchet, G., Charles, S., & Delignette-Muller, M. L. (2012). Comparison of bioassays with different exposure time patterns: the added value of dynamic modelling in predictive ecotoxicology. *Ecotoxicology and environmental safety*, 75, 80-86.
- Biron, P. A., Massarin, S., Alonzo, F., Garcia-Sanchez, L., Charles, S., & Billoir, E. (2012). Population-level modeling to account for multigenerational effects of uranium in *Daphnia magna*. *Environmental science & technology*, 46(2), 1136-1143.
- Blanck, H., & Wängberg, S. Å. (1988). Induced community tolerance in marine periphyton established under arsenate stress. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45(10), 1816-1819.
- Blanck, H. (2002). A critical review of procedures and approaches used for assessing pollution-induced community tolerance (PICT) in biotic communities. *Human and ecological risk assessment*, 8(5), 1003-1034.
- Boutin, C., Montroy, K., Mathiassen, S. K., Carpenter, D. J., Strandberg, B., & Damgaard, C. (2019). Effects of sublethal doses of herbicides on the competitive interactions between 2 nontarget plants, *Centaurea cyanus L.* and *Silene noctiflora L.* *Environmental toxicology and chemistry*, 38(9), 2053-2064.
- Buchfink, B., Xie, C., & Huson, D. H. (2015). Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature methods*, 12(1), 59-60.

- Burnham, KP, Anderson DR (2004). Multimodel inference: understanding AIC and BIC in model selection. *Sociological methods & research*, 33(2), 261-304.
- Busch, W., Schmidt, S., Kühne, R., Schulze, T., Krauss, M., & Altenburger, R. (2016). Micropollutants in European rivers: A mode of action survey to support the development of effect-based tools for water monitoring. *Environmental toxicology and chemistry*, 35(8), 1887-1899.
- Capdevielle, M., Van Egmond, R., Whelan, M., Versteeg, D., Hofmann-Kamensky, M., Inauen, J., ... & Woltering, D. (2008). Consideration of exposure and species sensitivity of triclosan in the freshwater environment. *Integrated environmental assessment and management*, 4(1), 15-23.
- Caswell, H. (1996) Demography meets ecotoxicology: untangling the population level effects of toxic substances. In *Ecotoxicology: A hierarchical treatment*, Newman, M., Jagoe, C., Eds; Lewis Publishers: Boca Raton, FL; pp 255-292.
- Caswell, H. (2001) Matrix Population Models – Construction, Analysis and Interpretation, 2<sup>nd</sup> ed.; Sinauer Associates: Sunderland, Massachusetts.
- Charles, S., Billoir, E., Lopes, C., Chaumot, A. (2009) Matrix population models as relevant tools in ecotoxicology. In *Ecotoxicology Modeling*; Devillers, J., Eds; Springer: New York; pp 261-298.
- Cocci, P., Mosconi, G., Arukwe, A., Mozzicafreddo, M., Angeletti, M., Aretusi, G., & Palermo, F. A. (2015). Effects of Diisodecyl Phthalate on PPAR:RXR-Dependent Gene Expression Pathways in Sea Bream Hepatocytes. *Chemical Research in Toxicology*, 28(5), 935–947.
- Coulaud, R., Geffard, O., Coquillat, A., Queau, H., Charles, S., & Chaumot, A. (2014). Ecological modeling for the extrapolation of ecotoxicological effects measured during in situ assays in *Gammarus*. *Environmental science & technology*, 48(11), 6428-6436.
- Creusot, N., Chaumet, B., Eon, M., Mazzella, N., Moreira, A., & Morin, S. (2021). Metabolomics insight into the influence of environmental factors in responses of freshwater biofilms to the model herbicide diuron. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(20), 29332-29347.
- Cribiu, P., Devaux, A., Garnero, L., Abbaci, K., Bastide, T., Delorme, N., ... & Chaumot, A. (2020). A “population dynamics” perspective on the delayed life-history effects of environmental contaminations: An illustration with a preliminary study of cadmium transgenerational effects over three generations in the Crustacean *Gammarus*. *International journal of molecular sciences*, 21(13), 4704.
- Cross, W. F., Benstead, J. P., Rosemond, A. D., & Bruce Wallace, J. (2003). Consumer-resource stoichiometry in detritus-based streams. *Ecology Letters*, 6(8), 721-732.
- Crump, K. S. (1984). A new method for determining allowable daily intakes. *Toxicological Sciences*, 4(5), 854-871.
- Crump, K. S. (1995). Calculation of benchmark doses from continuous data. *Risk Analysis*, 15(1), 79-89.
- Damgaard, C., Strandberg, B., Mathiassen, S. K., & Kudsk, P. (2014). The effect of glyphosate on the growth and competitive effect of perennial grass species in semi-natural grasslands. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 49(12), 897-908.
- Daufresne, M., Lengfellner, K., & Sommer, U. (2009). Global warming benefits the small in aquatic ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), 12788-12793.
- Del Signore, A., Hendriks, A. J., Lenders, H. R., Leuven, R. S., & Breure, A. M. (2016). Development and application of the SSD approach in scientific case studies for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(9), 2149-2161.
- Delignette-Muller, M. L., & Dutang, C. (2015). fitdistrplus: An R package for fitting distributions. *Journal of statistical software*, 64, 1-34.
- Delignette-Muller, M. L., Lopes, C., Veber, P., & Charles, S. (2014). Statistical handling of reproduction data for exposure-response modeling. *Environmental Science & Technology*, 48(13), 7544-7551.



- Demi, L. M., Benstead, J. P., Rosemond, A. D., & Maerz, J. C. (2019). Experimental N and P additions alter stream macroinvertebrate community composition via taxon-level responses to shifts in detrital resource stoichiometry. *Functional Ecology*, 33(5), 855-867.
- Dolédec, S., & Chessel, D. (1994). Co-inertia analysis: an alternative method for studying species–environment relationships. *Freshwater biology*, 31(3), 277-294.
- Dranguet, P., Cosio, C., Le Faucheur, S., Beauvais-Flück, R., Freiburghaus, A., Worms, I. A., ... & Slaveykova, V. I. (2017). Transcriptomic approach for assessment of the impact on microalga and macrophyte of in-situ exposure in river sites contaminated by chlor-alkali plant effluents. *Water research*, 121, 86-94.
- Dray, S., Chessel, D., & Thioulouse, J. (2003). Co-inertia analysis and the linking of ecological data tables. *Ecology*, 84(11), 3078-3089.
- Dray, S., & Dufour, A. B. (2007). The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of statistical software*, 22, 1-20.
- Dray, S., & Legendre, P. (2008). Testing the species traits–environment relationships: the fourth-corner problem revisited. *Ecology*, 89(12), 3400-3412.
- Dray, S., Choler, P., Dolédec, S., Peres-Neto, P. R., Thuiller, W., Pavoine, S., & ter Braak, C. J. (2014). Combining the fourth-corner and the RLQ methods for assessing trait responses to environmental variation. *Ecology*, 95(1), 14-21.
- Dubois, C., Pophillat, M., Audebert, S., Fourquet, P., Lecomte, C., Dubourg, N., Galas, S., Camoin, L. & Frelon, S. (2019). Differential modification of the *C. elegans* proteome in response to acute and chronic gamma radiation: Link with reproduction decline. *Science of The Total Environment*, 676, 767-781.
- Ducrot, V., Billoir, E., Pery, A. R., Garric, J., & Charles, S. (2010). From individual to population level effects of toxicants in the tubicifid *Branchiura sowerbyi* using threshold effect models in a Bayesian framework. *Environmental science & technology*, 44(9), 3566-3571.
- EFSA Scientific Committee; Hardy, A., Benford, D., Halldorsson, T., Jeger, M. J., Knutsen, K. H., More, S., Mortensen, A., Naegeli, H., Noteborn, H., Ockleford, C., Ricci, A., Rychen, G., Silano, V., Solecki, R., Turck, D., Aerts, M., Bodin, L., Davis, A., Edler, L., Gundert-Remy, U., Sand, S., Slob, W., Bottex, B., Abrahantes, J. C., Marques, D. C., Kass, G., Schlatter, J. R. (2017) Update: Use of the Benchmark Dose Approach in Risk Assessment. *EFSA Journal*, 15 (1).
- EFSA Scientific Committee, More, S. J., Bampidis, V., Benford, D., Bragard, C., Halldorsson, T. I., ... & Schlatter, J. (2022). Guidance on the use of the benchmark dose approach in risk assessment. *Efsa Journal*, 20(10), e07584.
- Elser, J. J., Acharya, K., Kyle, M., Cotner, J., Makino, W., Markow, T., ... & Sterner, R. W. (2003). Growth rate–stoichiometry couplings in diverse biota. *Ecology Letters*, 6, 936-943.
- Elser, J. J., Dobberfuhl, D. R., MacKay, N. A., & Schampel, J. H. (1996). Organism size, life history, and N: P stoichiometry: toward a unified view of cellular and ecosystem processes. *BioScience*, 46(9), 674-684.
- Elton, C., & Nicholson, M. (1942). The ten-year cycle in numbers of the lynx in Canada. *The Journal of Animal Ecology*, 215-244.
- Eriksson, K. M., Johansson, C. H., Fihlman, V., Grehn, A., Sanli, K., Andersson, M. X., ... & Backhaus, T. (2015). Long-term effects of the antibacterial agent triclosan on marine periphyton communities. *Environmental toxicology and chemistry*, 34(9), 2067-2077.
- Evans, E. C., & Sanderson, R. A. (2018). Long-term fertilizer regimes have both direct and indirect effects on arthropod community composition and feeding guilds. *Journal of Applied Entomology*, 142(1-2), 230-240.
- Ewald, J., Soufan, O., Xia, J., Basu, N. (2021). FastBMD: an online tool for rapid benchmark dose–response analysis of transcriptomics data. *Bioinformatics*, 37(7), 1035-1036.

- Ewald, J. D., Basu, N., Crump, D., Boulanger, E., & Head, J. (2022). Characterizing Variability and Uncertainty Associated with Transcriptomic Dose–Response Modeling. *Environmental Science & Technology*, 56(22), 15960-15968.
- Eziz, A., Yan, Z., Tian, D., Han, W., Tang, Z., & Fang, J. (2017). Drought effect on plant biomass allocation: A meta-analysis. *Ecology and evolution*, 7(24), 11002-11010.
- Fagan, W. F., Siemann, E., Mitter, C., Denno, R. F., Huberty, A. F., Woods, H. A., & Elser, J. J. (2002). Nitrogen in insects: implications for trophic complexity and species diversification. *The American Naturalist*, 160(6), 784-802.
- Fan, Y., Chen, J., Wang, Z., Tan, T., Li, S., Li, J., ... & Yang, F. (2019). Soybean (*Glycine max* L. Merr.) seedlings response to shading: leaf structure, photosynthesis and proteomic analysis. *BMC plant biology*, 19, 1-12.
- Floury, M., Usseglio-Polatera, P., Ferreol, M., Delattre, C., & Souchon, Y. (2013). Global climate change in large European rivers: long term effects on macroinvertebrate communities and potential local confounding factors. *Global change biology*, 19(4), 1085-1099.
- Floury, M., Usseglio-Polatera, P., Delattre, C., & Souchon, Y. (2017). Assessing long-term effects of multiple, potentially confounded drivers in ecosystems from species traits. *Global Change Biology*, 23(6), 2297-2307.
- Foit, K., Kaske, O., & Liess, M. (2012). Competition increases toxicant sensitivity and delays the recovery of two interacting populations. *Aquatic Toxicology*, 106, 25-31.
- Forbes, V. E., & Calow, P. (2002). Species sensitivity distributions revisited: a critical appraisal. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 8(3), 473-492.
- Forbes, V. E., Calow, P., & Sibly, R. M. (2008). The extrapolation problem and how population modeling can help. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 27(10), 1987-1994.
- Forbes, V. E., Calow, P., Grimm, V., Hayashi, T. I., Jager, T., Katholm, A., ... & Stillman, R. A. (2011). Adding value to ecological risk assessment with population modeling. *Human and Ecological Risk Assessment*, 17(2), 287-299.
- Friberg, N., Skriver, J., LARSEN, S. E., Pedersen, M. L., & Buffagni, A. (2010). Stream macroinvertebrate occurrence along gradients in organic pollution and eutrophication. *Freshwater Biology*, 55(7), 1405-1419.
- Gene Ontology Consortium. (2021) The Gene Ontology resource: enriching a Gold mine. *Nucleic acids research*, 49(D1), D325-D334.
- Genty, B., Briantais, J. M., & Baker, N. R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 990(1), 87-92.
- González, A. L., Fariña, J. M., Kay, A. D., Pinto, R., & Marquet, P. A. (2011). Exploring patterns and mechanisms of interspecific and intraspecific variation in body elemental composition of desert consumers. *Oikos*, 120(8), 1247-1255.
- González, A. L., Céréghino, R., Dézerald, O., Farjalla, V. F., Leroy, C., Richardson, B. A., ... & Srivastava, D. S. (2018). Ecological mechanisms and phylogeny shape invertebrate stoichiometry: A test using detritus based communities across Central and South America. *Functional Ecology*, 32(10), 2448-2463.
- Goussen, B., Beaudouin, R., Dutilleul, M., Buisset-Goussen, A., Bonzom, J. M., & Péry, A. R. (2015a). Energy-based modelling to assess effects of chemicals on *Caenorhabditis elegans*: a case study on uranium. *Chemosphere*, 120, 507-514.
- Goussen, B., Péry, A. R., Bonzom, J. M., & Beaudouin, R. (2015b). Transgenerational adaptation to pollution changes energy allocation in populations of nematodes. *Environmental science & technology*, 49(20), 12500-12508.
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., ... & Regev, A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature biotechnology*, 29(7), 644-652.

- Grouselle, M., Grollier, T., Feurtetmazel, A., Ribeyre, F., & Boudou, A. (1995). Herbicide isoproturon-specific binding in the freshwater macrophyte *Elodea densa*-a single-cell fluorescence study. *Ecotoxicology and environmental safety*, 32(3), 254-259.
- Gündel, U., Kalkhof, S., Zitzkat, D., von Bergen, M., Altenburger, R., & Küster, E. (2012). Concentration–response concept in ecotoxicoproteomics: Effects of different phenanthrene concentrations to the zebrafish (*Danio rerio*) embryo proteome. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 76, 11-22.
- Gust, K. A., Kennedy, A. J., Melby, N. L., Wilbanks, M. S., Laird, J., Meeks, B., ... & Perkins, E. J. (2016). *Daphnia magna*'s sense of competition: intra-specific interactions (ISI) alter life history strategies and increase metals toxicity. *Ecotoxicology*, 25, 1126-1135.
- Gust, K. A., Lotufo, G. R., Barker, N. D., Ji, Q., & May, L. K. (2021). Mode of action evaluation for reduced reproduction in *Daphnia pulex* exposed to the insensitive munition, 1-methyl-3-nitro-1-nitroguanidine (MeNQ). *Ecotoxicology*, 30(6), 1203-1215.
- Haider, S., & Pal, R. (2013). Integrated analysis of transcriptomic and proteomic data. *Current genomics*, 14(2), 91-110.
- Hamed, K. H., & Rao, A. R. (1998). A modified Mann-Kendall trend test for autocorrelated data. *Journal of hydrology*, 204(1-4), 182-196.
- Hanson, M. L., & Solomon, K. R. (2002). New technique for estimating thresholds of toxicity in ecological risk assessment. *Environmental science & technology*, 36(15), 3257-3264.
- Heckmann, L. H., Baas, J., & Jager, T. (2010). Time is of the essence. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(6), 1396-1398.
- Hulot, F. D., Lacroix, G., Lescher-Moutoué, F., & Loreau, M. (2000). Functional diversity governs ecosystem response to nutrient enrichment. *Nature*, 405(6784), 340-344.
- Isles, P. D. (2020). The misuse of ratios in ecological stoichiometry. *Ecology*, 101(11), e03153.
- Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services (IPBES). (2019). Global assessment report on biodiversity and ecosystem services of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services.
- Jager, T., Crommentuijn, T., van Gestel, C. A., & Kooijman, S. A. (2007). Chronic exposure to chlorpyrifos reveals two modes of action in the springtail *Folsomia candida*. *Environmental Pollution*, 145(2), 452-458.
- Jager, T., Vandenbrouck, T., Baas, J., De Coen, W. M., & Kooijman, S. A. (2010). A biology-based approach for mixture toxicity of multiple endpoints over the life cycle. *Ecotoxicology*, 19, 351-361.
- Jager, T., Albert, C., Preuss, T. G., & Ashauer, R. (2011). General unified threshold model of survival-a toxicokinetic-toxicodynamic framework for ecotoxicology. *Environmental science & technology*, 45(7), 2529-2540.
- Jager, T., & Zimmer, E. I. (2012). Simplified dynamic energy budget model for analysing ecotoxicity data. *Ecological Modelling*, 225, 74-81.
- Jager, T. (2020). Revisiting simplified DEBtox models for analysing ecotoxicity data. *Ecological Modelling*, 416, 108904.
- Ji, C., Weissmann, A., Shao, K. (2022). A computational system for Bayesian benchmark dose estimation of genomic data in BBMD. *Environment International*, 161, 107135.
- Johnson, A. C., Besien, T. J., Bhardwaj, C. L., Dixon, A., Goody, D. C., Haria, A. H., & White, C. (2001). Penetration of herbicides to groundwater in an unconfined chalk aquifer following normal soil applications. *Journal of Contaminant Hydrology*, 53(1-2), 101-117.
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, 28(1), 27-30.

- Klanjscek, T., Caswell, H., Neubert, M. G., & Nisbet, R. M. (2006). Integrating dynamic energy budgets into matrix population models. *Ecological modelling*, 196(3-4), 407-420.
- Klok, C., De Roos, A., Marinissen, J. C., Baveco, H. M., & Ma, W. C. (1997). Assessing the effects of abiotic environmental stress on population growth in *Lumbricus rubellus* (Lubricidae, Oligochaeta). *Soil Biology and Biochemistry*, 29(3-4), 287-293.
- Kooijman, S. A. L. M., & Bedaux, J. J. M. (1996). Analysis of toxicity tests on *Daphnia* survival and reproduction. *Water Research*, 30(7), 1711-1723.
- Kooijman, S. A. L. M. (2000). *Dynamic energy and mass budgets in biological systems*. Cambridge university press.
- Krewski, D., Westphal, M., Al-Zoughool, M., Croteau, M. C., & Andersen, M. E. (2011). New directions in toxicity testing. *Annual Review of Public Health*, 32, 161-178.
- Lamonica, D., Charles, S., Clément, B., & Lopes, C. (2023). Chemical effects on ecological interactions within a model-experiment loop. *Peer Community Journal*, 3.
- Lamy, I., Faburé, J., Mougin, C., Morin, S., Coutellec, M. A., Denaix, L., & Martin-Laurent, F. (2022). *L'écotoxicologie en questions* (p. 72). Editions Quae.
- Langfelder, P., & Horvath, S. (2008). WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC bioinformatics*, 9(1), 1-13.
- Larras, F., Billoir, E., Baillard, V., Siberchicot, A., Scholz, S., Wubet, T., Tarkka, M., Schmitt-Jansen, M. & Delignette-Muller, M. L. (2018). DRomics: A turnkey tool to support the use of the dose–response framework for omics data in ecological risk assessment. *Environmental Science & Technology*, 52(24), 14461-14468.
- Larras, F., Billoir, E., Scholz, S., Tarkka, M., Wubet, T., Delignette-Muller, M. L., & Schmitt-Jansen, M. (2020). A multi-omics concentration-response framework uncovers novel understanding of triclosan effects in the chlorophyte *Scenedesmus vacuolatus*. *Journal of hazardous materials*, 397, 122727.
- Larras, F., Billoir, E., Lips, S., Schreiber, S., Veber, P., Delignette-Muller, M.L., Schmitt-Jansen, M. (2022). Meta-transcriptomics reveals stress adaptation processes in microbial communities differing in exposure history. SFE2-GfÖ-EEF joint meeting, International conference on ecological sciences, Nov 2022, Metz, France.
- Larras, F., Charles, S., Chaumot, A., Pelosi, C., Le Gall, M., Mamy, L., & Beaudouin, R. (2022). A critical review of effect modeling for ecological risk assessment of plant protection products. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(29), 43448-43500.
- Latli, A., Descy, J. P., Mondy, C. P., Floury, M., Viroux, L., Otjacques, W., ... & Kestemont, P. (2017). Long-term trends in trait structure of riverine communities facing predation risk increase and trophic resource decline. *Ecological Applications*, 27(8), 2458-2474.
- LeBlanc, G. A. (1982). Laboratory investigation into the development of resistance of *Daphnia magna* (strauss) to environmental pollutants. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*, 27(4), 309-322.
- Leslie, P. H. (1945). On the use of matrices in certain population mathematics. *Biometrika*, 33(3), 183-212.
- Leslie, P. H. (1948). Some further notes on the use of matrices in population mathematics. *Biometrika*, 35, 213-245.
- Liu, Y., Chen, Z., Li, S., Ding, L., Wei, X., Han, S., ... & Sun, Y. (2022). Multi-omics profiling and biochemical assays reveal the acute toxicity of environmental related concentrations of Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the gill of crucian carp (*Carassius auratus*). *Chemosphere*, 307, 135814.
- Lopes, C., Péry, A. R. R., Chaumot, A., & Charles, S. (2005). Ecotoxicology and population dynamics: Using DEBtox models in a Leslie modeling approach. *Ecological Modelling*, 188(1), 30-40.
- Love, M. I., Huber, W., Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15, 550.

- Martens, M., Ammar, A., Riutta, A., Waagmeester, A., Slenter, D. N., Hanspers, K., ... & Kutmon, M. (2021). WikiPathways: connecting communities. *Nucleic acids research*, 49(D1), D613-D621.
- Martin-Creuzburg, D., Kowarik, C., & Straile, D. (2017). Cross-ecosystem fluxes: Export of polyunsaturated fatty acids from aquatic to terrestrial ecosystems via emerging insects. *Science of the Total Environment*, 577, 174-182.
- Massarin, S., Alonzo, F., Garcia-Sanchez, L., Gilbin, R., Garnier-Laplace, J., & Poggiale, J. C. (2010). Effects of chronic uranium exposure on life history and physiology of *Daphnia magna* over three successive generations. *Aquatic Toxicology*, 99(3), 309-319.
- Massarin, S., Beaudouin, R., Zeman, F., Floriani, M., Gilbin, R., Alonzo, F., & Pery, A. R. (2011). Biology-based modeling to analyze uranium toxicity data on *Daphnia magna* in a multigeneration study. *Environmental science & technology*, 45(9), 4151-4158.
- Mauritsson, K., Desforges, J. P., & Harding, K. C. (2022). Maternal transfer and long-term population effects of PCBs in Baltic grey seals using a new toxicokinetic–toxicodynamic population model. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 83(4), 376-394.
- McCormick, P. V., Shuford, R. B., & Rawlik, P. S. (2004). Changes in macroinvertebrate community structure and function along a phosphorous gradient in the Florida Everglades. *Hydrobiologia*, 529, 113-132.
- McFadden, I. R., Sendek, A., Brosse, M., Bach, P. M., Baity-Jesi, M., Bolliger, J., ... & Narwani, A. (2023). Linking human impacts to community processes in terrestrial and freshwater ecosystems. *Ecology letters*, 26(2), 203-218.
- McManamay, R. A., Webster, J. R., Valett, H. M., & Dolloff, C. A. (2011). Does diet influence consumer nutrient cycling? Macroinvertebrate and fish excretion in streams. *Journal of the North American Benthological Society*, 30(1), 84-102.
- McMurry, L. M., Oethinger, M., & Levy, S. B. (1998). Triclosan targets lipid synthesis. *Nature*, 394(6693), 531-532.
- Mehler, K., Acharya, K., Sada, D., & Yu, Z. (2013). Elemental stoichiometry of basal resources and benthic macroinvertebrates along a land use gradient in a Great Basin watershed. *Hydrobiologia*, 716, 115-129.
- Meier, M. J., Dodge, A. E., Samarajeewa, A. D., & Beaudette, L. A. (2020). Soil exposed to silver nanoparticles reveals significant changes in community structure and altered microbial transcriptional profiles. *Environmental Pollution*, 258, 113816.
- Moisset, S., Tiam, S. K., Feurtet-Mazel, A., Morin, S., Delmas, F., Mazzella, N., & Gonzalez, P. (2015). Genetic and physiological responses of three freshwater diatoms to realistic diuron exposures. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 4046-4055.
- Moore, D. R., & Caux, P. Y. (1997). Estimating low toxic effects. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 16(4), 794-801.
- Morse, N. B., Wollheim, W. M., Benstead, J. P., & McDowell, W. H. (2012). Effects of suburbanization on foodweb stoichiometry of detritus-based streams. *Freshwater Science*, 31(4), 1202-1213.
- Münzinger, A. (1990). Effects of nickel on *Daphnia magna* during chronic exposure and alterations in the toxicity to generations pre-exposed to nickel. *Water Research*, 24(7), 845-852.
- Murat El Houdigui, S., Adam-Guillermin, C., Loro, G., Arcanjo, C., Frelon, S., Floriani, M., Dubourg, N., Baudalet, E., Audebert, S., Camoin, L. & Armant, O. (2019). A systems biology approach reveals neuronal and muscle developmental defects after chronic exposure to ionising radiation in zebrafish. *Scientific reports*, 9(1), 1-15.
- Murphy, S. M., Wimp, G. M., Lewis, D., & Denno, R. F. (2012). Nutrient presses and pulses differentially impact plants, herbivores, detritivores and their natural enemies. *Plos ONE*, 7(8), e43929
- Naddafi, R., Goedkoop, W., Grandin, U., & Eklöv, P. (2012). Variation in tissue stoichiometry and condition index of zebra mussels in invaded Swedish lakes. *Biological Invasions*, 14, 2117-2131.
- National Toxicology Program. (2018). NTP Research Report on National Toxicology Program Approach to Genomic Dose-Response Modeling: Research Report 5.

- Nessel, M. P., Konnovitch, T., Romero, G. Q., & González, A. L. (2021). Nitrogen and phosphorus enrichment cause declines in invertebrate populations: a global meta-analysis. *Biological Reviews*, 96(6), 2617-2637.
- Nweke, C. O., & Ogbonna, C. J. (2017). Statistical models for biphasic dose-response relationships (hormesis) in toxicological studies. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 12(1), 39-55.
- Ortiz, J. D., & Puig, M. A. (2007). Point source effects on density, biomass and diversity of benthic macroinvertebrates in a Mediterranean stream. *River Research and Applications*, 23(2), 155-170.
- Pan, C. G., Peng, F. J., Shi, W. J., Hu, L. X., Wei, X. D., & Ying, G. G. (2018). Triclosan-induced transcriptional and biochemical alterations in the freshwater green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 148, 393-401.
- Pane, E. F., McGeer, J. C., & Wood, C. M. (2004). Effects of chronic waterborne nickel exposure on two successive generations of *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 23(4), 1051-1056.
- Peddada, S. D., Lobenhofer, E. K., Li, L., Afshari, C. A., Weinberg, C. R., & Umbach, D. M. (2003). Gene selection and clustering for time-course and dose-response microarray experiments using order-restricted inference. *Bioinformatics*, 19(7), 834-841.
- Penuelas, J., Poulter, B., Sardans, J., Ciais, P., Van Der Velde, M., Bopp, L., ... & Janssens, I. A. (2013). Human-induced nitrogen-phosphorus imbalances alter natural and managed ecosystems across the globe. *Nature communications*, 4(1), 2934.
- Persson, L., Carney Almroth, B. M., Collins, C. D., Cornell, S., De Wit, C. A., Diamond, M. L., ... & Hauschild, M. Z. (2022). Outside the safe operating space of the planetary boundary for novel entities. *Environmental science & technology*, 56(3), 1510-1521.
- Péry, A. R., Ducrot, V., Mons, R., & Garric, J. (2003). Modelling toxicity and mode of action of chemicals to analyse growth and emergence tests with the midge *Chironomus riparius*. *Aquatic Toxicology*, 65(3), 281-292.
- Pesce, S., Beguet, J., Rouard, N., Devers-Lamrani, M., & Martin-Laurent, F. (2013). Response of a diuron-degrading community to diuron exposure assessed by real-time quantitative PCR monitoring of phenylurea hydrolase A and B encoding genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 1661-1668.
- Phillips, J. R., Svoboda, D. L., Tandon, A., Patel, S., Sedykh, A., Mav, D., Kuo, B., Yauk, C.L., Yang, L., Thomas, R.S., Gift, J.S., Davis, J.A., Olszyk, L., Merrick, B.A., Pales, R.S., Parham, F., Saddler, T., Shah, R.R. & Auerbach, S.S. (2019). BMDExpress 2: enhanced transcriptomic dose-response analysis workflow. *Bioinformatics*, 35(10), 1780-1782.
- Pieters, B. J., Jager, T., Kraak, M. H., & Admiraal, W. (2006). Modeling responses of *Daphnia magna* to pesticide pulse exposure under varying food conditions: intrinsic versus apparent sensitivity. *Ecotoxicology*, 15, 601-608.
- Pillai, S., Behra, R., Nestler, H., Suter, M. J. F., Sigg, L., & Schirmer, K. (2014). Linking toxicity and adaptive responses across the transcriptome, proteome, and phenotype of *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to silver. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(9), 3490-3495.
- Pinckney, J. L., Thompson, L., & Hylton, S. (2017). Triclosan alterations of estuarine phytoplankton community structure. *Marine Pollution Bulletin*, 119(1), 162-168.
- Plaire, D., Bourdineaud, J. P., Alonzo, A., Camilleri, V., Garcia-Sanchez, L., Adam-Guillermin, C., & Alonzo, F. (2013). Transmission of DNA damage and increasing reprotoxic effects over two generations of *Daphnia magna* exposed to uranium. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 158(4), 231-243.
- Plummer, M. (2003). JAGS: A program for analysis of Bayesian graphical models using Gibbs sampling. In *Proceedings of the 3rd international workshop on distributed statistical computing* (Vol. 124, No. 125.10, pp. 1-10).
- Plummer, M. (2010). JAGS Version 2.2. 0 user manual.

- Plummer, M., Stukalov, A., & Denwood, M. (2016). rjags: Bayesian graphical models using MCMC.
- Prater, C., Norman, E. J., & Evans-White, M. A. (2015). Relationships among nutrient enrichment, detritus quality and quantity, and large-bodied shredding insect community structure. *Hydrobiologia*, 753, 219-232.
- Prud'homme, S. M., Chaumot, A., Cassar, E., David, J. P., & Reynaud, S. (2017). Impact of micropollutants on the life-history traits of the mosquito *Aedes aegypti*: On the relevance of transgenerational studies. *Environmental Pollution*, 220, 242-254.
- R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Raimondo, S., Hemmer, B. L., Goodman, L. R., & Cripe, G. M. (2009). Multigenerational exposure of the estuarine sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) to 17 $\beta$ -Estradiol. II. Population-level effects through two life cycles. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 28(11), 2409-2415.
- Raitif, J., Plantegenest, M., Agator, O., Piscart, C., & Roussel, J. M. (2018). Seasonal and spatial variations of stream insect emergence in an intensive agricultural landscape. *Science of the total environment*, 644, 594-601.
- Ramel, F., Sulmon, C., Gouesbet, G., & Couée, I. (2009). 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), 1323-1337.
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., Smyth, G. K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43(7), e47.
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., & Gerhard, D. (2015). Dose-response analysis using R. *PLoS one*, 10(12), e0146021.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140.
- Rollin, M., Coulaud, R., Rocher, B., Billoir, E., Geffard, O., Dufлот, A., ... & Xuereb, B. (2023). Effects of Chemical Compounds on the Activity of the N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase of the Marine Prawn, *Palaemon serratus*: Screening In Vitro. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 42(4), 846-858.
- Rotter, S., Gunold, R., Mothes, S., Paschke, A., Brack, W., Altenburger, R., & Schmitt-Jansen, M. (2015). Pollution-induced community tolerance to diagnose hazardous chemicals in multiple contaminated aquatic systems. *Environmental science & technology*, 49(16), 10048-10056.
- Scheibener, S., Song, Y., Tollefsen, K. E., Salbu, B., & Teien, H. C. (2021). Uranium accumulation and toxicokinetics in the crustacean *Daphnia magna* provide perspective to toxicodynamic responses. *Aquatic Toxicology*, 235, 105836.
- Schüttler, A., Reiche, K., Altenburger, R., & Busch, W. (2017). The transcriptome of the zebrafish embryo after chemical exposure: a meta-analysis. *Toxicological Sciences*, 157(2), 291-304.
- Schüttler, A., Altenburger, R., Ammar, M., Bader-Blukott, M., Jakobs, G., Knapp, J., ... & Busch, W. (2019). Map and model - moving from observation to prediction in toxicogenomics. *GigaScience*, 8(6), giz057.
- Serra, A., Saarimäki, L. A., Fratello, M., Marwah, V. S., Greco, D. (2020). BMDx: a graphical shiny application to perform Benchmark Dose analysis for transcriptomics data. *Bioinformatics*, 36(9), 2932-2933.
- Serra, A., Fratello, M., Del Giudice, G., Saarimäki, L. A., Paci, M., Federico, A., & Greco, D. (2020). TinderMIX: Time-dose integrated modelling of toxicogenomics data. *Gigascience*, 9(5), gaa055.

- Shen, W.-K., Chen, S.-Y., Gan, Z.-Q., Zhang, Y.-Z., Yue, T., Chen, M.-M., Xue, Y., Hu, H., & Guo, A.-Y. (2022). AnimalTFDB 4.0: A comprehensive animal transcription factor database updated with variation and expression annotations. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D39–D45.
- Sigmund, G., Ågerstrand, M., Antonelli, A., Backhaus, T., Brodin, T., Diamond, M. L., ... & Groh, K. J. (2023). Addressing chemical pollution in biodiversity research. *Global Change Biology*, 29(12), 3240-3255.
- Singer, G. A., & Battin, T. J. (2007). Anthropogenic subsidies alter stream consumer–resource stoichiometry, biodiversity, and food chains. *Ecological Applications*, 17(2), 376-389.
- Smetanová, S., Riedl, J., Zitzkat, D., Altenburger, R., & Busch, W. (2015). High-throughput concentration-response analysis for omics datasets. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(9), 2167-2180.
- Smolders, R., Baillieux, M., & Blust, R. (2005). Relationship between the energy status of *Daphnia magna* and its sensitivity to environmental stress. *Aquatic Toxicology*, 73(2), 155-170.
- Song, Y., Zheng, K., Brede, D. A., Gomes, T., Xie, L., Kassaye, Y., Salbu B. & Tollefsen, K. E. (2023). Multiomics Point of Departure (moPOD) Modeling Supports an Adverse Outcome Pathway Network for Ionizing Radiation. *Environmental Science & Technology*, 57(8), 3198-3205.
- Southwood, T. R. (1977). Habitat, the templet for ecological strategies?. *Journal of animal ecology*, 46(2), 337-365.
- Spiegelhalter, D. J., Best, N. G., Carlin, B. P., & Van Der Linde, A. (2002). Bayesian measures of model complexity and fit. *Journal of the Royal Statistical Society Series B: Statistical Methodology*, 64(4), 583-639.
- Stark, J. D., Banks, J. E., & Vargas, R. (2004). How risky is risk assessment: The role that life history strategies play in susceptibility of species to stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(3), 732-736.
- Sterner, R. W., & Elser, J. J. (2003). *Ecological stoichiometry: the biology of elements from molecules to the biosphere*. Princeton university press.
- Sulmon, C., Gouesbet, G., Couée, I., & El Amrani, A. (2004). Sugar-induced tolerance to atrazine in *Arabidopsis* seedlings: interacting effects of atrazine and soluble sugars on psbA mRNA and D1 protein levels. *Plant Science*, 167(4), 913-923.
- Sulmon, C., Gouesbet, G., El Amrani, A., & Couée, I. (2007). Involvement of the ethylene-signalling pathway in sugar-induced tolerance to the herbicide atrazine in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Journal of plant physiology*, 164(8), 1083-1092.
- Sylvester, F., Weichert, F. G., Lozano, V. L., Groh, K. J., Bálint, M., Baumann, L., ... & Hollert, H. (2023). Better integration of chemical pollution research will further our understanding of biodiversity loss. *Nature ecology & evolution*, 1-4.
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J., & Mering, C. von. (2019). STRING v11: Protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D607–D613.
- Tachet, H., Richoux, P., Bournaud, M., & Usseglio-Polatera, P. (2010). *Invertébrés d'eau douce: systématique, biologie, écologie* (Vol. 15, pp. 89-10). Paris: CNRS éditions.
- Teurlinx, S., Velthuis, M., Seroka, D., Govaert, L., van Donk, E., Van de Waal, D. B., & Declerck, S. A. (2017). Species sorting and stoichiometric plasticity control community C:P ratio of first-order aquatic consumers. *Ecology Letters*, 20(6), 751-760.
- Tlili, A., Berard, A., Blanck, H., Bouchez, A., Cássio, F., Eriksson, K. M., ... & Behra, R. (2016). Pollution-induced community tolerance (PICT): towards an ecologically relevant risk assessment of chemicals in aquatic systems. *Freshwater Biology*, 61(12), 2141-2151.
- Tukey, J. W., Ciminera, J. L., & Heyse, J. F. (1985). Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. *Biometrics*, 295-301.



- UniProt Consortium. (2017). UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic acids research*, 45 (D1), D158-D169.
- UniProt Consortium. (2019). UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic acids research*, 47(D1), D506-D515.
- US EPA. (1994). Methods for derivation of inhalation reference concentrations and application of inhalation dosimetry. Environmental Criteria Assessment Office, Office of Health and Environmental Assessment, Office of Research and Development.
- US EPA. Risk Assessment Forum. (2012). Benchmark dose technical guidance. US Environmental Protection Agency, Office of the Science Advisor, Risk Assessment Forum.
- Vokuev, M. F., Baygildiev, T. M., Plyushchenko, I. V., Ikhlaynen, Y. A., Ogorodnikov, R. L., Solontsov, I. K., Braun, A.V., Savelieva, E.I., Rybalchenko, I.V. & Rodin, I. A. (2021). Untargeted and targeted analysis of sarin poisoning biomarkers in rat urine by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413(28), 6973-6985.
- von der Ohe, P. C., Schmitt-Jansen, M., Slobodnik, J., & Brack, W. (2012). Triclosan - the forgotten priority substance?. *Environmental Science and Pollution Research*, 19, 585-591.
- Wakelin, S., Gerard, E., Black, A., Hamonts, K., Condron, L., Yuan, T., ... & O'Callaghan, M. (2014). Mechanisms of pollution induced community tolerance in a soil microbial community exposed to Cu. *Environmental Pollution*, 190, 1-9.
- Wang, P., Xia, P., Yang, J., Wang, Z., Peng, Y., Shi, W., ... & Zhang, X. (2018). A reduced transcriptome approach to assess environmental toxicants using zebrafish embryo test. *Environmental Science & Technology*, 52(2), 821-830.
- Wijesooriya, K., Jadaan, S. A., Perera, K. L., Kaur, T., & Ziemann, M. (2022). Urgent need for consistent standards in functional enrichment analysis. *PLoS computational biology*, 18(3), e1009935.
- Wu, T., Hu, E., Xu, S., Chen, M., Guo, P., Dai, Z., ... & Yu, G. (2021). clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *The Innovation*, 2(3), 100141.
- Xiong, G., Zhang, A., Fan, D., Ge, J., Yang, D., Xie, Z., & Zhang, W. (2018). Functional coordination between leaf traits and biomass allocation and growth of four herbaceous species in a newly established reservoir riparian ecosystem in China. *Ecology and Evolution*, 8(23), 11372-11384.
- Xu, F. L., Li, Y. L., Wang, Y., He, W., Kong, X. Z., Qin, N., ... & Jorgensen, S. E. (2015). Key issues for the development and application of the species sensitivity distribution (SSD) model for ecological risk assessment. *Ecological Indicators*, 54, 227-237.
- Yang, L., Allen, B. C., & Thomas, R. S. (2007). BMDEExpress: a software tool for the benchmark dose analyses of genomic data. *BMC genomics*, 8(1), 1-8.
- Yang, M., Liu, M., Lu, J., & Yang, H. (2019). Effects of shading on the growth and leaf photosynthetic characteristics of three forages in an apple orchard on the Loess Plateau of eastern Gansu, China. *PeerJ*, 7, e7594.
- Yu, C., Zeng, H., Wang, Q., Chen, W., Chen, W., Yu, W., ... & Wu, J. (2022). Multi-omics analysis reveals the molecular responses of *Torreya grandis* shoots to nanoplastic pollutant. *Journal of Hazardous Materials*, 436, 129181.
- Yvon-Durocher, G., Montoya, J. M., Trimmer, M., & Woodward, G. (2011). Warming alters the size spectrum and shifts the distribution of biomass in freshwater ecosystems. *Global change biology*, 17(4), 1681-1694.
- Zhan, J., Wang, S., Li, F., Ji, C., & Wu, H. (2021). Global characterization of dose-dependent effects of cadmium in clam *Ruditapes philippinarum*. *Environmental Pollution*, 273, 116443.
- Zhang, X., Xia, P., Wang, P., Yang, J., & Baird, D. J. (2018). Omics advances in ecotoxicology. *Environmental Science & Technology*, 52(7), 3842-3851.

Zhang, W., Li, J., Wei, X., Wang, Q., Yang, J., Hou, H., Du, Z., & Wu, X. (2021). Effects of dibutyl phthalate on lipid metabolism in liver and hepatocytes based on PPAR $\alpha$ /SREBP-1c/FAS/GPAT/AMPK signal pathway. *Food and Chemical Toxicology*, 149, 112029.





## **Résumé en français**

L'écotoxicologie est la science qui étudie le devenir et les effets des composés toxiques, d'origine anthropique ou naturelle, dans les écosystèmes. Elle est à la croisée entre la compréhension de mécanismes fondamentaux et de forts enjeux sociétaux d'évaluation des risques environnementaux. Elle reste le petit poucet de la recherche en écologie sur le thème du changement global, alors que la pollution est pourtant listée parmi les principales causes de la perte de biodiversité actuelle et à venir. Cette HDR illustre comment la modélisation en écotoxicologie peut aider à comprendre les mécanismes d'effet de stress environnementaux, à différentes échelles d'organisation biologique, d'espace et de temps, à partir de suivis de terrain ou de tests en conditions contrôlées. Une compréhension indispensable pour ensuite prédire, sous divers scénarios, comment les composés toxiques affectent les individus, les populations, les communautés et les écosystèmes.

## **Résumé en anglais**

Ecotoxicology is a science dedicated to unraveling the fate and effects of toxic substances, whether of anthropogenic or natural origin, in ecosystems. It lies at the crossroads between the understanding of fundamental mechanisms and addressing the critical societal concerns associated with environmental risk assessment. Despite being overshadowed in the realm of global change ecology, pollution ranks among the foremost causes of both present and future biodiversity loss. This HDR effectively illustrates how ecotoxicological modeling can shed light on the intricate mechanisms underlying the effects of environmental stressors across different scales of biological organization, space, and time. This knowledge is essential for predicting how toxic compounds affect individuals, populations, communities and ecosystems under various scenarios.