



**HAL**  
open science

# Modélisation et changement d'échelles pour l'évaluation écotoxicologique : application a deux macroinvertébrés aquatiques, *gammarus fossarum* (crustacé amphipode) et *potamopyrgus antipodarum* (mollusque gasteropode)

Romain Coulaud

## ► To cite this version:

Romain Coulaud. Modélisation et changement d'échelles pour l'évaluation écotoxicologique : application a deux macroinvertébrés aquatiques, *gammarus fossarum* (crustacé amphipode) et *potamopyrgus antipodarum* (mollusque gasteropode). Sciences de l'environnement. Doctorat Biologie, Université de Lyon I, 2012. Français. NNT: . tel-02597102

**HAL Id: tel-02597102**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02597102>**

Submitted on 15 May 2020

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

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



## THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I

ECOLE DOCTORALE : *Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation*

DIPLOME DE DOCTORAT

(Arrêté du 7 Août 2006)

Soutenue publiquement le 17 février 2012 par :

**ROMAIN COULAUD**

**MODELISATION ET CHANGEMENT D'ECHELLES POUR L'EVALUATION  
ECOTOXICOLOGIQUE : APPLICATION A DEUX MACROINVERTEBRES  
AQUATIQUES, *GAMMARUS FOSSARUM* (CRUSTACE AMPHIPODE) ET  
*POTAMOPYRGUS ANTIPODARUM* (MOLLUSQUE GASTEROPODE)**

---

### JURY

M<sup>me</sup>. Claude AMIARD-TRIQUET, DR, Université de Nantes.....rapporteur  
M. Laurent LAGADIC, DR, INRA de Rennes.....rapporteur  
M. Pierre MARMONIER, PR, Université Claude Bernard Lyon 1.....examineur  
M. Sami SOUISSI, PR, Université de Lille – Nord de France..... examineur  
M<sup>me</sup>. Sandrine CHARLES, MCU, Université Claude Bernard Lyon 1.....directrice de thèse  
M. Arnaud CHAUMOT, CR, IRSTEA de Lyon.....co-directeur de thèse



## UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON 1

### **Président de l'Université**

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Secrétaire Général

### **M. A. Bonmartin**

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. le Professeur J-F. Mornex

M. G. Gay

### ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie

Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

### ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Département Sciences de la Terre

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Institut de Science Financière et d'Assurances

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. le Professeur F. De Marchi

Directeur : M. le Professeur F. Fleury

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Directeur : M. N. Siauve

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Directeur : Mme S. Fleck

Directeur : Mme le Professeur I. Daniel

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. P. Fournier

Directeur : M. G. Pignault

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M. R. Bernard



## REMERCIEMENTS

*Je tiens à remercier en premier lieu mes directeurs de thèse : Sandrine Charles et Arnaud Chaumot. Merci Sandrine d'avoir tout d'abord su éveiller ma curiosité et mon intérêt pour ce projet de thèse lors de mon passage pour récupérer ces fameux savons au lait d'ânesse ! Pourtant à l'époque le mot « écotoxicologie » m'était inconnu et celui de « modélisation » me faisait plutôt peur ! Merci également pour ton accueil et tes conseils lors de mes venues au LBBE où j'ai pris part avec plaisir aux différentes réunions d'équipe. Désormais « l'inférence bayésienne », « la dynamique du budget énergétique » ou encore « les méthodes d'appréciation quantitative des risques » n'ont maintenant plus de secrets pour moi ! Enfin, désolé pour ma fâcheuse habitude de faire les choses au dernier moment, les corrections de ma présentation pour la SETAC dans le hall de l'hôtel à Séville resteront longtemps dans ma mémoire !*

*Arnaud, merci pour ton investissement quotidien, que ce soit au travers de ton aide lors des sorties sur le terrain et autres expérimentations, des réponses à mes nombreuses questions concernant le jargon pas toujours facile de l'écotoxicologie, de la rapidité de tes corrections et relectures ou encore de ta présence aux différents colloques auxquels j'ai eu la chance de participer. Tu as toujours été très présent et disponible durant ces trois années tout en me laissant une grande autonomie dans mon travail. Cela m'a beaucoup apporté, je m'en rends particulièrement compte en cette fin de thèse.*

*Merci également au Cluster Environnement de la Région Rhône-Alpes et plus particulièrement à Vanessa Cusimano pour avoir financé ce projet et suivi ce travail doctoral.*

*Je remercie Claude Amiard-Triquet et Laurent Lagadic d'avoir accepté de prendre la responsabilité d'être rapporteurs de ce travail et ce malgré le délai un peu court ; ainsi que Pierre Marmonier et Sami Souissi d'avoir accepté d'examiner cette thèse.*

*Je remercie également Bernard Dumont, Patrick Flammarion, Jeanne Garric, Olivier Geffard, Marc Jarry, Christelle Lopes et Jacques Mouthon d'avoir participé à mon comité de pilotage. Ces deux réunions m'ont permis de faire le point sur l'avancement de ce travail.*

*Je tenais aussi à remercier tous les collègues du LBBE qui m'accompagnent depuis un moment maintenant : Lucie, Pif, Julien, Vincent, Aurélien, Adrien et tous les autres. La bonne ambiance qui a toujours régné dans notre promo et dans ce labo de manière générale m'a donné envie de continuer à faire de la recherche et donc cette thèse. Merci aussi à Frédéric Menu et à son équipe, ses cours d'écologie évolutive et ma période « balanin » demeurent de très bons souvenirs !*

*J'adresse également tous mes remerciements aux membres du laboratoire d'écotoxicologie du Cemagref/IRSTEA. Tout d'abord, merci à Jeanne Garric de m'avoir accueilli dans ce laboratoire et pour ses conseils. Merci à la « Dream team » : Christelle pour ta bonne humeur quotidienne, tes conseils et ton aide en*

*statistique. Olivier pour toutes tes connaissances sur le gammare et ta vision globale de l'écotoxicologie. Hervé pour ton aide lors des manips. Allez je l'avoue, sans toi, je serais encore en train de compter et de prendre en photo des gammares et des potamos ! Guillaume, mon cher voisin de bureau ! Au fil du temps une véritable amitié s'est créée entre nous et je te remercie pour ta présence quotidienne, tes précieuses relectures de ce manuscrit, ton amour du vin, tes bons goûts gastronomiques, cinématographiques et musicaux. Sans toi, je ne sais pas si j'aurais aujourd'hui une cave à vin et des supers enceintes à la maison. J'espère que nous continuerons longtemps à se faire de bons repas tous les quatre. Merci aussi de nous avoir inspiré pour le prénom de notre fille !*

*Merci également à Patrice l'aquario, à Jérôme pour sa bonne humeur et ses récits venus des îles, à Emilie pour son aide et pour les bons moments passés ensemble, souvent une bière à la main il faut le reconnaître, à Manuella pour sa « bonne humeur » légendaire et pour m'avoir fait connaître un « vrai » génie ! A Renaud : tes connaissances sur le foot et la superficie des pays sont vraiment impressionnantes et mériteraient d'être plus largement reconnues ! A Olivier Adam pour son aide précieuse en début de thèse. Un grand merci également à Jacques Mouthon pour les prélèvements de potamo et ses connaissances impressionnantes sur les mollusques. Et bien sûr merci à tous les autres : Adeline, Agathe, Alice, les Amandine, Claire, Cyrielle, Judith, Khedidja, Marion, Rebecca, Romy, Benoît Ferrari, Benoît Xuereb, Jean-Phi, Raph et ceux que j'oublie pour leurs conseils, leur aide, leur disponibilité pour boire un café et causer un moment de science mais aussi de la vie de tous les jours, ainsi que la gentillesse et la bonne humeur dont ils ont fait preuve durant ces trois années !*

*Merci également aux restaurants « Chez Papa », « Les 3 faisans », « Le Cupidon », « Le Montagnard », « La Conciergerie », « L'assiette du marché », « La cave Valmy » et bien d'autres qui ont su rendre agréable les sorties de terrains et resteront autant de bons souvenirs ! Merci également aux caves de Chartreuse, à M. Pierre Gonon, au domaine des Entrefaux ou encore au domaine Peillot qui, au hasard d'une sortie de terrain, m'ont offert de belles découvertes œnologiques !*

*Un grand merci à toute ma famille, et particulièrement à mes parents, qui m'ont toujours soutenu dans mon choix de faire une thèse. Je n'oublie pas non plus ma chère belle-famille qui, malgré mon statut de « Lyonnais », m'a acceptée à bras ouverts ! Merci aussi à tous nos amis, « les potes de la fac » et les autres, qui se reconnaîtront ! Enfin le meilleur pour la fin. Merci à toi, Aurélie, sans ton soutien dans les moments de doute, ta confiance et ton amour, ce travail n'aurait pas pu voir le jour. L'arrivée de notre petite Lilou restera pour moi un moment inoubliable et j'ai toute confiance en l'avenir qui nous attend tous les trois !*





## COMMUNICATIONS ET TRAVAUX

### Publications

ACCEPTÉE

Coulaud, R., O. Geffard, B. Xuereb, E. Lacaze, H. Quéau, J. Garric, S. Charles and A. Chaumot (2011). "In situ feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacean): modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring." *Water Research* **45**: 6417-6429.

EN COURS

Chaumot, A., O. Adam, R. Coulaud, H. Quéau and O. Geffard. "Reproductive test using the amphipod *Gammarus fossarum*: impact of confounding factors on the reproductive cycle and implications for ecotoxicological assessment."

Coulaud, R., O. Geffard, O. Adam, H. Quéau, S. Charles and A. Chaumot. "Population modelling and *in situ* caging for a realistic extrapolation of ecotoxicological effects at the population level: a methodological approach with *Gammarus fossarum* (Crustacean) ".

Coulaud, R., O. Geffard, J. Mouthon, H. Quéau, S. Charles and A. Chaumot. "The role of life history seasonality in the vulnerability of two freshwater macroinvertebrate populations to contaminants."

Jubeaux, G., A. Chaumot, R. Coulaud, R. Techer and O. Geffard. "Reproductive toxicity assessment with the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835) by laboratory and field surveys."

## Communications orales

- Coulaud R, Adam O, Geffard O, Quéau H, Garric J, Charles S, Chaumot A. "Modelling and *in situ* caging for a realistic extrapolation of ecotoxicological effects at the population level: a methodological approach with *Gammarus fossarum* (Crustacean) and *Potamopyrgus antipodarum* (Gastropod). ". **SETAC Europe**, Séville (Espagne), 23 - 27 mai 2010.
- Coulaud R, Geffard O, Adam O, Quéau H, Garric J, Charles S, Chaumot A. "Coupler modèles de dynamique de population et encagements *in situ* pour appréhender les effets populationnels des contaminations : illustration de la démarche chez le crustacé *Gammarus fossarum*. ". **Ecologie 2010**, Montpellier (France), 2 - 4 septembre 2010
- Geffard O, Coulaud R, Adam O, Quéau H, Chaumot A. "*In situ* bio-monitoring of water quality : multi-scale effect assessment in *Gammarus fossarum*. ". **XIVth International Colloquium on Amphipoda**, Seville (Espagne), 13 - 18 septembre 2010.
- Coulaud R, Geffard O, Quéau H, Garric J, Charles S, Chaumot A. "*In situ* feeding assay with *Gammarus fossarum*: move forward to an ecologically relevant biomonitoring of water chemical quality.". **SETAC Europe**, Milan (Italie), 15 - 19 mai 2011.
- Coulaud R., Geffard O., Quéau H., Garric J., Charles S., Chaumot A. "Mesure du taux d'alimentation *in situ* avec *Gammarus fossarum* (Crustacé) : un outil écologiquement pertinent pour l'évaluation de la qualité chimique des milieux aquatiques. ". **SEFA**, Paris (France), 22 juin 2011

## Posters

- Adam O, Coulaud R, Geffard O, Quéau H, Garric J, Chaumot A. "In situ experiments to develop ecological relevant tools in individual and population levels.". **SETAC Europe**, Göteborg (Suède), 31 mai - 4 juin 2009.
- Coulaud R, Adam O, Geffard O, Quéau H, Garric J, Charles S, Chaumot A. "Modelling and *in situ* caging for a realistic extrapolation of ecotoxicological effects at the population level: a methodological approach with *Gammarus fossarum* (Crustacean) and *Potamopyrgus antipodarum* (Gastropod)". **14th International Symposium on Toxicity Assessment - ISTA 14**, Metz (France), 30 août - 4 septembre 2009.
- Chaumot A, Geffard O, Coulaud R, Adam O, Quéau H, Charles S, Garric J. "Population level integration of individual effect measurements for *in situ* water quality assessment: a modelling approach with *Gammarus fossarum* (Crustacean) and *Potamopyrgus antipodarum* (Gastropod)". **Modelkey**, Leipzig (Allemagne), 30 novembre - 2 décembre 2009.
- Chaumot A, Geffard O, Coulaud R, Adam O, Quéau H, Charles S, Garric J. "Dynamique de population et intégration des effets individuels pour l'évaluation de la qualité de l'eau : développement d'une approche de modélisation chez *Gammarus fossarum* (Crustacé) et *Potamopyrgus antipodarum* (Gastéropode)". **SEFA**, Versailles (France), 31 mars -1er avril 2010
- Coulaud R, Geffard O, Quéau H, Charles S, Chaumot A. "Population level integration of individual effect measurements for *in situ* water quality assessment: a modelling approach with *Gammarus fossarum*". **XIVth International Colloquium on Amphipoda**; Séville (Espagne), 13 -18 septembre 2010
- Coulaud R, Geffard O, Quéau H, Garric J, Charles S, Chaumot A. "Population models in *Gammarus* (Crustacean) and *Potamopyrgus* (Gastropod): depicting the seasonal variability in demographic sensitivities to toxic stress by sensitivity analysis.". **SETAC Europe**, Milan (Italie), 15 - 19 mai 2011.



# TABLE DES MATIÈRES

<b>Communications et travaux .....</b>	<b>8</b>
<b>Publications .....</b>	<b>8</b>
<b>Communications orales .....</b>	<b>9</b>
<b>Posters .....</b>	<b>10</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>21</b>
<b>Liste des figures et tableaux.....</b>	<b>23</b>
<b>Figures .....</b>	<b>23</b>
<b>Tableaux .....</b>	<b>28</b>
<b>Introduction générale .....</b>	<b>33</b>
<b>I. Synthèse bibliographique.....</b>	<b>41</b>
<b>1 Nécessité d'une évaluation multi-échelles des effets des contaminants dans les milieux aquatiques.....</b>	<b>43</b>
1.1 Les limites de l'approche chimique .....	43
1.2 Les indices communautés .....	44
1.3 : Nécessité d'une approche multi-échelles.....	45
1.3.1 Le niveau sub-individuel .....	47
1.3.2 Le niveau individuel.....	50
1.3.3 Le niveau populationnel.....	51
<b>2 Limites d'utilisation des biomarqueurs et des réponses individuelles pour le diagnostic <i>in situ</i> de la qualité des milieux aquatiques .....</b>	<b>53</b>
2.1 Difficultés d'utilisation pour les approches <i>in situ</i> .....	53
2.1.1 Variabilité naturelle saisonnière et spatiale des marqueurs .....	53
2.1.2 Influence des facteurs biotiques.....	57
2.1.3 Conséquences des facteurs confondants lors des approches <i>in situ</i> .....	57

2.2 Contrôle de l'influence des facteurs biotiques .....	58
2.3 Prise en compte des facteurs environnementaux .....	61
2.3.1 Limites des approches amont - aval .....	61
2.3.2 Définition de gammes de valeurs de référence.....	61
2.3.3 Modélisation de l'influence des facteurs confondants.....	62
2.4 Choix des approches statistiques .....	64

### **3 Apport de la modélisation pour extrapoler les effets individuels au niveau**

#### **populationnel .....**

3.1 Les différents types de modèles utilisés pour l'étude des impacts au niveau populationnel .....	68
3.1.1 Les modèles scalaires .....	70
3.1.2 Les modèles matriciels de dynamique de population .....	71
3.1.2.1 Généralité sur les modèles matriciels de dynamique de population.....	71
3.1.2.2 Utilisation des modèles matriciels en écotoxicologie.....	75
3.1.3 Les modèles individu-centré ou Individual Based Models (IBM) .....	81
3.2 Intérêts et limites des modèles démographiques dans les démarches d'évaluation du risque écologique .....	82
3.2.1 Intérêts des modèles démographiques pour l'évaluation du risque écologique.....	82
3.2.2 Limites des modèles démographiques pour l'évaluation du risque écologique .....	84
3.2.2.1 Choix de l'espèce et importance des histoires de vie.....	85
3.2.2.2 Importance de la variabilité saisonnière.....	86
3.2.2.3 Importance du degré de réalisme du modèle.....	87
3.2.2.4 Prise en compte de la densité-dépendance.....	87
3.2.2.5 Prise en compte des processus de migration entre population.....	88
3.3 Intégration des marqueurs sub-individuels dans les démarches d'extrapolation.....	89

## **II. Matériels et méthodes..... 95**

### **1 Modèles biologiques .....**

1.1 <i>Gammarus fossarum</i> .....	97
1.1.1 Classification .....	97
1.1.2 Ecologie et biologie .....	98
1.1.3 Morphologie et identification de l'espèce.....	100
1.1.4 Anatomie générale .....	104

1.1.5 Appareil reproducteur et reproduction.....	105
1.1.5.1 Appareil reproducteur .....	105
1.1.5.2 Reproduction .....	106
1.1.6 Utilisation des gammares en écotoxicologie et pour l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques .....	109
1.2 <i>Potamopyrgus antipodarum</i> .....	116
1.2.1 Classification .....	116
1.2.2 Ecologie et biologie .....	117
1.2.3 Morphologie et anatomie générale .....	119
1.2.3.1 Morphologie .....	119
1.2.3.2 Anatomie .....	119
1.2.4 Utilisation en écotoxicologie et pour l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques .....	120
<b>2 Biotests individuels chez <i>G. fossarum</i>.....</b>	<b>126</b>
2.1 Prélèvement et maintien des organismes au laboratoire .....	127
2.1.1 Technique de prélèvement des organismes.....	127
2.1.2 Stabulation au laboratoire .....	128
2.2 Expérimentations au laboratoire sur les gammares acclimatés issus de la Tour du Pin	129
2.2.1 Influence de la taille, de la température et de la conductivité sur le taux d'alimentation de <i>G. fossarum</i> .....	129
2.2.2 Influence de la température et de la conductivité sur le taux de croissance de <i>G. fossarum</i> .....	132
2.2.3 Influence de la taille, du stade de mue, de la température et de la conductivité sur la reproduction de <i>G. fossarum</i> .....	133
2.3 Encagements <i>in situ</i> des gammares acclimatés issus de la population de la Tour du Pin .....	135
2.3.1 Méthodologie d'encagement .....	135
2.3.2 Mesures physico-chimiques .....	137
2.3.3 Protocoles des tests.....	138
<b>3 Suivi de population de <i>G. fossarum</i> sur l'Ardières .....</b>	<b>140</b>
3.1 Site de suivi .....	140
3.2 Suivi de terrain mensuel pour le site de l'Ardières .....	141

3.2.1 Suivi démographique .....	141
3.2.2 Suivi de l'état reproducteur des femelles .....	144
3.3 Estimation de la variabilité des traits de vie pour le site de l'Ardières .....	145
3.3.1 Expérimentation au laboratoire sur les organismes de l'Ardières.....	145
3.3.2 Encagements <i>in situ</i> aux différentes saisons sur le site de l'Ardières .....	146
<b>4 Suivi de population de <i>P. antipodarum</i> sur le Rhône.....</b>	<b>147</b>
4.1 Site de suivi .....	147
4.2 Suivi mensuel.....	147
4.2.1 Suivi démographique .....	147
4.2.2 Suivi de la fécondité.....	148
4.3 Etude de la variabilité saisonnière des traits de vie par encagements <i>in situ</i> d'organismes .....	148
4.3.1 Méthodologie d'encagement .....	149
4.3.2 Protocole des tests .....	150
<b>III. Bioessais par encagement et modélisation de l'influence des facteurs environnementaux chez <i>Gammarus fossarum</i> .....</b>	<b>153</b>
<b>1 Introduction.....</b>	<b>155</b>
1.1 Contexte général.....	155
1.2 Choix des marqueurs .....	157
1.2.1 Taux d'alimentation .....	157
1.2.2 Reproduction.....	158
1.2.3 Taux de croissance.....	159
1.3 Démarche .....	159
<b>2 Résultats.....</b>	<b>162</b>
2.1 Etape 1 : Modélisation de l'impact de la température et de la conductivité de l'eau au laboratoire sur les marqueurs individuels mesurés sur des organismes acclimatés au laboratoire et issus d'une même population sur la Bourbre.....	162
2.1.1 Mesure du taux d'alimentation.....	162
2.1.2 Reproduction.....	164
2.1.2.1 Cycle de mue.....	165



2.1.2.2 Fertilité.....	169
2.1.2.3 Fécondité.....	171
2.1.3 Taux de croissance.....	173
2.2 Etape 2 : Définition de gammes de valeurs de références : transplantation d'organismes de la Bourbre dans des sites de référence .....	178
2.2.1 Taux d'alimentation .....	178
2.2.2 Durée du cycle de reproduction.....	184
2.2.3 Taux de croissance.....	186
2.3 Etape 3 : Validation de la sensibilité des marqueurs : transplantation d'organismes de la Bourbre dans des sites de contaminés - cas de la mesure du taux d'alimentation .....	188
2.4 Cas d'étude : impacts de contaminations métalliques sur le taux d'alimentation par la transplantation de <i>G. fossarum</i> de la Bourbre sur le Lot à Decazeville et sur l'Amous (France) .....	190
2.4.1 Cas du Lot à Decazeville.....	191
2.4.2 Bassin versant de l'Amous .....	193
<b>3 Discussion.....</b>	<b>196</b>
3.1 Identification des facteurs confondants.....	196
3.1.1 Taux d'alimentation .....	196
3.1.2 Reproduction.....	198
3.1.2.1 Durée du cycle de reproduction.....	198
3.1.2.2 Fertilité.....	199
3.1.2.3 Fécondité.....	200
3.1.3 Taux de croissance.....	201
3.2 Définition de gammes de valeurs de référence robustes aux facteurs environnementaux .....	202
3.2.1 Taux d'alimentation .....	203
3.2.2 Taux de croissance.....	204
3.2.3 Test de reprotoxicité.....	205
3.3 Sensibilité des marqueurs dans des sites potentiellement impactés.....	208
<b>4 Conclusion .....</b>	<b>209</b>

<b>IV. Des effets individuels aux effets populationnels : développement et utilisation des modèles de dynamique de population chez <i>G. fossarum</i> et <i>P. antipodarum</i>.....</b>	<b>213</b>
<b>1 Introduction.....</b>	<b>215</b>
<b>2 Construction du modèle chez <i>Gammarus fossarum</i> .....</b>	<b>216</b>
2.1 Structure du modèle mathématique.....	216
2.2 Données biologiques .....	218
2.2.1 Suivi de terrain annuel.....	218
2.2.1.1 Conditions environnementales .....	219
2.2.1.2 Suivi démographique .....	219
2.2.1.3 Suivi de l'état reproducteur.....	222
2.2.2 Durée du cycle de reproduction.....	223
2.2.3 Etude des taux de croissance.....	225
2.3.1 Estimation de la fécondité $f_{i,k}$ .....	229
2.3.2 Estimation des taux de transition $P_{j,k}$ .....	232
2.3.2.1 Calcul des taux de passage $g_{j,k}$ de la classe $i$ à la classe $j$ pour chacun des $k$ mois de l'année .....	232
2.3.2.2 Estimation des taux de survie $s_i$ des $i$ classes pour chacun des $k$ mois de l'année .....	234
2.4 Caractérisation de la dynamique de la population annuelle .....	236
2.5 Variabilité saisonnière de la dynamique .....	238
2.6 Sensibilité aux paramètres démographiques.....	240
2.6.1 Sensibilité annuelle.....	240
2.6.2 Sensibilité saisonnière.....	241
<b>3 Construction du modèle chez <i>Potamopyrgus antipodarum</i> .....</b>	<b>243</b>
3.1 Structure du modèle mathématique.....	243
3.2 Données biologiques .....	244
3.2.1 Stratégie d'acquisition des données biologiques.....	244
3.2.1.1 Suivi de terrain annuel.....	245
3.2.1.2 Encagement <i>in situ</i> .....	246
3.2.3 Estimation des taux de reproduction .....	249
3.2.3.1 Evolution de l'état reproducteur des femelles .....	249

3.2.3.2 Estimation de la fécondité des femelles.....	252
3.2.4 Estimation des taux de croissance.....	253
3.3 Paramétrisation du modèle de dynamique de population.....	256
3.3.1 Estimation de la fécondité $f_{i,k}$ .....	257
3.3.2 Estimation des taux de transition $P_{j,k}$ .....	258
3.3.2.1 Calcul des taux de passage $g_{j,k}$ de la classe $i$ à la classe $j$ pour chacun des $k$ mois de l'année.....	258
3.3.2.2 Estimation des taux de survie $s_i$ des $i$ classes pour chacun des $k$ mois de l'année.....	261
3.4 Caractérisation de la dynamique de la population.....	262
3.5 Variabilité saisonnière de la dynamique.....	263
3.6 Sensibilité aux paramètres démographiques.....	264
3.6.1 Sensibilité annuelle.....	264
3.6.2 Sensibilité saisonnière.....	266
<b>4 Cas d'étude : extrapolation au niveau populationnel des impacts individuels d'une station d'épuration chez <i>Gammarus fossarum</i>.....</b>	<b>268</b>
4.1 : Diagnostic de l'impact de la STEP au niveau individuel <i>via</i> des encagement <i>in situ</i> d'organismes issus de la population de la Bourbre et transplantés sur les différents sites. .	269
4.1.1 Survie juvénile.....	269
4.1.2 Survie adulte.....	269
4.1.3 Fécondité.....	270
4.1.4 Bilan.....	271
4.2 : Extrapolation des effets au niveau populationnel.....	271
4.2.1 Impact de la station d'épuration sur le taux de croissance asymptotique de la population $\lambda$ .....	271
4.2.2 Impact de la station d'épuration sur la structure en taille stable.....	273
4.2.3 Variabilité saisonnière de l'impact populationnel.....	274
<b>5 Discussion.....</b>	<b>278</b>
5.1 Modélisation de la dynamique des populations.....	278
5.2 Importance des différences d'histoire de vie dans la sensibilité des populations.....	280
5.3 Importance de la variabilité saisonnière de la sensibilité des populations.....	282

<b>Conclusions et perspectives .....</b>	<b>287</b>
1 Développement de bioessais <i>in situ</i> chez <i>Gammarus fossarum</i> .....	290
2 Extrapolation au niveau populationnel .....	292
<b>Bibliographie .....</b>	<b>297</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>333</b>



## LISTE DES ABREVIATIONS

**AChE** : Acétylcholinestérase

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**Agence RMC** : Agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse

**AIC** : Critère d'information d'Akaike

**AOP** : Adverse Outcome Pathway

**BACIP** : Before-After-Control-Impact design with Paired sampling

**BPA** : Bisphénol A

**CAT** : Catalase

**CES** : Critical Effect Size

**CV** : Coefficient de variation

**DCE** : Directive cadre sur l'eau

**DDE** : Dichlorodiphényltrichloroethane

**DEB** : Dynamic energy budget

**DEBtox** : Dynamic energy budget for toxicology

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**FI** : Feeding index

**FR** : Feeding rate

**GI** : Growth index

**GST** : Glutathion S-transférase

**HAP** : Hydrocarbures aromatiques polycycliques

**IBM** : Modèle individu-centré ou Individual Based Model

**MES** : Matières en suspension

**MMS** : Methyl methanesulfonate

**MT** : Métallothionéine

**PCB** : Polychlorobiphényle

**PNEC** : Predicted No Effect Concentration

**PVC** : Polychlorure de vinyle

**REACH** : Programme d'enregistrement, Evaluation et Autorisation des substances Chimiques

**STEP** : Station d'épuration

**VTG** : Vitellogénine



# LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

## Figures

### CHAPITRE I

Figure I-1 : Liens entre les différents niveaux d'organisation biologique (modifié d'après Lagadic et al. 1997 ; Clements 2000).....	46
Figure I-2 : Intérêts des méthodologies d'encagement <i>in situ</i> d'organismes transplantés (modifié d'après Baird et al. 2007b).....	60
Figure I-3 : Etapes nécessaires pour le développement et l'utilisation d'un marqueur <i>in situ</i> .....	66
Figure I-4 : Caractéristiques des différents modèles de dynamique de population en terme de généricité et de complexité (modifié d'après Forbes et al. 2008, Pastorok et al. 2003).....	69
Figure I-5 : Graphe de cycle de vie d'une population divisée en $\omega = 5$ classes d'âges. Les taux de survie $S_i$ et de fécondité $f_i$ sont spécifiques pour chaque classe d'âge.....	72
Figure I-6 : Illustration simplifiée du concept d' <i>Adverse Outcome Pathway</i> (modifié d'après Kramer et al. 2011). .....	89
Figure I-7 : Exemple d'utilisation de la démarche des <i>Adverse Outcome Pathway</i> dans les approches prédictives (Miller et al. 2007).....	90

### CHAPITRE II

Figure II-1 : Répartition géographique de <i>Gammarus fossarum</i> en Europe (Barnard and Barnard 1983).....	99
Figure II-2 : Vue latérale d'un <i>Gammaridae</i> (modifiée d'après (Chevreux and Fage 1970 ; Roux 1970).....	100
Figure II-3 : Uropode 3 de <i>G. fossarum</i> (A) et <i>G. pulex</i> (B). .....	101
Figure II-4 : Clé de détermination de <i>G. fossarum</i> (Felten 2003).....	103



Figure II-5 : Coupe latérale d'un <i>Gammaridae</i> présentant les principaux organes (Schmitz 1992). .....	104
Figure II-6 : Système reproducteur d'un <i>Gammaridae</i> mâle (a) et femelle (b) (Schmitz 1992).....	106
Figure II-7 : <i>Gammarus fossarum</i> mâle et femelle en précopula.....	107
Figure II-8 : Caractérisation du cycle de mue chez la femelle <i>G. fossarum</i> (modifié d'après (Geffard et al. 2010). ....	107
Figure II-9 : Stades embryonnaires et corrélation avec les stades de mues chez la femelle <i>G. fossarum</i> (Xuereb et al. 2009a).....	108
Figure II-10 : Vue générale de <i>P. antipodarum</i> . ....	116
Figure II-11 : Anatomie d'une femelle <i>P. antipodarum</i> (modifié d'après(Fretter and Graham 1994). .....	119
Figure II-12 : Localisation géographique du site de prélèvement de <i>G. fossarum</i> sur la Bourbre..	127
Figure II-13 : Prélèvement des organismes au troubleau et tri sur la colonne de tamis. ....	128
Figure II-14 : Installations pour la stabulation des organismes au laboratoire.....	129
Figure II-15 : Photo du dispositif expérimental utilisé pour l'étude du taux d'alimentation et du taux de croissance.....	131
Figure II-16 : Photo du dispositif expérimental utilisé pour l'étude de la reproduction. ....	133
Figure II-17 : Système d'encagement <i>in situ</i> pour les organismes de <i>G. fossarum</i> . ....	136
Figure II-18 : Caisse contenant les systèmes d'encagement.....	137
Figure II-19 : Localisation géographique des sites de suivi de population de <i>G. fossarum</i> sur l'Ardières et <i>P. antipodarum</i> sur le Rhône.....	140
Figure II-20 : A) Illustration de la méthodologie de prélèvement des organismes au Surber ; B) illustration de l'estimation du pourcentage des différents substrats dans la rivière.....	141
Figure II-21 : Observation du 5 <sup>ème</sup> segment du mésosoma de <i>G. fossarum</i> chez le mâle et le femelle A) un mâle de <i>G. fossarum</i> avec la présence des papilles génitales et B) une femelle de <i>G. fossarum</i> chez qui les papilles génitales sont absentes. ....	142
Figure II-22 : Relation entre la taille totale (en mm, de la base de l'antenne à la fin du métasoma) et la taille du pédoncule 2 de l'antenne (en mm) chez <i>G. fossarum</i> . ....	144
Figure II-23 : Systèmes d'encagement <i>in situ</i> pour les organismes de <i>P. antipodarum</i> .....	149

### CHAPITRE III

Figure III-1 : Influence de la taille, de la température et de la conductivité sur le taux d'alimentation ( <i>FR</i> ) de <i>G. fossarum</i> au laboratoire.....	163
Figure III-2 : Durée (jours) des différents stades du cycle de mue de <i>G. fossarum</i> pour les trois températures : 7,0 (0,05) °C ; 12,1 (0,01) °C et 16,4 (0.3) °C et les deux conductivités : 200 (50) $\mu\text{S.cm}^{-1}$ et 600 (50) $\mu\text{S.cm}^{-1}$ du début du cycle jusqu'à la mue, durée estimée avec un modèle par stade, par température et par conductivité. ....	166
Figure III-3 : Durée (jours) des différents stades du cycle de mue de <i>G. fossarum</i> pour les trois températures : 7,0 (0,05) °C ; 12,1 (0,01) °C et 16,4 (0.3) °C du début du cycle jusqu'à la mue estimées avec le modèle 3 (un modèle par stade et par température). ....	168
Figure III-4 : Relation entre température (°C) et durée (jours) des différents stades du cycle de mue de <i>G. fossarum</i> .....	169
Figure III-5 : Influence de la taille et du stade de mue sur le nombre d'ovocytes par femelle de <i>G. fossarum</i> . ....	170
Figure III-6 : Influence de la température et de la conductivité sur le nombre d'ovocytes par femelle de <i>G. fossarum</i> normalisé par la taille des femelles (résidus du modèle linéaire entre le nombre d'ovocytes et la taille) pour les trois températures : 7,0 (0,05) °C ; 12,1 (0,01) °C et 16,4 (0.3) °C et les deux conductivités : 200 (50) $\mu\text{S.cm}^{-1}$ et 600 (50) $\mu\text{S.cm}^{-1}$ . ....	171
Figure III-7 : Influence de la taille et du stade de développement sur le nombre d'embryons par femelle de <i>G. fossarum</i> .....	172
Figure III-8 : Influence de la température et de la conductivité sur le nombre d'embryons par femelle de <i>G. fossarum</i> normalisé par la taille des femelles (résidus du modèle linéaire entre le nombre d'ovocytes et la taille) pour les trois températures : 7,0 (0,05) °C ; 12,1 (0,01) °C et 16,4 (0.3) °C et les deux conductivités : 200 (50) $\mu\text{S.cm}^{-1}$ et 600 (50) $\mu\text{S.cm}^{-1}$ . ....	173
Figure III-9 : Evolution de la taille (en mm) des deux classes de <i>G. fossarum</i> pour les trois températures : 6,8 (0,03) °C ; 12,1 (0,2) °C et 16,1 (0.1) °C et les deux conductivités au cours des 46 jours d'exposition.....	175
Figure III-10 : Localisation des différents sites d'encagement <i>in situ</i> de <i>G. fossarum</i> . ....	180
Figure III-11 : Mesure du taux d'alimentation de <i>G. fossarum in situ</i> dans des sites de référence en octobre 2009 (R1-R12) et juin 2010 (R13-R24).....	181

Figure III-12 : Relation entre le taux d'alimentation ( $\text{mm}^2 \cdot \text{jour}^{-1} \cdot \text{organisme}^{-1}$ ) de <i>G. fossarum</i> et la température ( $^{\circ}\text{C}$ ) au laboratoire (points gris) et durant les encagements <i>in situ</i> dans les sites de référence (points noirs). .....	182
Figure III-13 : Influence de la température sur la durée du cycle de reproduction de <i>G. fossarum in situ</i> . .....	185
Figure III-14 : Mesure du taux de croissance <i>in situ</i> de <i>G. fossarum</i> aux différentes saisons sur la Bourbre. ....	187
Figure III-15 : Mesure du taux d'alimentation de <i>G. fossarum in situ</i> dans des sites contaminés en octobre 2009 (P1-P15) et juin 2010 (P16-R41).....	190
Figure III-16: Mesure du taux d'alimentation de <i>G. fossarum in situ</i> sur le Lot aux quatre saisons et sur le bassin versant de l'Amous au printemps lors d'études de l'impact de rejets miniers (les sites de référence sont en gras).....	192
Figure III-17 : Localisation des différents sites d'encagements <i>in situ</i> de <i>G. fossarum</i> . ....	194

#### CHAPITRE IV

Figure IV-1 : Graphe du cycle de vie de <i>G. fossarum</i> avec une discrétisation en cinq classes de taille. ....	218
Figure IV-2 : Suivi démographique mensuel de la population de <i>G. fossarum</i> entre novembre 2008 et novembre 2009.....	221
Figure IV-3 : Fécondité moyenne des femelles de <i>G. fossarum</i> (en nombre d'embryons par femelle) pour chacune des trois classes d'adultes. ....	223
Figure IV-4 : Effet de la température sur la durée du cycle de reproduction <i>in situ</i> de <i>G. fossarum</i> . .....	224
Figure IV-5 : Evolution de la taille des trois classes de <i>G. fossarum</i> de l'Ardières pour les trois températures au cours des 56 jours d'exposition.....	226
Figure IV-6 : Mesure du taux de croissance <i>in situ</i> de <i>G. fossarum</i> de l'Ardières aux différentes saisons pour deux à trois classes de tailles.....	228
Figure IV-7 : Illustration théorique du calcul des taux de transition pour la classe J1.....	234
Figure IV-8 : Evolution saisonnière de la structure en taille stable de la population de <i>G. fossarum</i> .....	238

Figure IV-9 : Variations saisonnières du taux de croissance asymptotique $\lambda$ de la population de <i>G. fossarum</i> .....	239
Figure IV-10 : Sensibilité du taux d'accroissement asymptotique annuel $\lambda$ de la population de <i>G. fossarum</i> aux paramètres de survie, de fécondité et de croissance (réduction de 10 %).....	240
Figure IV-11 : Sensibilité saisonnière du taux d'accroissement asymptotique mensuel $\lambda$ de <i>G. fossarum</i> aux paramètres de survie, fécondité et croissance.....	242
Figure IV-12 : Graphe du cycle de vie de <i>P. antipodarum</i> avec une discrétisation en cinq classes de taille. ....	244
Figure IV-13 : Suivi démographique mensuel de la population de <i>P. antipodarum</i> entre octobre 2009 et octobre 2010. ....	248
Figure IV-14 : Fécondité potentielle moyenne des femelles de <i>P. antipodarum</i> (en nombre d'embryons par femelle dans la poche embryonnaire) pour chacune des trois classes d'adultes. ....	251
Figure IV-15 : Effet de la température (°C) sur la fécondité réalisée (néonates.jour <sup>-1</sup> .individu <sup>-1</sup> ) des femelles de <i>P. antipodarum</i> .....	253
Figure IV-16 : Evolution de la taille (mm) des différentes classes de <i>P. antipodarum</i> lors des différents encagements. ....	255
Figure IV-17 : Effet de la température (°C) sur le taux de croissance (mm.jour <sup>-1</sup> ) de <i>P. antipodarum</i> . ....	256
Figure IV-18 : Evolution saisonnière de la structure en taille stable de la population de <i>P. antipodarum</i> .....	262
Figure IV-19 : Variations saisonnières du taux de croissance asymptotique $\lambda$ de la population de <i>P. antipodarum</i> .....	264
Figure IV-20 : Sensibilité du taux d'accroissement asymptotique annuel $\lambda$ de la population de <i>P. antipodarum</i> aux paramètres de survie, de fécondité et de croissance (réduction de 10 %)...	265
Figure IV-21 : Sensibilité du taux d'accroissement asymptotique mensuel $\lambda$ de <i>P. antipodarum</i> aux paramètres de survie, fécondité et croissance. ....	267
Figure IV-22 : Carte du bassin versant de l'Ardières. ....	268

Figure IV-23 : Impact sur le taux d'accroissement asymptotique de la population de <i>G. fossarum</i> (valeur normalisée par rapport au site <i>Amont 1</i> ) des effets individuels observés en aval de la station d'épuration.....	272
Figure IV-24 : Structure en taille stable de la population de <i>G. fossarum</i> dans les différents sites en amont et en aval de la STEP.....	274
Figure IV-25 : Impact sur le taux d'accroissement asymptotique annuel de la population de <i>G. fossarum</i> (valeur normalisée par rapport au site <i>Amont 1</i> ) des effets individuels observés dans le site <i>Aval 1</i> . ....	275
Figure IV-26 : Impact sur le taux d'accroissement asymptotique annuel de la population de <i>G. fossarum</i> (valeur normalisée par rapport au site <i>Amont 1</i> ) des effets individuels observés dans le site <i>Aval 2</i> . ....	276

## Tableaux

### CHAPITRE I

Tableau I-1 : Exemples d'études observant un effet de la température sur la réponse de différents marqueurs utilisés lors de biotests <i>in situ</i> chez différentes espèces d'invertébrés aquatiques et de poissons.....	55
Tableau I-2 : Principaux modèles scalaires utilisés pour étudier la croissance d'une population (modifié d'après Massarin 2010). ....	71
Tableau I-3 : Liste des différentes caractéristiques populationnelles calculées à partir d'un modèle de Leslie avec leur signification mathématique et biologique (modifié d'après Charles et al. 2009).....	74
Tableau I-4 : Liste non exhaustive de l'utilisation des modèles matriciels en écotoxicologie.....	76

### CHAPITRE II

Tableau II-1 : Classification de <i>G. fossarum</i> (Martin and Davis 2001).....	97
Tableau II-2 : Utilisation de <i>G. fossarum</i> , <i>G. pulex</i> et de quelques espèces proches en écotoxicologie aquatique.....	111

Tableau II-3 : Classification de <i>P. antipodarum</i> (Ponder and Lindberg 1997; Gust 2010). .....	116
Tableau II-4 : Utilisation de <i>P. antipodarum</i> en écotoxicologie aquatique. ....	122

### CHAPITRE III

Tableau III-1 : Durée moyenne de chacun des stades de mue de <i>G. fossarum</i> pour les différentes conditions estimée avec l'ajustement d'un modèle par condition expérimentale. ....	167
Tableau III-2 : Caractéristiques des 24 déploiements lors des encagements <i>in situ</i> de <i>G. fossarum</i> dans les 13 sites de référence. ....	179
Tableau III-3 : Paramètres physico-chimique des différents encagements <i>in situ</i> de <i>G. fossarum</i> . ..	184
Tableau III-4 : Caractéristiques des encagements <i>in situ</i> de <i>G. fossarum</i> dans les 15 sites contaminés .....	189
Tableau III-5 : Caractéristiques des encagements <i>in situ</i> de <i>G. fossarum</i> sur le Lot pour les différentes saisons. ....	195
Tableau III-6 : Caractéristiques des encagements <i>in situ</i> de <i>G. fossarum</i> dans le bassin versant de l'Amous. ....	195

### CHAPITRE IV

Tableau IV-1 : Récapitulatif des dates des différents suivis mensuels de <i>G. fossarum</i> ainsi que de la température moyenne de l'eau mesurée pour chacun des mois. ....	220
Tableau IV-2 : Durée du cycle de reproduction des femelles de <i>G. fossarum</i> pour chacun des mois du suivi de population estimée à partir de la relation entre température et durée du cycle de reproduction (Eq III-6). ....	225
Tableau IV-3 : Paramètres physico-chimiques des différents encagements <i>in situ</i> de <i>G. fossarum</i> de l'Ardières et taille de départ (mm) des différentes classes d'organismes. ....	227
Tableau IV-4 : Estimation des taux de fécondité $f_{i,k}$ pour les trois classes d'adultes ( $i = 3$ à $5$ ) de <i>G. fossarum</i> lors des $k$ mois du suivi de population (production de juvéniles par mois et par femelle).....	231
Tableau IV-5 : Estimation des taux de passage mensuels d'une classe à une autre lors des différents mois du suivi de population de <i>G. fossarum</i> . ....	233

Tableau IV-6 : Estimation des taux de survie de apparents <i>G. fossarum</i> pour les cinq classes de taille lors des différents mois du suivi de population.....	235
Tableau IV-7 : Estimation des taux de survie corrigés de <i>G. fossarum</i> par « lissage » sur une fenêtre de trois mois pour les cinq classes de taille lors des différents mois du suivi de population .....	236
Tableau IV-8 : Récapitulatif des dates des différents suivis mensuels de <i>P. antipodarum</i> ainsi que de la température moyenne de l'eau mesurée pour chacun des mois. ....	246
Tableau IV-9 : Récapitulatif des dates des différents engagements <i>in situ</i> de <i>P. antipodarum</i> ainsi que de la température moyenne de l'eau mesurée et des marqueurs qui ont pu être mesurés. ....	247
Tableau IV-10 : Evolution du pourcentage de femelles de <i>P. antipodarum</i> en reproduction au cours de l'année de suivi. ....	250
Tableau IV-11 : Estimation des taux de fécondité $f_{i,k}$ pour les trois classes d'adultes ( $i = 3$ à $5$ ) de <i>P. antipodarum</i> lors des $k$ mois du suivi de population (production de néonates par mois et par femelle)	258
Tableau IV-12 : Estimation des taux de passage mensuels d'une classe à une autre lors des différents mois du suivi de population de <i>P. antipodarum</i> . ....	260
Tableau IV-13 : Estimation des taux de survie de apparents <i>P. antipodarum</i> pour les cinq classes de taille lors des différents mois du suivi de population.....	261







**INTRODUCTION GENERALE**



L'accroissement des activités industrielles et agricoles ainsi que l'expansion de l'urbanisation sont à l'origine d'une augmentation croissante des rejets de contaminants dans l'environnement avec comme réceptacle final les milieux aquatiques. Ainsi, plus de 100.000 molécules chimiques liées à des activités humaines sont retrouvées dans l'environnement (Depledge and Galloway 2005). Cette contamination des milieux aquatiques constitue une préoccupation majeure, que ce soit dans l'opinion publique ou pour la communauté scientifique (Schwarzenbach et al. 2006) et a ainsi conduit à la mise en place de plusieurs réglementations nationales et internationales. Nous pouvons notamment citer la Directive Cadre sur l'Eau (2000/60/CE, DCE) qui vise à prévenir et réduire la contamination des eaux, promouvoir une utilisation durable des ressources, protéger l'environnement et améliorer l'état chimique et écologique des écosystèmes aquatiques, ou encore le programme d'enregistrement, Evaluation et Autorisation des substances Chimiques (REACH) qui a pour rôle d'assurer un niveau élevé de protection pour la santé humaine et l'environnement contre les dangers que peuvent poser les produits chimiques mis sur le marché. Ces réglementations conduisent à une multiplication des évaluations écotoxicologiques pour diagnostiquer et/ou prédire une dégradation potentielle de la qualité des milieux aquatiques.

Depuis quelques décennies, l'écotoxicologie, discipline située notamment à l'interface de l'écologie et de la toxicologie, tente de répondre à ces questionnements. L'écotoxicologie est définie comme la discipline qui évalue les effets des perturbations physiques et chimiques sur les êtres vivants, les voies de transfert des contaminants et leurs actions sur l'environnement (Truhaut 1977). Elle vise à offrir des données et des méthodologies permettant la gestion des risques de contaminations *via* la prédiction de leurs impacts sur la santé et les écosystèmes. Jusqu'à présent, l'écotoxicologie a principalement développé des connaissances au laboratoire, sur des espèces modèles (*e.g.* clones de Daphnies, souches de Chironomes, lignées de poissons *Pimephales*, *Danio*, *etc.*), autour des effets des contaminants au niveau sub-individuel et individuel. Aujourd'hui, l'écotoxicologie élargit ses objectifs en se questionnant sur la pertinence écologique de l'évaluation du risque qu'elle propose : qu'en est-il des effets potentiels ou actuels pour les biocénoses des milieux contaminés (Chapman 2002 ; Van Straalen 2003 ; Relyea and Hoverman 2006 ; Schmitt-Jansen et al. 2008)?

Jusqu'à présent, la démarche réductionniste adoptée par l'écotoxicologie ne permettant pas de répondre aux échelles d'organisation d'intérêt (*i.e.*, population, communauté) fixées par les réglementations environnementales, des approches plus systémiques tournées vers l'écologie sont

actuellement mises en œuvre (Baird et al. 2007 ; Liber et al. 2007). Afin de pouvoir tenir compte de la complexité des systèmes écologiques étudiés, deux méthodes principales sont proposées : 1- analyser directement la réponse des niveaux plus intégrés (*i.e.*, population, communauté : Hickey and Clements 1998 ; Baird and Van den Brink 2007 ; Moser et al. 2007) ou 2- expliciter les liens entre les niveaux d'organisation inférieurs (sub-individuel et individuel) et les niveaux populationnels ou communautaires en faisant appel à la modélisation (Calow and Forbes 1998 ; Ares 2003 ; Forbes et al. 2006 ; Forbes et al. 2008 ; Manyin and Rowe 2008 ; Crone et al. 2009 ; Pedersen et al. 2009).

La pertinence de cette deuxième approche basée sur la méthodologie d'extrapolation entre différents niveaux d'organisation biologique est conditionnée par la possibilité d'explicitier des liens mécanistes entre les réponses à ces différents niveaux d'organisation (Calow and Forbes 1998 ; Ares 2003 ; Forbes et al. 2006 ; Forbes et al. 2008 ; Manyin and Rowe 2008 ; Crone et al. 2009 ; Pedersen et al. 2009). Comprendre les liens entre ces différents niveaux d'organisation représente actuellement l'une des préoccupations centrales de la communauté des écotoxicologues (Forbes et al. 2006 ; Baird et al. 2007a ; Liber et al. 2007 ; Forbes et al. 2008 ; Galic et al. 2010 ; Hommen et al. 2010) pour proposer des outils interprétables en termes de relation causale avec la contamination chimique ainsi qu'en termes d'impact sur la fitness de la population dans les milieux concernés. Les modèles démographiques de dynamique de population ont ainsi été proposés comme de bons outils pour réaliser ces liens. Caswell (1996) propose une méthodologie permettant d'appréhender l'impact populationnel des contaminations à partir des effets obtenus lors d'expériences d'exposition de petits groupes d'individus (*i.e.*, bioessais). Ces bioessais rendent compte des effets d'un toxique en particulier (*i.e.*, lors d'expérience au laboratoire, en mésocosmes) ou de la contamination globale d'un site (*i.e.*, *via* des encagements *in situ* d'organismes) sur différents traits de vie tels que les taux de survie, les taux de fécondité ou encore les taux de croissance. En appliquant ces effets au niveau des paramètres d'entrée de modèles de dynamique de population, il est alors possible de calculer différents indicateurs (*i.e.*, taux d'accroissement asymptotique de la population, structure en taille ou en âge stable, temps de génération, valeurs reproductives, *etc.*) qui permettent de décrire les effets sur une population (Caswell 1996 ; Lopes et al. 2005 ; Billoir et al. 2007 ; Charles et al. 2009). Cependant, bien que cette démarche d'extrapolation entre niveau individuel et populationnel soit bien acceptée d'un point de vu théorique, les exemples concrets restent encore relativement rare et concernent principalement des études prédictives de l'impact des contaminants au laboratoire (Miller et al. 2007 ; Manyin and Rowe 2008 ; Pedersen et al. 2009).

Les modèles utilisés à l'heure actuelle, encore très simples, doivent être améliorés pour pouvoir être utilisés lors du diagnostic de la qualité des milieux aquatiques et proposer une évaluation au niveau populationnel qui soit pertinente et réaliste d'un point de vue écologique. Ainsi, plusieurs questions restent encore en suspens. De nombreux facteurs sont susceptibles de conférer des différences de sensibilité populationnelle lors de l'exposition à un facteur de stress toxique. Par exemple, plusieurs études commencent à souligner des différences de sensibilité entre populations ou entre espèces (Amiard-Triquet et al. 2011) qui devraient être prises en compte. Nous pouvons également nous demander s'il est nécessaire de tenir compte de la variabilité saisonnière de la dynamique des populations.

En outre, ces modèles intègrent généralement des effets observés lors de l'étude de l'altération de traits de vie tels que la croissance ou la reproduction lors de l'exposition aux contaminants. Une des difficultés lors de l'étude de ces traits de vie et de l'interprétation démographique de leur altération est qu'ils sont fortement influencés par des perturbations toxiques mais aussi par des facteurs environnementaux (*e.g.*, température ou conductivité de l'eau notamment) et biotiques (*e.g.*, taille, sexe, statut reproducteur...) qui peuvent constituer ainsi des facteurs de confusion pour la lecture des effets toxiques, en particulier lors d'expérimentation *in situ* pour lesquelles ces facteurs sont difficilement contrôlables. Là encore, les méthodes de modélisation représentent des outils intéressants afin de modéliser l'influence de ces facteurs de confusion (Maltby et al. 2002 ; Moreira et al. 2006 ; Krell et al. 2011). En effet, ces méthodes rendent possible la définition de gammes de valeurs de références qui tiennent compte de l'influence de ces facteurs sur les traits de vie en absence de contamination. Ainsi, il devient possible d'intégrer dans les modèles de dynamique de populations des effets qui correspondent bien à une réponse des organismes face à un stress toxique et non pas à un effet de l'environnement.

Centré sur l'utilisation de *Gammarus fossarum* et *Potamopyrgus antipodarum* comme « espèces sentinelles », c'est dans ce contexte que ce travail doctoral a été mis en place avec un double objectif :

- 1- d'une part, avancer dans la compréhension des réponses biologiques observées sur le terrain au niveau individuel. Pour cela, nous avons développé une méthodologie permettant de prendre en compte l'influence des facteurs de confusion (*e.g.*, température, conductivité de l'eau, taille, sexe, stade de développement) pour la lecture des tests *in situ* utilisant des traits de vie démographiques comme marqueurs de toxicité (*i.e.*, reproduction, croissance, alimentation).

2- et d'autre part, développer une méthodologie permettant l'interprétation au niveau populationnel des effets mesurés lors de ces tests en nous focalisant sur l'influence des histoires de vie dans la sensibilité démographique des populations (variabilité entre espèces et variabilité saisonnière). Pour cela, nous avons mis en place une double approche combinant un travail expérimental (*e.g.*, suivi démographique, engagements *in situ*) et de modélisation.

Ce document se structure en quatre chapitres. Le **chapitre I** est une synthèse bibliographique centrée sur l'évaluation de la qualité écotoxicologique des milieux aquatiques et plus particulièrement sur les apports des approches multi-échelles et de l'utilisation des modèles dans ce contexte. Le **chapitre II** présente de manière détaillée les deux espèces que nous avons choisies pour répondre à nos objectifs : le crustacé amphipode *Gammarus fossarum* et le mollusque gastéropode *Potamopyrgus antipodarum* ainsi que les différents protocoles des expérimentations mises en oeuvre durant ce travail (*i.e.*, expérimentations au laboratoire, encagement *in situ*, suivi démographique des populations). Le **chapitre III** présente les résultats obtenus pour répondre au premier objectif traitant de l'amélioration de la lecture des tests *in situ* au niveau individuel chez *Gammarus fossarum* via la prise en compte de l'influence des principaux facteurs de confusions. Le **chapitre IV** présente les modèles de dynamique de populations que nous avons développés pour nos deux espèces. Il se découpe en deux grandes sous-parties : 1-une première centrée sur la construction des modèles de dynamique de population pour nos deux espèces et sur leur analyse afin de répondre à nos questions concernant la comparaison de la sensibilité démographique de nos deux espèces ainsi que les variations saisonnières de cette sensibilité ; et 2-une deuxième partie qui est une illustration à partir d'un cas d'étude chez *Gammarus fossarum* nous permettant de souligner sur un cas concret (*i.e.*, l'étude de l'impact d'une station d'épuration) les intérêts de nos modèles de dynamique de populations pour l'évaluation écotoxicologique des effets observés *in situ*. Enfin, ce manuscrit se termine par une **conclusion** sur les principaux résultats obtenus au cours de ce travail doctoral ouvrant sur les perspectives envisagées.







## CHAPITRE I

### Synthèse bibliographique

Le premier chapitre de ce travail est une synthèse bibliographique des approches actuelles relatives aux différentes méthodes d'évaluation de l'impact des contaminants chimiques sur la qualité biologique des milieux aquatiques à travers l'étude des différents niveaux d'organisation biologiques (*e.g.*, cellule, tissus, organisme, population) et au rôle de la modélisation lors de l'étude de ces différents niveaux. L'accent étant mis particulièrement sur l'utilisation de la modélisation statistique et dynamique en écotoxicologie afin 1- **d'appréhender l'influence des facteurs de confusion** pour la lecture des biotests, en particulier *in situ*, et de souligner comment la modélisation peut ainsi permettre de les **rendre comparables dans le temps et l'espace** ; 2 - **d'extrapoler les effets observés lors des tests réalisés sur des marqueurs individuels vers des effets potentiels au niveau des populations.**



## **1 Nécessité d'une évaluation multi-échelles des effets des contaminants dans les milieux aquatiques**

### 1.1 Les limites de l'approche chimique

Dans les écosystèmes aquatiques, les organismes vivants sont constamment exposés à de nombreux facteurs de stress d'intensité variable, que ce soit des facteurs de stress chimiques liés à la présence de contaminants dans le milieu (*e.g.*, pesticides, métaux) ou des facteurs de stress physiques liés à des modifications de l'habitat (*e.g.*, réchauffement climatique, canalisations, barrages). L'évaluation de la qualité des milieux aquatiques, qu'il s'agisse des milieux marins ou dulçaquicoles, constitue donc une priorité pour les gestionnaires. Ce constat a conduit dans un premier temps les écotoxicologues à évaluer l'état écologique des milieux aquatiques en recherchant divers contaminants (*e.g.*, pesticides, métaux, composés organiques, médicaments) *via* des dosages chimiques dans la colonne d'eau, les sédiments ou encore à travers la mesure de bioaccumulation de ces composés dans les organismes. Cependant, il est rapidement apparu que les analyses chimiques ne pouvaient, à elles seules, suffire pour évaluer les effets des contaminants sur les écosystèmes aquatiques. En effet, chaque jour, de nouvelles substances chimiques sont découvertes et utilisées par les différents acteurs sociaux. Ainsi, on estime que plus de 100.000 molécules chimiques liées à des activités humaines sont retrouvées dans l'environnement avec comme réceptacle final les différents écosystèmes aquatiques (*e.g.*, lacs, rivières, mers, océans) (Depledge and Galloway 2005). Il devient alors évident qu'il est impossible d'envisager de toutes les rechercher par des dosages chimiques lors de l'évaluation de la qualité de l'eau sur un site donné. De plus, une analyse chimique seule ne permet pas de déterminer si une substance ou un mélange de substances ont, ou non, des effets sur les différentes espèces composant l'écosystème. C'est pourquoi, dans un second temps, l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques s'est appuyée sur une double approche comprenant d'une part des analyses chimiques et d'autre part des analyses de l'état écologique des biocénoses. Pour analyser ces dernières, différents indicateurs biologiques ont alors été développés.

## 1.2 Les indices au niveau des communautés

Historiquement, l'évaluation de la qualité d'un milieu et sa surveillance dans le temps à partir de l'étude des organismes aquatiques a commencé en s'appuyant sur le suivi d'indicateurs basés sur la présence et l'abondance de différentes espèces animales et végétales. De nombreuses revues font état de l'emploi de ces bioindicateurs communautaires (Blandin et al. 1986 ; Rosenberg and Resh 1993 ; Archaimbault 2003), nous ne les aborderons que très succinctement dans ce rapport. En France, plusieurs de ces indices ont fait l'objet d'une normalisation ou d'une standardisation (*e.g.*, Indice Biologique Global Normalisé, Indice Biologique Diatomées, Indice Poisson Rivière, Indice Biologique Macrophyte en Rivière, Indice Oligochète de Bioindication des Sédiments). Les invertébrés aquatiques représentent des modèles très intéressants pour de tels indicateurs de part leurs avantages méthodologiques (*e.g.*, facile à échantillonner, manipuler, transporter) et leur pertinence écologique (*e.g.*, grande diversité phylogénétique, forte variabilité des modes de vie, importante sensibilité aux contaminants). Depuis l'adoption par la communauté européenne de la Directive Cadre sur l'Eau (*i.e.*, DCE, 2000/60/CE) et la publication de la directive fille (*i.e.*, 2008/105/CE), évaluer l'état écologique des milieux aquatiques, améliorer cet état ou maintenir un bon état sont des défis auxquels sont confrontés les écotoxicologues, les écologues et les gestionnaires des milieux aquatiques. L'étude des communautés d'invertébrés a permis de fournir des données pertinentes sur l'état écologique des milieux aquatiques. Toutefois deux grandes limites à l'utilisation de ces indices peuvent être soulignées (Lacaze 2011) : 1- tout d'abord, il est impossible de discriminer les effets toxiques dus à la présence de contaminants, des effets écologiques liés à une altération de l'habitat par exemple. Ainsi, ces indicateurs sont à l'heure actuelle très peu spécifiques et ne permettent pas de discriminer la nature du stress toxique et les mécanismes d'action sous-jacents. 2- ces indices sont très peu précoces puisqu'ils sont basés en grande partie sur la présence ou non de certaines espèces et ne permettent donc que de constater les effets passés d'une contamination. Or, ces différents critères (spécificité et précocité) sont indispensables pour une évaluation pertinente de la qualité des milieux aquatiques et notamment pour répondre aux questions soulevées par la DCE.

### 1.3 : Nécessité d'une approche multi-échelles

Afin de tenir compte de ces limites, une alternative aux indices de communauté a été récemment proposée : l'étude de l'effet des contaminations au niveau des organismes (Allan et al. 2006 ; Chapman 2007 ; Dagnino et al. 2008 ; Damásio et al. 2008) sur des espèces sentinelles représentatives du milieu étudié (Cairns and Pratt 1993 ; Lagadic et al. 1997). Ces espèces peuvent alors être étudiées à différentes échelles biologiques à travers l'analyse de marqueurs au niveau sub-individuel (*e.g.*, cellule, tissu), individuel (*e.g.*, traits de vie, comportement) ou populationnel (*e.g.*, densités, structure en classes, taux de croissance de la population).

L'étude des différents niveaux d'organisation biologique représente de nos jours une approche incontournable en écotoxicologie (Lagadic et al. 1997 ; Clements 2000 ; Amiard and Amiard-Triquet 2008). En effet, un des objectifs majeurs de l'écotoxicologie est d'intégrer toutes les informations depuis la source d'une contamination jusqu'à ses conséquences au niveau des populations afin d'atteindre une échelle pertinente en terme de fonctionnalité (Newman and Clements 2008). Au delà des effets avérés sur la cellule, le tissu ou l'individu, il s'agit de savoir si ces effets peuvent être traduits à un niveau d'organisation biologique supérieur. Par exemple, il s'agit de comprendre si les effets observés en aval d'une station d'épuration ou d'une zone industrielle auront à long terme des conséquences néfastes sur la dynamique des populations autochtones. Ou encore, dans une démarche prédictive, de comprendre si les effets observés lors de l'évaluation d'une nouvelle substance chimique sont limités à des conséquences sub-individuelles sur certaines fonctions précises de l'organisme ou si les populations et les écosystèmes potentiellement exposés risquent d'être perturbés.

Le grand intérêt de ces approches multi-échelles réside dans le fait que l'étude des différents niveaux d'organisation va permettre d'offrir une évaluation à la fois sensible, spécifique, précoce et pertinente d'un point de vue écologique (**Figure I-1**). Ainsi, les niveaux d'organisation biologiques inférieurs (*e.g.*, cellule, tissu) sont généralement sensibles, spécifiques à certains types de contaminants et très précoces (Hanson 2009b) mais peu pertinents d'un point de vue écologique. A l'opposé, les niveaux d'organisation supérieurs (*e.g.*, population) sont généralement beaucoup moins spécifiques et précoces mais ils présentent une plus grande pertinence écologique et représentent donc de bons niveaux de compréhension pour répondre aux demandes des réglementations, à savoir l'effet des contaminants au niveau des populations naturelles et des biocénoses.

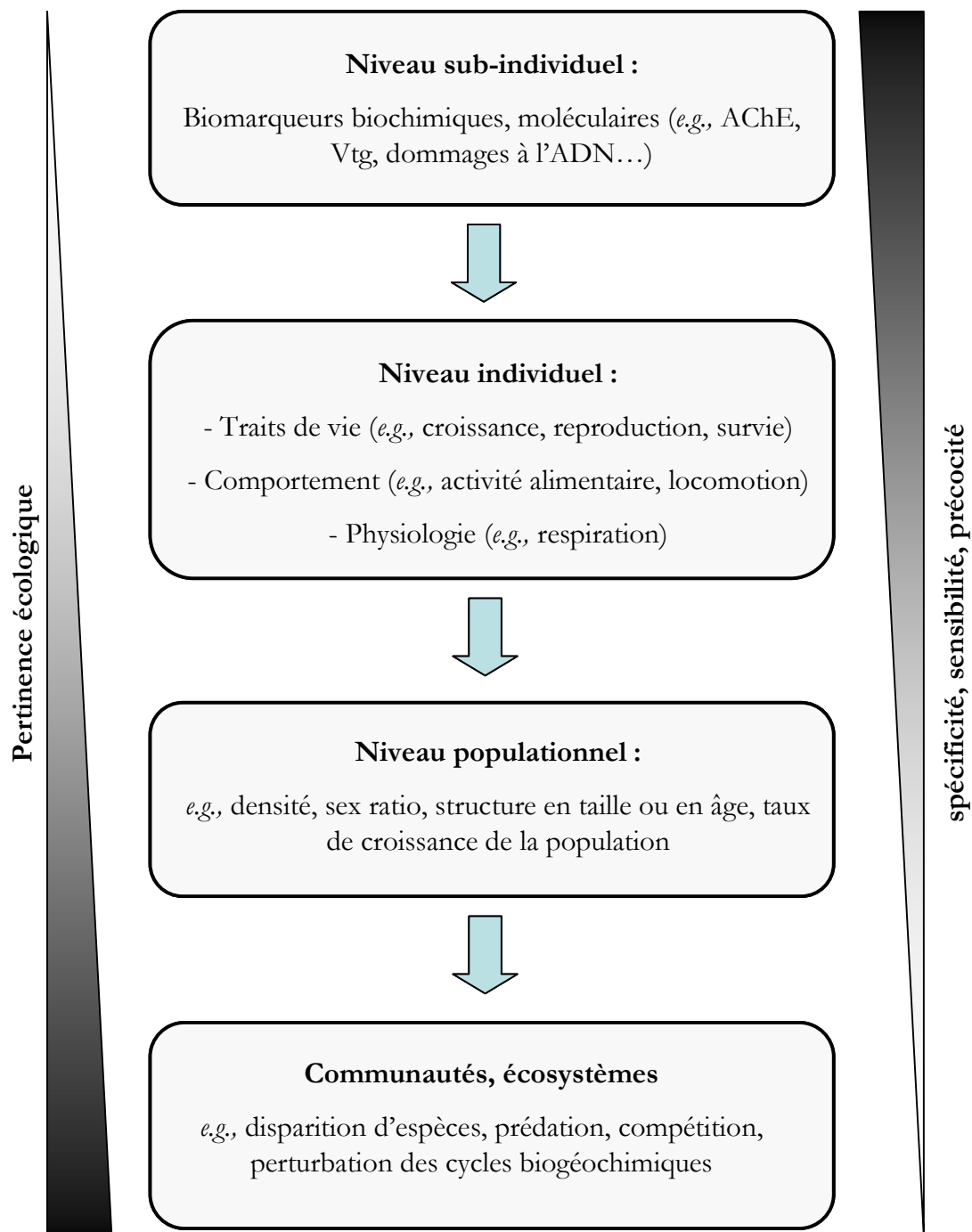


Figure I-1 : Liens entre les différents niveaux d'organisation biologique (modifié d'après Lagadic et al. 1997 ; Clements 2000).

Cette approche multi-échelles est particulièrement pertinente dans une optique de gestion du risque écologique car il est possible, en établissant des liens entre les différents niveaux d'organisation biologique, de comprendre à la fois précisément les modes d'action et les mécanismes sous-jacents d'une contamination, et de garantir une évaluation offrant une bonne

pertinence d'un point de vue écologique ; permettant ainsi de répondre aux exigences réglementaires.

Ainsi, cette méthodologie, contrairement aux méthodes de bioindication basées sur les indices de communautés, peut être utilisée aussi bien pour le diagnostic de la qualité des milieux aquatiques dans le cadre de la DCE par exemple, que dans le but de prédire l'effet d'une substance chimique particulière *via* des expérimentations au laboratoire ou en mésocosme. Or, depuis la mise en place du système REACH par la communauté européenne (Règlement CE n° 1907/2006) concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, les demandes d'évaluation de l'impact des substances chimiques ont considérablement augmenté ces dernières années et les connaissances dans les démarches prédictives sont ainsi de plus en plus importantes. En effet, le système REACH oblige les entreprises qui fabriquent et importent des substances chimiques à évaluer les risques résultant de leur utilisation et à prendre les mesures nécessaires pour gérer tout risque identifié. Il est donc nécessaire de développer des outils écologiquement pertinents afin de prédire l'impact des substances chimiques sur l'environnement.

L'utilisation d'une méthodologie commune entre ces deux volets de l'évaluation écotoxicologique offre ainsi la possibilité de faire des va-et-vient entre les connaissances acquises dans chacune de ces démarches, ceci étant d'autant plus aisé et pertinent lorsque les mêmes espèces sont utilisées dans les deux cas. Dans ce contexte, les invertébrés aquatiques sont particulièrement intéressants puisqu'ils sont utilisés de plus en plus couramment aussi bien au laboratoire pour des approches prédictives qu'*in situ* dans le cadre diagnostic.

Nous allons maintenant décrire brièvement les méthodologies utilisées pour analyser les effets des contaminations sur les différents niveaux d'organisation biologiques en nous intéressant aux niveaux sub-individuels, individuels et populationnels.

### 1.3.1 Le niveau sub-individuel

L'étude de l'impact des contaminants au niveau sub-individuel est principalement réalisée à partir de l'observation de biomarqueurs. Un biomarqueur désigne « *un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant* » (Lagadic et al. 1997).



Dans le présent travail, un biomarqueur se réfère à tous les paramètres sub-individuels biochimiques, moléculaires, cellulaires ou histologiques qui peuvent être observés ou mesurés dans les cellules, tissus ou les fluides corporels pour mettre en évidence l'exposition ou les effets d'un ou plusieurs contaminants chimiques (Depledge and Fossi 1994 ; Huggett et al. 2002). Les études comportementales, dont la classification en tant que biomarqueurs sub-individuels ou marqueurs individuels varie selon les auteurs, seront considérés dans ce travail comme des marqueurs individuels, en raison notamment des liens directs les reliant aux différents traits de vie (*e.g.*, lien entre taux d'alimentation et taux de croissance ou taux de reproduction) (Forbes et al. 2006).

Il est classique en écotoxicologie de distinguer trois types de biomarqueurs (Lagadic et al. 1997) : ceux informant quant à l'exposition à un contaminant, ceux révélant les effets de l'exposition à un contaminant et les biomarqueurs de sensibilité aux effets provoqués par l'exposition à un contaminant. Les premiers indiquent que le contaminant, présent dans l'environnement, a pénétré dans l'organisme. Généralement, ces biomarqueurs sont le résultat de l'interaction du contaminant avec des molécules présentes dans des tissus ou des liquides corporels. Par exemple, nous pouvons citer la formation d'adduits à l'ADN lors de l'exposition à des molécules cancérigènes ou génotoxiques comme les HAP. L'utilisation de biomarqueurs d'effet permet de montrer que le contaminant est entré dans l'organisme et a exercé un effet sur une cible précise. Enfin, les biomarqueurs de sensibilité tente de caractériser les bases génétiques de la variation des effets entre les individus.

Ces biomarqueurs opérant au niveau sub-individuel, en particulier ceux dits d'effets et de sensibilité aux effets, ils permettent généralement de déceler des effets à des concentrations inférieures au seuil engendrant une modification à des niveaux d'organisation supérieurs. Ce type d'outil peut donc constituer une mesure intégrative à court terme, ce qui est qualifiée par Hagger d'approche « proactive » dans une démarche d'évaluation du risque (Hagger et al. 2006). Ils présentent ainsi une capacité de prédiction que ne possèdent pas les indices de communauté. Contrairement à des approches chimiques, les biomarqueurs présentent également un caractère intégrateur du message toxique puisque l'organisme exposé n'intègre par définition que la fraction biodisponible des contaminants.

Cette séparation des biomarqueurs en trois grandes catégories a été récemment remise en question, en particulier en ce qui concerne la notion de biomarqueurs d'exposition et d'effet qui semble indiquer qu'il existerait nécessairement un lien direct de cause à effet entre l'exposition à un contaminant et son effet sur l'organisme, ce qui n'est pas toujours vérifié (De Lafontaine et al. 2000 ; Fossi Tankoua 2011). De nos jours, les écotoxicologues s'accordent plutôt à les regrouper en deux grandes catégories (Amiard and Amiard-Triquet 2008 ; Fossi Tankoua 2011) : 1- les biomarqueurs de défense qui regroupent les différents processus biochimiques mis en oeuvre par les organismes pour compenser l'action des contaminants et 2- les biomarqueurs de dommage qui correspondent aux marques laissées par le passage des contaminants dans l'organisme. Ils révèlent une atteinte biologique chez les individus exposés qui peut affecter leur fitness.

Idéalement, un biomarqueur doit pouvoir répondre aux critères suivants (Jemec et al. 2010) :

- d'un point de vue méthodologique, il doit être fiable, facile à utiliser et relativement peu coûteux
- la relation entre le temps d'exposition et la réponse du biomarqueur doit être connue
- l'influence des facteurs de confusion, biotiques et abiotiques, sur le niveau de base de la réponse doit être établi afin de pouvoir discriminer l'impact du contaminant de la variabilité naturelle saisonnière et inter-individuelle du marqueur
- son interprétation doit être claire et facile
- la relation entre la réponse du biomarqueur et le niveau d'exposition doit être déterminée (*e.g.*, relation dose réponse, effet à faible dose)
- il doit constituer un outil précoce, c'est à dire qu'il doit répondre rapidement à l'exposition aux polluants (McCarthy and Shugart 1990)
- des liens mécanistes doivent pouvoir être établis avec des niveaux d'organisation supérieurs pour pouvoir les interpréter en tant qu'indicateur de la fitness individuelle (Forbes et al. 2006)

De très nombreux biomarqueurs ont été développés en conditions contrôlées chez différentes espèces sentinelles au cours des 30 dernières années. Nous pouvons citer par exemple les biomarqueurs de génotoxicité qui permettent de mesurer les impacts sur l'ADN, de neurotoxicité (*e.g.*, activité AChE), de reprotoxicité (*e.g.*, anomalies des gonades, surfaces ovocytaires) ou encore les biomarqueurs liés au métabolisme énergétique. Ainsi le nombre d'études utilisant des biomarqueurs a augmenté de façon exponentielle depuis le début des années

1990 (Jemec et al. 2010). Ils peuvent être utilisés aussi bien dans des études réglementaires (*e.g.*, système REACH), que dans des études d'évaluation du risque environnemental (*e.g.*, évaluation de l'exposition, de l'effet) ou dans des recherches plus fondamentales (*e.g.*, études de toxicocinétiques).

### 1.3.2 Le niveau individuel

L'étude de l'impact des contaminants au niveau individuel est généralement réalisée à partir de bioessais. Dans le présent travail, un bioessai se réfère à tous les paramètres individuels physiologiques, comportementaux ou à tous les traits de vie qui peuvent être observés ou mesurés pour mettre en évidence l'exposition ou les effets d'un ou plusieurs contaminants chimiques. Les réponses individuelles peuvent constituer des marqueurs très pertinents d'un point de vue écologique. En effet, les traits de vie tels que la survie, la reproduction ou la croissance sont à la base de la fitness des organismes, l'impact des contaminants sur ces marqueurs pouvant ainsi être interprétés comme des effets sur la dynamique des populations. Concernant les marqueurs individuels relatifs au comportement des organismes, tels que les activités alimentaire ou locomotrice, ou à leur physiologie, telle que l'activité respiratoire, ils peuvent être assez aisément reliés à des traits de vie et présentent donc des avantages similaires. Ils peuvent également être reliés à des biomarqueurs sub-individuels (Barata et al. 2007 ; Xuereb et al. 2009b ; Lacaze et al. 2011c), ce qui peut permettre une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents. Les marqueurs comportementaux peuvent ainsi représenter des intermédiaires intéressants dans des approches multi-échelles pour faire le lien entre des marqueurs précoces et sensibles à des niveaux d'organisation sub-individuels et des effets écologiquement plus pertinents sur les traits de vie ou même sur la dynamique des populations (Amiard-Triquet 2009).

Historiquement, la survie a été beaucoup étudiée, notamment au laboratoire, et continue d'être l'un des marqueurs individuels les plus utilisés. Ainsi, encore aujourd'hui, dans plus de 40% des études, elle constitue le seul marqueur étudié (Schmolke et al. 2010). Cependant, la mortalité étant par définition un marqueur très peu précoce, des marqueurs individuels sub-létaux sont de plus en plus utilisés (croissance, reproduction, comportement).

Les marqueurs individuels sont à la fois pratiques car les effets peuvent être étudiés lors de tests de toxicité standard, et bien acceptés d'un point de vue législatif (Suter et al. 2005) ce qui

les rend très pertinents dans les démarches d'évaluation du risque écologique des milieux aquatiques.

### 1.3.3 Le niveau populationnel

L'étude des impacts au niveau des populations est particulièrement intéressante car elle permet une compréhension globale des effets dans le temps et dans l'espace. Elle se révèle donc particulièrement pertinente d'un point de vue écologique (Forbes and Calow 1999). Cependant, bien que le niveau populationnel soit couramment utilisé en écologie, les études qui s'intéressent directement aux réponses sur ce niveau d'organisation sont relativement rares en écotoxicologie, en particulier dans le cadre du diagnostic. Une des principales raisons expliquant ce constat vient de la difficulté de suivre l'impact d'un contaminant ou d'un mélange de contaminants sur une population dans son ensemble, en particulier lors d'études *in situ*. Une méthode possible consiste à comparer les densités d'individus en amont et en aval d'une source de contamination. Ainsi, Hickey et Clements (1998) montrent une importante diminution des densités de populations de plusieurs espèces d'invertébrés aquatiques en aval de contaminations métalliques. Bien que ces observations d'abondance puissent donner de bonnes indications sur la croissance de la population et sur les facteurs qui l'affectent, elles sont souvent complexes à obtenir et à analyser (Clark 2003). En effet, il est toujours difficile d'interpréter si ces variations de densités sont liées à la présence d'une contamination ou à des différences d'habitat entre les différents sites étudiés. De plus, ces études d'abondance requièrent des suivis réalistes et réguliers de la population ce qui est souvent difficile notamment dans la délimitation spatiale de la population.

Une autre possibilité pour l'étude « en direct » de l'impact des contaminants sur les populations, dans les approches prédictives, consiste en la réalisation d'expérimentations en mésocosmes ou en microcosmes. Ces essais sont réalisés le plus souvent à l'extérieur dans des dispositifs expérimentaux de taille importante (*e.g.*, bassins ou canaux artificiels) et visent à reproduire des conditions au plus proche du milieu naturel. Les mésocosmes représentent des outils intéressants dans la mesure où ils permettent des études dans un contexte écosystémique et ont été largement utilisés en écotoxicologie à partir des années 1980 et surtout 1990. Les expérimentations en mésocosmes ont notamment été largement utilisées dans le but d'étudier l'impact des pesticides sur les communautés aquatiques (Relyea 2006 ; Colville et al. 2008 ; Gorzerino et al. 2009 ; Pestana et al. 2009 ; Néliu et al. 2010 ; Auber et al. 2011 ; Caquet et al. 2011). Ce type d'approche permet ainsi de mesurer les effets d'une contamination sur les

différentes populations composant le cosme. La réalisation de telles études est généralement compliquée à mettre en œuvre, coûteuse et complexe à interpréter (Beaudoin 2007 ; Massarin 2010). Des essais en microcosmes au laboratoire peuvent représenter une bonne solution intermédiaire par rapport aux essais en mésocosmes en terme de coût et de pertinence écologique (Clément et al. 2004). Ainsi, Watts et al. (2002) étudient l'impact du  $17\alpha$ -éthynylestradiol sur des populations de crustacés (*Gammarus pulex* et *Hyaella azteca*) dans des microcosmes en observant les variations de densités et de structures en taille entre différentes concentrations.

Bien que pouvant être pertinentes, ces deux types d'approches présentent un certain nombre de limites. Tout d'abord, elles ne sont pas envisageables pour des espèces avec des cycles de vie longs. De plus, de nombreuses critiques ont été portées sur la répliquabilité et les analyses des essais en cosmes (Caquet et al. 2001 ; Sanderson 2002 ; Brandt et al. 2004 ; De Jong et al. 2005), bien que ces difficultés soient aussi présentes lors des études en milieu naturel. En effet, il est difficile de constituer des systèmes strictement répliquables compte tenu de la variabilité des performances des individus, en particulier dans le cadre d'études en mésocosmes extérieurs (Beaudoin 2007). Enfin, une des limites des études en cosmes vient du fait que, de part leur coût financier et technique important, il n'est possible de tester qu'un nombre très limité de scénarios (*e.g.*, faible gamme de concentration, petit nombre de substances) ce qui ne permet pas d'être suffisamment robuste pour la prédiction des effets sur les populations naturelles, étant donné l'infinité des scénarios rencontrés dans l'environnement.

Une alternative à l'observation directe des populations est d'explicitier les liens entre les bioessais individuels réalisés sur des traits de vie et ce niveau d'organisation biologique, en faisant appel à la modélisation (Callow and Forbes 1998 ; Ares 2003 ; Forbes et al. 2006 ; Forbes et al. 2008 ; Manyin and Rowe 2008 ; Crone et al. 2009 ; Pedersen et al. 2009). Ces approches seront détaillées dans la troisième partie de ce chapitre.

## **2 Limites d'utilisation des biomarqueurs et des réponses individuelles pour le diagnostic *in situ* de la qualité des milieux aquatiques**

### 2.1 Difficultés d'utilisation pour les approches *in situ*

#### 2.1.1 Variabilité naturelle saisonnière et spatiale des marqueurs

Bien qu'ils soient de plus en plus acceptés dans les approches prédictives au laboratoire, les biomarqueurs et les bioessais sont encore peu utilisés en routine dans les démarches de biomonitoring, en particulier lors d'études à large échelle spatiale et temporelle. En effet, ces marqueurs présentent généralement une importante variabilité naturelle saisonnière et spatiale lors des expositions *in situ*, qu'il s'agisse de biomarqueurs sub-individuels ou encore plus de marqueurs individuels comme la survie, la croissance ou la reproduction (Baird et al. 2007a ; Liber et al. 2007). Cette variabilité naturelle a été soulignée par de nombreuses études, en particulier chez les poissons, mais aussi plus récemment sur différentes espèces d'invertébrés. Par exemple, concernant les biomarqueurs, plusieurs études ont souligné la variabilité saisonnière de la synthèse de métallothionéine (protéine qui joue un rôle dans la détoxification de l'organisme, notamment en lien avec les éléments-traces métalliques) dans des conditions de référence. Une telle variabilité a été soulignée chez plusieurs groupes d'organismes tels que les crustacés (Geffard et al. 2007), les mollusques (Geffard et al. 2001 ; Geffard et al. 2002 ; Geffard et al. 2005 ; Ivanković et al. 2005 ; Leiniö and Lehtonen 2005 ; Bocchetti and Regoli 2006 ; Bocchetti et al. 2008 ; Smaoui-Damak et al. 2009), les oligochètes (Gillis et al. 2004) ou encore les poissons (Gorbi et al. 2005 ; Dragun et al. 2007 ; Dragun et al. 2009 ; Falfushynska et al. 2010).

Cette variabilité des réponses a été décrite sur de nombreux biomarqueurs que ce soit des biomarqueurs de reprotoxicité tels que la synthèse de vitellogénine (Falfushynska et al. 2010), des biomarqueurs enzymatiques tels que l'acétylcholinestérase (AChE) (Lau et al. 2004 ; Bocchetti et al. 2008 ; Falfushynska et al. 2010) ou la catalase (CAT) (Vidal et al. 2002b ; Lau et al. 2004 ; Bocchetti et al. 2008), ou encore des biomarqueurs de génotoxicité (Shaw et al. 2000 ; Magni et al. 2006 ; Bocchetti et al. 2008 ; Pisanelli et al. 2009 ; Almeida et al. 2011).

Bien que moins d'études se soient intéressées à leur variabilité environnementale dans un contexte de biomonitoring, les marqueurs individuels présentent également de fortes variations saisonnières et spatiales. Ainsi, des variations saisonnières de marqueurs de la reproduction ont

été soulignées chez des mollusques (Bodin et al. 2004 ; Gust et al. 2011c), des échinodermes (Garmendia et al. 2010) ou encore des crustacés (Costa and Costa 1999 ; Maranhão and Marques 2003 ; Castellani and Altunbaş 2006) sur des espèces utilisées pour des biotests *in situ*. Maltby (2002) observe également une importante variabilité saisonnière du taux d'alimentation chez le crustacé amphipode *Gammarus pulex* dans une étude portant sur une large gamme de sites de référence à différentes saisons.

Ces variations spatiales et temporelles sont principalement liées à l'influence de divers facteurs environnementaux tels que la température, la salinité, la quantité d'oxygène dissous mais aussi à des facteurs non saisonniers comme les épisodes de crues par exemple. Les facteurs environnementaux responsables de la variabilité des marqueurs sont nombreux. Chez les espèces aquatiques, la température de l'eau représente un des facteurs les plus influents. En effet, la plupart des espèces aquatiques étant ectothermes, leur métabolisme va alors être fortement influencé par les variations de température du milieu. Ainsi, le rôle de la température a été démontré sur de nombreux marqueurs, que ce soit des biomarqueurs sub-individuels ou des réponses individuelles sur des traits de vie, et ce sur une grande diversité d'espèces (crustacés, mollusques, poissons). Le **Tableau I-1** présente une liste non exhaustive des différents marqueurs pour lesquels l'influence de la température a été montrée soit par l'intermédiaire d'expérimentations au laboratoire, soit par des expérimentations *in situ* lors d'études de biomonitoring chez des invertébrés aquatiques.

Dans les milieux aquatiques marins et saumâtres, la salinité constitue également une importante source de variabilité pour de nombreux biomarqueurs (Livingstone et al. 2000 ; Mouneyrac et al. 2001 ; Leung et al. 2002 ; Damiens et al. 2004 ; Martín-Díaz et al. 2004 ; Werner 2004 ; Pfeifer et al. 2005 ; Menezes et al. 2006 ; Moreira et al. 2006 ; Cailleaud et al. 2007 ; van den Heuvel-Greve et al. 2007 ; Kalman et al. 2010 ; Krell et al. 2011) ou marqueurs individuels (Prato et al. 2008 ; Kevrekidis et al. 2009 ; Carballeira et al. 2011). D'autres facteurs tels que le pH (Felten and Guerold 2001 ; Vidal et al. 2002a ; Robillard et al. 2003) ou l'oxygénation de l'eau (Vidal et al. 2002a ; Wiklund and Sundelin 2004) peuvent également influencer les réponses des biotests lors d'expérimentations *in situ*.

**Tableau I-1 : Exemples d'études observant un effet de la température sur la réponse de différents marqueurs utilisés lors de biotests *in situ* chez différentes espèces d'invertébrés aquatiques et de poissons.**

Niveau d'organisation	Marqueur	Espèce	Référence
individuel	alimentation	<i>Diporeia sp.</i> (Crustacé)	(Lozano et al. 2003)
individuel	alimentation	<i>Gammarus pulex</i> (Crustacé)	(Maltby et al. 2002)
individuel	alimentation	<i>Hydrobia ulvae</i> (Mollusque)	(Krell et al. 2011)
individuel	alimentation	<i>Carcinus maenas</i> (Crustacé)	(Moreira et al. 2006)
individuel	croissance	<i>Perca fluviatilis</i> (Poisson)	(Sandström et al. 2005)
individuel	croissance	<i>Gammarus locusta</i> (Crustacé)	(Neuparth et al. 2002)
individuel	croissance	<i>Marisa cornuarietis</i> (Mollusque)	(Selck et al. 2006)
individuel	croissance	<i>Neomysis integer</i> (Crustacé)	(Winkler and Greve 2002)
individuel	reproduction	<i>Temora longicornis</i> (Crustacé)	(Castellani and Altunbaş 2006)
individuel	reproduction	<i>Crangonyx pseudogracilis</i> (Crustacé)	(Dick et al. 1998)
individuel	reproduction	<i>Potamopyrgus antipodarum</i> (Mollusque)	(Gust et al. 2011a)
individuel	reproduction	<i>Echinogammarus marinus</i> (Crustacé)	(Maranhão and Marques 2003)
individuel	respiration	<i>Gammaridae</i> (Crustacé)	(Wijnhoven et al. 2003)
sub-individuel	reprotoxicité (VTG)	<i>Pimephales promelas</i> (Poisson)	(Brian et al. 2008)
sub-individuel	génotoxicité	<i>Mytilus galloprovincialis</i> (Mollusque)	(Almeida et al. 2011)
sub-individuel	génotoxicité	<i>Dreissena polymorpha</i> (Mollusque)	(Buschini et al. 2003)
sub-individuel	enzymes (AChE, GST)	<i>Eurytemora affinis</i> (Crustacé)	(Cailleaud et al. 2007)
sub-individuel	enzymes	<i>Mytilus edulis</i> (Mollusque)	(Giarratano et al. 2011)
sub-individuel	enzymes (MT)	<i>Tubifex tubifex</i> (Oligochète)	(Gillis et al. 2004)



Niveau d'organisation	Marqueur	Espèce	Référence
sub-individuel	enzymes	<i>Limanda limanda</i> (Poisson)	(Lange et al. 1998)
sub-individuel	enzymes (MT)	<i>Nucella lapillus</i> (Mollusque)	(Leung et al. 2000)
sub-individuel	enzymes (AChE)	<i>Crangon crangon</i> (Crustacé)	(Menezes et al. 2006)
sub-individuel	enzymes (AChE)	<i>Mytilus sp.</i> (Mollusque)	(Pfeifer et al. 2005)
sub-individuel	enzymes (AChE)	<i>Dreissena polymorpha</i> (Mollusque)	(Ricciardi et al. 2006)
sub-individuel	enzymes (AChE, GST, CAT)	<i>Anodonta cygnea</i> (Mollusque)	(Robillard et al. 2003)
sub-individuel	enzymes (MT)	<i>Mytilus galloprovincialis</i> (Mollusque)	(Serafim et al. 2002)
sub-individuel	enzymes	<i>Corbicula fluminea</i> (Mollusque)	(Vidal et al. 2002a)
sub-individuel	enzymes	<i>Perna viridis</i> (Mollusque)	(Verlecar et al. 2007)

### 2.1.2 Influence des facteurs biotiques

Cette variabilité saisonnière peut aussi être liée à l'influence de divers facteurs biotiques. Ces facteurs peuvent être des paramètres physiologiques (*e.g.*, la taille, le poids, le sexe, le statut énergétique, le statut reproducteur) ou écologiques (*e.g.*, le parasitisme, la compétition, la prédation ou les variations entre populations).

Le poids et/ou la taille représentent des facteurs de variabilité d'origine biotique importants. De nombreux marqueurs moléculaires, physiologiques, comportementaux ou encore des traits de vie peuvent être fortement corrélés à la taille ou au poids de l'organisme. Nous pouvons par exemple citer l'étude de Xuereb et al. (2009a) qui montre une influence significative du poids de l'organisme sur l'activité AChE chez le crustacé *Gammarus fossarum*. Fossi Tankoua et al. (2011) observent également une influence importante de la taille sur plusieurs biomarqueurs enzymatiques chez le mollusque *Scrobicularia plana*.

Le statut reproducteur a également été souligné comme pouvant influencer de façon significative la réponse de certains marqueurs comme la métallothionéine (Mouneyrac et al. 2001 ; Geffard et al. 2002) ou la quantité de dommage à l'ADN (Lacaze 2011). Chez la moule *Mytilus edulis*, Hagger et al. (2010) montrent que le taux d'alimentation diminue significativement en été juste après la période de reproduction de cette espèce.

Les facteurs écologiques peuvent également avoir une influence forte, comme par exemple le parasitisme. Fielding et al. (2003) montrent ainsi un impact fort de la présence du parasite *Echinorhynchus truttae* sur le taux d'alimentation du crustacé *Gammarus pulex*.

### 2.1.3 Conséquences des facteurs de confusion lors des approches *in situ*

Cette variabilité des marqueurs en absence de stress toxique, que ce soit de la variabilité environnementale ou de la variabilité liée à des facteurs biotiques, rend complexe leur utilisation que ce soit pour des démarches de biomonitoring, notamment à large échelle de temps et d'espace, ou même pour des études plus locales de l'impact d'une source de contamination (Kater et al. 2001 ; Maltby et al. 2002 ; Moreira et al. 2006 ; Krell et al. 2011). En effet, lors de la comparaison de différents sites entre eux, il est difficile de discriminer les variations liées à

l'impact potentiel d'un contaminant, des variations liées à l'influence des facteurs de confusion environnementaux et biotiques (Hanson et al. 2010). Il existe ainsi un risque important de faux-négatifs ou de faux-positifs (Underwood 2000).

Forbes et al. (2006), dans une revue critique, préconisent ainsi une utilisation des biomarqueurs et plus généralement des marqueurs présentant une forte variabilité naturelle essentiellement pour des études au laboratoire, dans le but de fournir des hypothèses et des explications mécanistes des effets d'un contaminant chimique sur l'organisme. Les auteurs considèrent ainsi que les biomarqueurs ne sont pas des indicateurs suffisamment pertinents pour l'évaluation de la qualité écologique d'un milieu. Toutefois, comme nous l'avons souligné précédemment, les biomarqueurs et les bioessais représentent des outils sensibles et précoces et sont donc particulièrement intéressants pour les démarches de biomonitoring *in situ*. Historiquement, ils ont d'ailleurs été développés afin d'évaluer la qualité des milieux (McCarthy and Shugart 1990).

Afin de rendre possible et pertinente leur utilisation sur le terrain, plusieurs solutions ont alors été proposées pour d'une part contrôler l'influence des facteurs biotiques et d'autre part prendre en compte l'influence des facteurs environnementaux dans l'interprétation des tests que ce soit *via* la proposition de protocoles adaptés ou de méthodes d'analyses statistiques plus pertinentes.

## 2.2 Limitation de l'influence des facteurs biotiques

Afin de limiter l'influence des facteurs biotiques, il est nécessaire d'adapter les tests développés au laboratoire pour des expositions *in situ*. C'est dans ce contexte qu'ont été proposées les méthodologies dites de *biomonitoring actif* (ou biosurveillance active) basées sur l'observation d'organismes calibrés (Liber et al. 2007 ; Ji et al. 2010), par opposition à l'observation des organismes autochtones qualifiée de *biomonitoring passif*. Dans ce contexte, des protocoles d'exposition des organismes *via* des méthodologies d'encagements suivis de mesures directes (Maltby et al. 1990b ; Maltby et al. 2002 ; Oikari 2006 ; Schmitt et al. 2010) ou indirectes après une période de post-exposition au laboratoire (Soares et al. 2005 ; Galloway et al. 2006 ; Barata et al. 2007 ; Krell et al. 2011) ont été développés et proposés à la fois pour la mesure de divers biomarqueurs, mais aussi pour la mesure de traits comportementaux (*e.g.*, taux d'alimentation) ou de traits de vie (*e.g.*, croissance, survie, production de jeunes) qui ne sont pas

observables sans l'encagement d'organismes. En effet, en plus de proposer une calibration des organismes en amont des expérimentations, les méthodologies d'encagements, au contraire de mesures ponctuelles, permettant de réaliser des mesures dynamiques après différents temps d'exposition des organismes

Ces méthodes, bien qu'elles s'éloignent un peu de l'impact direct sur les communautés en place, sont particulièrement intéressantes pour limiter la variabilité des réponses des marqueurs en lien avec les facteurs biotiques et présente de nombreux avantages (Oikari 2006 ; Liber et al. 2007). Tout d'abord, elles permettent de contrôler les interactions de type compétition ou prédation en isolant les organismes suivis durant l'expérimentation des autres organismes du milieu tout en les maintenant dans des conditions réalistes d'exposition. De plus, l'utilisation d'encagements permet de sélectionner des organismes calibrés (de sexe, taille, poids, statut reproducteur homogènes), provenant d'une même population de référence (afin de s'affranchir des mécanismes d'adaptation locale des populations) et acclimatés au laboratoire (diminution de la variabilité naturelle inter-individuelle). Enfin, la durée de l'exposition est ainsi contrôlée et identique entre les différents sites d'études contrairement au prélèvement d'organismes autochtones dont nous ne pouvons connaître l'ancienneté de l'exposition.

Cette approche *via* la transplantation d'organismes calibrés a ainsi déjà été utilisée dans de nombreuses études de biomonitoring chez des crustacés (Gerhardt et al. 1998 ; Schulz 2003 ; Dedourge-Geffard et al. 2009 ; Lacaze et al. 2011b), des mollusques (Bodin et al. 2004 ; Nigro et al. 2006 ; Damiens et al. 2007 ; Gorbi et al. 2008 ; Taleb et al. 2009 ; Gust et al. 2010a ; Schmitt et al. 2010 ; Gust et al. 2011b) ou encore des poissons (Hanson et al. 2009 ; Hanson and Larsson 2009 ; Hanson et al. 2010 ; Ji et al. 2010 ; Klobučar et al. 2010 ; Hanson and Larsson 2011), que ce soit pour la mesure de biomarqueurs ou de marqueurs individuels.

Plusieurs limites de ces méthodologies d'encagements d'organismes ont toutefois été notées par certains auteurs (Oikari 2006). Tout d'abord, leur mise en place est généralement longue et coûteuse (en comparaison avec les expérimentations au laboratoire ou avec le prélèvement d'individus autochtones), et difficilement réalisable pour certaines espèces, en particulier en ce qui concerne les espèces de poissons pour lesquelles l'encagement d'organisme peut se révéler très complexe à mettre en oeuvre. Certains auteurs ont également souligné le manque de pertinence écologique liée à l'utilisation d'organismes transplantés en termes de transférabilité vers les organismes autochtones et donc en terme d'impact sur les communautés en place. Toutefois, dans une étude sur le taux d'alimentation chez le crustacé *Gammarus fossarum* (Forrow and Maltby 2000), les auteurs soulignent le fait que les effets observés sur les organismes

transplantés dans des sites contaminés lors d'encagements *in situ* sont significativement corrélés avec la diminution des densités des organismes autochtones ainsi qu'avec un ralentissement de la vitesse de la décomposition de la matière organique dans les différents sites. Cet exemple illustre clairement le fait que des réponses observées sur des organismes transplantés lors de campagnes de biomonitoring peuvent, dans certains cas, être interprétés en terme d'impact sur les individus autochtones voire sur la dynamique des populations ou le fonctionnement des écosystèmes, même si ce type de relation est encore rarement établie.

Nous voyons donc que les méthodologies d'encagement *in situ* via la transplantation d'organismes calibrés permettent de bénéficier des avantages offerts par les expérimentations réalisées en conditions contrôlées au laboratoire (*e.g.*, bonne réplicabilité, durée d'exposition connue, utilisation de protocoles standard...) tout en bénéficiant d'un bon réalisme d'un point de vue écologique et en permettant d'accéder à la mesure de différents traits de vie (Baird et al. 2007b ; Crane et al. 2007 ; Liber et al. 2007) (**Figure I-2**). Elles représentent donc des outils très intéressants pour limiter la variabilité des réponses liées à l'influence des facteurs biotiques et permettre ainsi la mise en place d'études de biomonitoring sur le terrain.

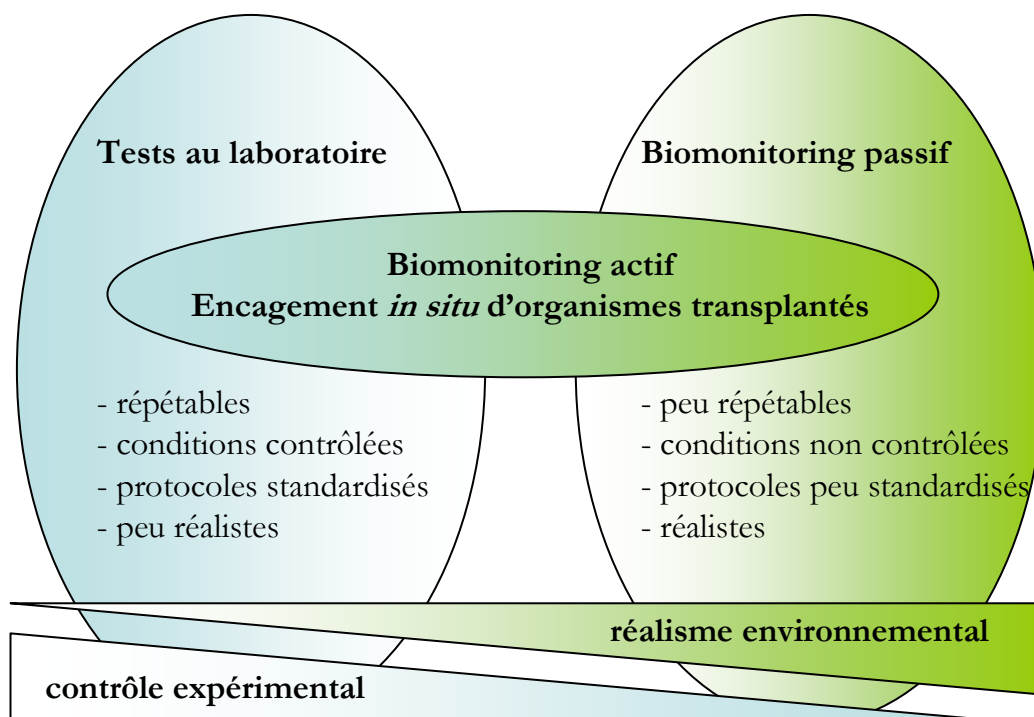


Figure I-2 : Intérêts des méthodologies d'encagement *in situ* d'organismes transplantés (modifié d'après Baird et al. 2007b).

## 2.3 Prise en compte des facteurs environnementaux

### 2.3.1 Limites des approches amont - aval

L'influence des facteurs environnementaux et de l'habitat conditionnant les caractéristiques physico-chimiques d'un site ne peut, par définition, être contrôlée lors d'expositions sur le terrain. Ainsi, jusqu'à présent, la plupart des études *in situ* ont dû se limiter à des comparaisons entre des stations en amont et en aval d'une source de contamination (rejets de station d'épuration, rejets miniers, rejets industriels...). Cette approche, également appelée approche BACIP (« *Before-After-Control-Impact design with Paired sampling* ») (Hanson 2011b) a été largement utilisée et a démontré son intérêt pour évaluer la qualité d'un site mais fait l'hypothèse que les conditions physico-chimiques sont similaires entre les stations, excepté en ce qui concerne la biodisponibilité des composés toxiques (Liber et al. 2007) et donc que les différents sites sont similaires en l'absence de contamination (Underwood 2000). Cette hypothèse forte peut cependant se révéler fortement critiquable dans certaines conditions. En effet, il est fréquent que même entre des sites proches, les paramètres physico-chimiques soient variables. Or, il a été montré pour certains marqueurs que même une faible variation de ces paramètres pouvait conduire à des différences importantes au niveau de la réponse du marqueur. Le risque de conclure à une contamination potentielle d'un site alors que les différences avec le site amont sont liées à l'influence des facteurs environnementaux est alors important (c'est-à-dire le risque de faux positif) ou inversement (risque de faux négatif). De plus, cette approche limite l'utilisation des marqueurs sub-individuels et individuels à des études locales et ponctuelles alors que de plus en plus, les demandes de diagnostic de la qualité de l'eau portent sur l'ensemble du bassin versant voir même d'une région.

### 2.3.2 Définition de gammes de valeurs de référence

Afin de pouvoir comparer des sites entre eux lors de campagnes de biomonitoring à large échelle spatiale et temporelle, une possibilité réside dans la définition de gammes de valeurs de référence tenant compte de la variabilité saisonnière et spatiale des marqueurs (Hagger et al. 2008 ; Xuereb et al. 2009a ; Hanson et al. 2010). Afin de définir de telles gammes, un suivi de plusieurs sites de référence durant différentes saisons est nécessaire. Dans ce type d'approche, le choix des sites de référence apparaît ainsi crucial, ce qui constitue une limite importante étant donné la difficulté croissante pour trouver des sites non impactés par une source de contamination. Bien que cette méthode puisse être appropriée dans certains cas, elle apparaît problématique lorsque

les facteurs environnementaux sont à l'origine d'une forte variabilité naturelle. En effet, la gamme de référence ainsi définie sera alors très variable avec des différences significatives entre les sites ce qui conduit à un manque important de puissance statistique lors de la comparaison avec les réponses observées dans un site potentiellement impacté. Cette méthodologie permet ainsi certes de diminuer sensiblement le risque de faux-positif lors du diagnostic d'un site (c'est-à-dire le risque de détecter un impact alors qu'il n'y en a pas à cause de l'influence des facteurs environnementaux), mais *a contrario*, le risque de faux-négatif (c'est-à-dire le risque de ne pas détecter un impact alors qu'il y en a un) devient alors élevé en raison de cette forte variabilité de la gamme de référence. L'utilisation du marqueur se révèle alors très peu sensible à l'impact des contaminants ce qui limite fortement son intérêt pour une évaluation de la qualité des milieux aquatiques (Hanson et al. 2010).

Une autre limite de cette approche vient du fait que pour définir une gamme de valeurs de référence qui permette de réaliser des comparaisons avec une puissance statistique suffisante, elle doit être établie à partir d'un grand nombre de sites de référence afin de bien définir la variabilité spatiale du marqueur et ce sur une longue période afin d'estimer la variabilité temporelle (Hanson et al. 2010) ; nous parlons alors de référence temporelle. Une telle démarche est rarement possible, soit par manque de moyens financiers ou techniques lors des études, soit à cause de la difficulté pour identifier *a priori* des sites non impactés. Il est intéressant de noter que la réponse des marqueurs peut à long terme évoluer sous l'action de changements globaux tel que le réchauffement climatique. Dans ce cas de figure, il peut ne pas être pertinent d'utiliser des données trop anciennes pour la définition de la gamme de référence, étant donné que nous intégrons alors dans la gamme à la fois l'effet de la variabilité saisonnière du marqueur et l'impact du changement global. Hanson et al. (2010) ont ainsi démontré que pour de nombreux biomarqueurs appliqués sur la perche *Percia fluviatilis*, il était plus pertinent d'utiliser une référence multi-sites basée sur les quatre années précédant l'étude qu'une référence temporelle basée sur de nombreuses données historiques issues de 20 années de suivi.

### 2.3.3 Modélisation de l'influence des facteurs de confusion

Récemment, une alternative à la définition de telles gammes de référence a été développée. Il s'agit de caractériser et modéliser l'influence des facteurs environnementaux pour pouvoir proposer des mesures comparables dans le temps et l'espace (Maltby et al. 2002 ; Moreira et al. 2006 ; Krell et al. 2011). Afin de modéliser l'influence des facteurs environnementaux, une

approche possible est d'étudier au laboratoire et/ou dans des sites non impactés l'influence des principaux facteurs de confusion afin de pouvoir estimer, *via* par exemple des modèles de régressions multiples, l'influence de chacun des facteurs ainsi que leurs interactions sur la réponse du marqueur.

Ainsi, dans une analyse empirique de l'influence des facteurs environnementaux sur le taux d'alimentation chez le crustacé *Gammarus pulex*, Maltby et al. (2002) établissent une relation linéaire entre le taux d'alimentation et la température de l'eau qui explique 76% de la variabilité observée dans des sites de référence ainsi qu'une relation linéaire entre le taux d'alimentation et la température de l'eau couplée à la dureté de l'eau qui explique 79% de la variabilité observée. Dans une autre étude sur le taux d'alimentation chez le mollusque *Hydrobia ulvae*, Krell et al. (2011) montrent, *via* des analyses de régression multiples, que la température et la salinité expliquent 55,7% de la variabilité observée dans des sites de référence. Ce type de relation offre alors la possibilité de prédire la réponse du marqueur quelle que soit la valeur des facteurs de confusion (dans ce cas la température de l'eau) et de la comparer aux réponses observées dans des sites potentiellement impactés. En comparant ainsi les valeurs observées aux valeurs prédites, il est possible de discriminer les sites impactés par la présence d'un ou plusieurs contaminants, des sites non impactés, tout en ayant intégré l'influence des facteurs de confusion.

Dans leur étude sur le taux d'alimentation, Maltby et al. (2002) observent ainsi une bonne concordance entre les prédictions de leur modèle et les observations dans les sites choisis comme référence ainsi que des inhibitions significatives par rapport aux prédictions dans les sites contaminés. Cette bonne correspondance entre les prédictions et les observations dans les sites de référence permet alors de définir des gammes de valeurs de référence robustes en absence de facteur stress toxique qui permettent d'envisager des études de biomonitoring à large échelle spatiale et temporelle. Bien que particulièrement pertinente, ces approches restent encore relativement rares. Ce type de démarche permet d'utiliser les gammes de valeurs de référence comme référence externe lors de l'étude de nouveaux sites. Il est ainsi possible d'étudier n'importe quel site sans *a priori* sur son degré de contamination ; la concordance, ou non, avec la gamme de référence externe permettant de conclure quant à un impact pour un marqueur donné.

Cette méthodologie pourrait également être appliquée pour la prise en compte des facteurs de confusion biotiques tels que par exemple l'âge, la taille, le stade de développement ou encore la quantité de réserves énergétiques des organismes lorsque ces facteurs ne peuvent être contrôlés *via* la sélection d'organismes calibrés en amont de l'expérimentation. En effet, comme



nous l'avons souligné précédemment, les facteurs de confusion biotiques sont souvent à l'origine d'une variabilité importante de la réponse des marqueurs.

## 2.4 Choix des approches statistiques

Quelle que soit la méthodologie utilisée pour réaliser le diagnostic d'un ou plusieurs sites potentiellement impactés, il existe toujours un risque, une probabilité de conclure, ou non, à un impact alors qu'il n'y en pas et inversement, bien que la modélisation préalable de l'influence des facteurs de confusion pour définir des gammes de valeurs de référence robustes permettent de limiter fortement ces cas de figure. Le choix des tests statistiques employés pour la comparaison des observations obtenues dans les sites potentiellement impactés à la référence choisie pour l'étude peut alors se révéler important pour limiter ces risques (Flammarion and Garric 1999 ; Johnson 1999 ; Hanson 2011b).

Dans une étude récente, Hanson (2011b) compare ainsi à partir de jeux de données simulés, les résultats obtenus par différentes méthodes statistiques couramment utilisées en écotoxicologie, en s'intéressant plus particulièrement à la probabilité d'obtenir des cas de faux positifs ou de faux négatifs. Les différentes méthodes comparées sont :

- la méthode « classique », très couramment utilisée en écotoxicologie, qui consiste à comparer si la réponse moyenne du marqueur observée dans un site potentiellement impacté est significativement différente de la moyenne du, ou des sites, de référence.
- une méthode alternative dite CES (« Critical Effect Size ») (Melvin et al. 2009 ; Munkittrick et al. 2009) dans laquelle la réponse du marqueur observée dans un site potentiellement impacté n'est pas comparée directement à la moyenne des sites de références mais à un écart, prédéfini à l'avance selon le marqueur, par rapport aux valeurs de référence. La difficulté de cette approche réside dans la définition de l'écart à partir duquel l'impact est considéré comme significatif (Hanson 2011b). Pour cette méthode, deux tests proposés par Kilgour (1998) sont comparés : le *test d'équivalence* et le *test des intervalles*. Le *test d'équivalence* teste la probabilité que les valeurs du site étudié soient inférieures à l'écart fixé, alors que le *test des intervalles* teste la probabilité que les valeurs soient en dehors de l'écart fixé.
- enfin, une méthode de *bootstrap* est également utilisée. Cette dernière est basée sur la simulation d'un grand nombre de gammes de valeurs de référence obtenues par l'échantillonnage aléatoire de valeurs tirées dans les sites de référence et comparées à chaque fois aux valeurs observées dans le site potentiellement impacté. Cette méthode est encore relativement peu

utilisée en écotoxicologie, notamment en raison du temps de calcul important qui peut être nécessaire pour le tirage des valeurs de référence mais représente un outil statistique prometteur.

Hanson (2011b) conclut que la méthode choisie peut avoir une influence importante sur l'interprétation des données et donc au final sur les conclusions des études. Il démontre notamment que selon les tests, les risques de faux positifs ou de faux négatifs sont plus ou moins importants. Ainsi, le *test d'équivalence* se révèle être celui qui offre le meilleur compromis par rapport aux deux types d'erreur et est au final le plus protecteur pour l'environnement. A l'opposé, le *test des intervalles* se révèle être le moins efficace. Enfin, la méthode de *bootstrap* est également très performante et présente un avantage important : elle peut être utilisée aussi bien lorsque les données sont distribuées normalement que lorsque cette hypothèse n'est pas vérifiée, ceci n'étant pas le cas pour les trois autres tests.

### Synthèse :

Utilisation des biomarqueurs sub-individuels et des marqueurs individuels : importance de la prise en compte des facteurs de confusion

- Les biomarqueurs et les bioessais sont des outils pertinents aussi bien pour les démarches prédictives que pour les démarches de diagnostic de la qualité des milieux aquatiques car ils se révèlent **sensibles, précoces** et **spécifiques** d'un type de contamination.
- Cependant, leur utilisation sur le terrain se révèle complexe car ils sont fortement influencés par les **facteurs de confusion biotiques** (*e.g.*, taille, sexe, statut reproducteur, compétition, prédation) et **abiotiques** (*e.g.*, température, salinité) qui doivent être pris en compte.

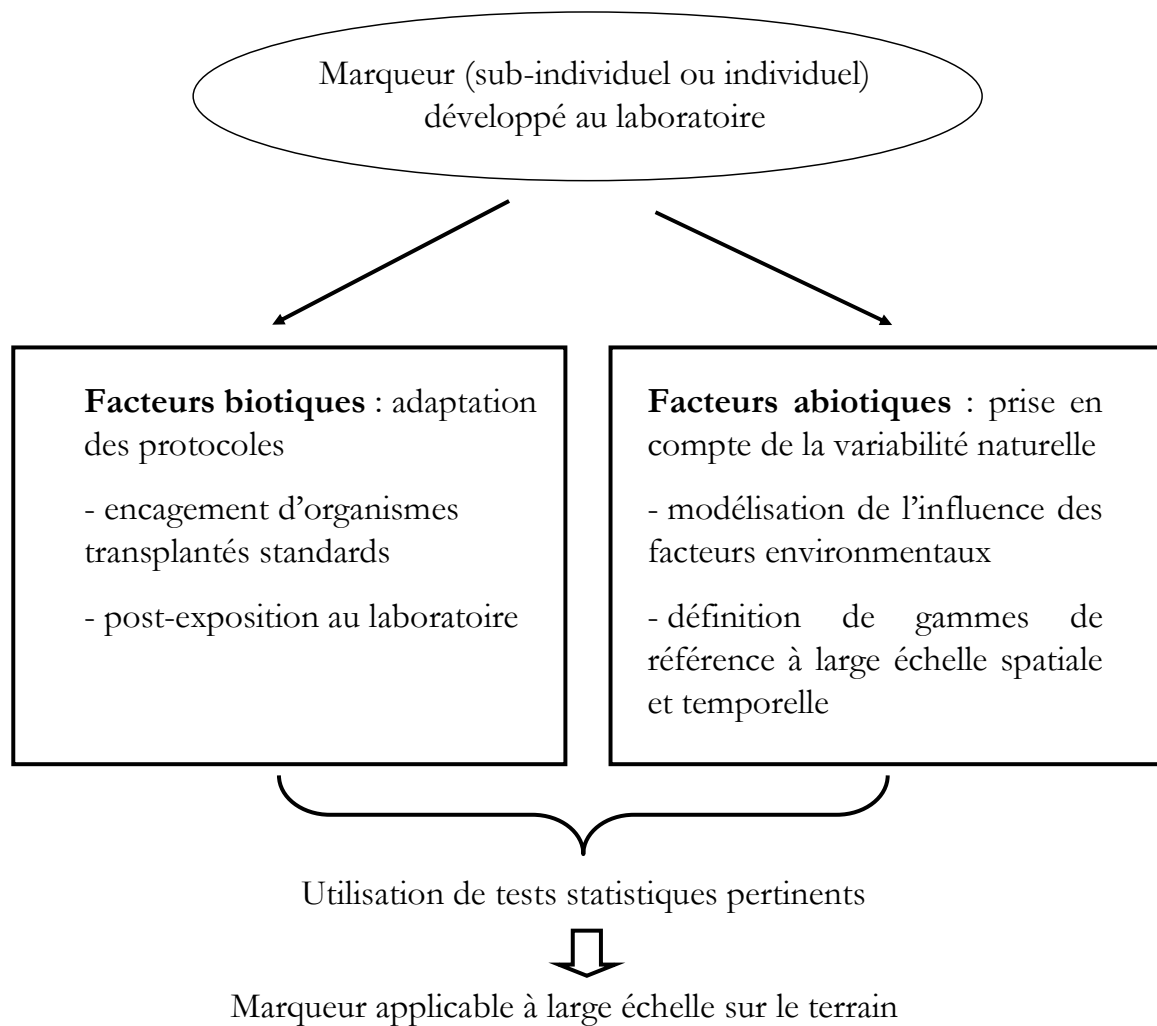


Figure I-3 : Etapes nécessaires pour le développement et l'utilisation d'un marqueur *in situ*.

### **3 Apport de la modélisation pour extrapoler les effets individuels au niveau populationnel**

Comme nous l'avons souligné précédemment, bien que très pertinente d'un point de vue écologique, l'étude directe des effets des contaminants sur les populations naturelles est très rarement possible en écotoxicologie en raison de la grande difficulté à discriminer les différences entre populations liées à la présence d'une contamination des différences en lien avec l'habitat par exemple. Pour palier cette difficulté et proposer une évaluation de la qualité des milieux en terme d'effet sur le fonctionnement et la dynamique des populations, la modélisation représente un outil pertinent et prometteur *via* l'extrapolation des effets observés au niveau individuel sur la dynamique des populations par l'intermédiaire de modèles de dynamique de population (Kooijman and Metz 1984 ; Barnthouse et al. 1987 ; Caswell 1996 ; Levin et al. 1996 ; Grimm 1999). Ces modèles mettent en lien les différents traits de vie (*e.g.*, croissance, reproduction, survie) afin de comprendre la dynamique de la population et de prédire son devenir à long terme (*e.g.*, taux d'accroissement asymptotique, probabilité d'extinction).

Depuis la fin des années 1990, cette approche est de plus en plus couramment utilisée dans les démarches prédictives dans le but d'interpréter en terme d'impact potentiels sur la dynamique des populations les effets observés sur les traits de vie lors de l'exposition d'organismes au laboratoire à une gamme de concentration d'un contaminant donné (Galic et al. 2010). Ainsi, les effets observés sur des marqueurs individuels ont pu être extrapolés au niveau populationnel dans divers contextes tels que l'exposition à des contaminants métalliques (Møller et al. 1996 ; Chaumot et al. 2002 ; Chaumot et al. 2003b ; Salice and Miller 2003 ; Péry et al. 2006 ; Billoir et al. 2007 ; Ducrot et al. 2007 ; Manyin and Rowe 2008) ou des pesticides (Baveco and De Roos 1996 ; Bartell et al. 2000 ; Wennergren and Stark 2000 ; Lopes et al. 2005 ; Sibly et al. 2005 ; Ashauer et al. 2006a ; Banks et al. 2008 ; Dalkvist et al. 2009 ; Forbes et al. 2009 ; Grimm et al. 2009 ; Preuss et al. 2009b ; Preuss et al. 2010 ; Schmolke et al. 2010 ; Wang and Grimm 2010). Dans le cadre de l'évaluation des risques associés à l'utilisation des pesticides, l'emploi des modèles de dynamique de population commence ainsi à être proposé dans les démarches réglementaires (Forbes et al. 2009).

Cependant, pour l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques, l'utilisation des modèles de dynamique de population est beaucoup plus rare (Ares 2003 ; Zhou et al. 2008 ; Hanson 2009a ; Lundström et al. 2010). Deux raisons principales peuvent être avancées pour expliquer ce retard

dans l'utilisation de ces modèles dans le cadre diagnostique : 1- tout d'abord, comme nous l'avons expliqué précédemment, l'estimation des traits de vie à l'entrée des modèles de dynamique de population est beaucoup plus complexe *in situ* qu'au laboratoire à cause de l'influence de nombreux facteurs de confusion. 2- de plus, les modèles proposés jusqu'à présent dans ces approches n'offrent pas suffisamment de réalisme pour être utilisés de façon pertinente et répondre aux exigences réglementaires.

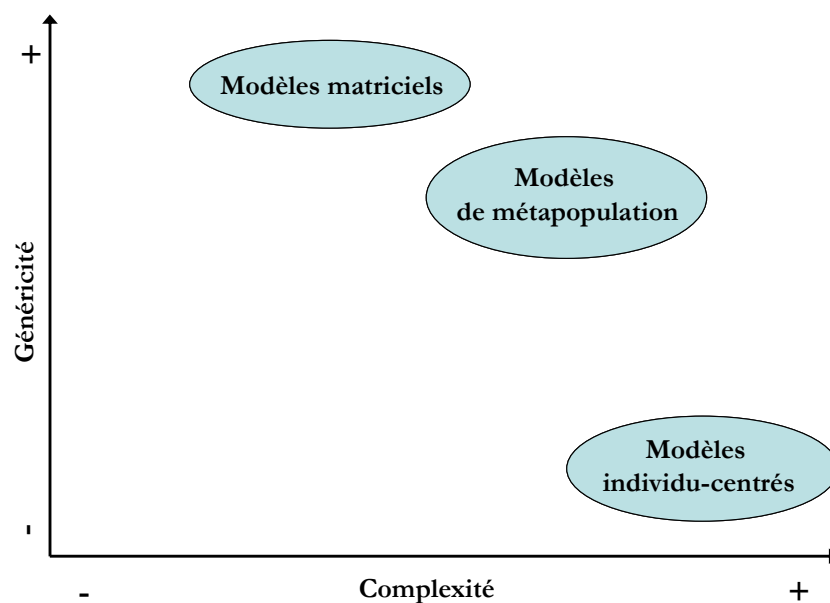
Concernant la première limite, le développement récent des approches de biomonitoring actif *via* l'encagement d'organismes calibrés et la modélisation de l'influence des facteurs de confusion a permis de répondre en partie à cette difficulté (Baird et al. 2007a ; Hanson 2009a). Cependant, concernant l'amélioration de la pertinence écologique des modèles, un effort important reste encore à fournir. Dans la suite de ce chapitre, nous allons dans un premier temps présenter plus en détails les différents modèles de dynamique de population utilisés pour l'extrapolation des effets observés sur les marqueurs individuels au niveau de la population. Puis nous soulignerons les intérêts et les limites actuelles de ces modèles pour le diagnostic de la qualité des milieux aquatiques. Etant donné le peu d'études réalisées à ce jour au niveau populationnel, *via* des modèles de dynamique de population, pour les approches diagnostiques, la majorité des exemples et des concepts utilisés dans ce chapitre proviennent d'études prédictives de l'impact d'un ou plusieurs contaminants, en particulier les métaux et les pesticides. Toutefois, il est important de garder à l'esprit que les modèles utilisés dans ces deux champs de l'évaluation écotoxicologique proviennent du même cadre théorique et que les avancées importantes réalisées dans les approches prédictives pourraient aisément être transposées dans les approches diagnostiques.

### 3.1 Les différents types de modèles utilisés pour l'étude des impacts au niveau populationnel

De nombreux types de modèles de dynamique de population ont été proposés pour réaliser cette démarche d'extrapolation vers le niveau populationnel. Dans ce travail, les modèles de dynamique de population correspondent à *des modèles mécanistes qui relient les réponses individuelles à des changements au niveau des populations (e.g., taille, structure)* (Forbes et al. 2008). De récentes revues et classifications ont été proposées pour décrire les différents types de modèles utilisés (Pastorok et al. 2003 ; Akçakaya et al. 2008 ; Barnthouse et al. 2008 ; Forbes et al. 2008). Forbes et al. (2008)

séparent les différents types de modèles en trois grandes classes : les modèles démographiques, les modèles du budget énergétique (modèle DEB) et les modèles individus centrés. Ces modèles sont tous issus du champ de l'écologie traditionnelle et ont été depuis la fin des années 1990 largement utilisés en écotoxicologie. Ils présentent des caractéristiques différentes que ce soit en terme de réalisme écologique, de complexité (*e.g.*, nombre de paramètres, temps de calcul...) ou de généralité (*e.g.*, limité au cas précis de l'étude ou généralisable à plusieurs populations, espèces...) (**Figure I-4**) ; le choix du modèle à utiliser sera alors fonction des objectifs de l'étude (Bartell et al. 2003 ; Pastorok et al. 2003 ; Forbes et al. 2008).

Dans cette synthèse bibliographique, les modèles du budget énergétiques ne seront pas considérés comme des modèles de dynamique de population à proprement parler et ne seront par conséquent pas détaillés. En effet, ce sont des modèles individuels basés sur l'allocation de l'énergie entre les différentes grandes fonctions vitales (maintenance, croissance, reproduction) qui peuvent, certes, être couplés dans un second temps à des modèles de dynamique de population, mais qui ne permettent pas en tant que tels de proposer une évaluation écotoxicologique au niveau populationnel.



**Figure I-4 : Caractéristiques des différents modèles de dynamique de population en terme de généralité et de complexité (modifié d'après Forbes et al. 2008, Pastorok et al. 2003)**

Les modèles démographiques peuvent être non structurés (tous les individus de la population sont alors considérés comme identiques) ou structurés en classes de taille, d'âge (les

individus de chaque classe étant alors considéré comme identiques) ou en stades de développement. De la stochasticité environnementale ou démographique peut être ajoutée si nécessaire pour apporter plus de réalisme au modèle (Forbes et al. 2008). Il est également possible d'intégrer une dimension spatiale avec la prise en compte de différentes sous-populations, il s'agit alors de modèles de métapopulation (Hanski 1994 ; Hanski and Thomas 1994 ; Akçakaya et al. 2008) ou de modèles multirégionaux (Lebreton and Gonzales-Davila 1993 ; Chaumot 2002 ; Chaumot et al. 2003b)

Les modèles individus centrés suivent une philosophie différente par rapport aux modèles démographiques puisqu'ils considèrent les individus tous différents au sein de la population et décrivent les caractéristiques individuelles avec plus ou moins de réalisme (ce qui peut conduire à rendre ces modèles très complexes). La dynamique de la population qui émerge de ces modèles est alors le résultat combiné des réponses de chacun des individus qui la compose (Grimm and Railsback 2005).

### 3.1.1 Les modèles scalaires

Historiquement, de nombreux modèles mathématiques ont été proposés pour décrire l'accroissement d'une population, et ce dès le 18<sup>ème</sup> siècle. Quelques-uns sont décrits à titre d'exemple (**Tableau I-2**) bien qu'ils soient de moins en moins utilisés. Une des grandes limites de l'utilisation de ces modèles vient du fait qu'ils considèrent des populations non structurées. Ils font donc l'hypothèse que les paramètres (croissance, reproduction, survie) ne varient pas en fonction de la taille ou de l'âge des individus ce qui les rend peu pertinent d'un point de vue écologique. De plus, d'un point de vue écotoxicologique, ces modèles ne permettent pas de prendre en compte les variations de la sensibilité des organismes en fonction de leur âge ou de leur taille. Il a donc été nécessaire de développer des modèles de dynamique de population structurés (généralement en âge ou en taille) afin de palier ces limites importantes.

**Tableau I-2 : Principaux modèles scalaires utilisés pour étudier la croissance d'une population (modifié d'après Massarin 2010).**

Modèle	Equation	Caractéristiques principales
Modèle d'Euler (1760)	$s \sum_{t=0}^{\infty} S_t n_t e^{-rt} = 1 \text{ avec :}$ <ul style="list-style-type: none"> <li>- r : taux d'accroissement de la population</li> <li>- <math>S_t</math> : probabilité de survie</li> <li>- <math>n_t</math> : efficacité de reproduction</li> <li>- s sex-ratio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- nécessite la construction de tables de survie – fécondité</li> <li>- ne prend pas en compte les phénomènes de densité-dépendance</li> <li>- intègre des variables qui ont chacune leur variance, rarement prise en compte</li> </ul>
Modèle malthusien (1789)	$\frac{dN(t)}{dt} = r.N(t) \text{ avec :}$ <ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>N(t)</math> : nombre d'individus</li> <li>- r : taux d'accroissement de la population</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- néglige les variations d'âge, de taille, les phénomènes de densité-dépendance</li> <li>- suppose que les taux de reproduction sont les mêmes pour tous les individus de la population</li> </ul>
Modèle de Verhulst (1840)	$\frac{dN(t)}{dt} = rN(t) \left( 1 - \frac{N(t)}{K} \right) \text{ avec :}$ <ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>N(t)</math> : nombre d'individus</li> <li>- r : taux de croissance de la population</li> <li>- K : capacité limite du milieu (c'est-à-dire la taille maximale que peut atteindre la population)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- suppose que les taux de reproduction sont les mêmes pour tous les individus de la population</li> </ul>

### 3.1.2 Les modèles matriciels de dynamique de population

#### 3.1.2.1 Généralité sur les modèles matriciels de dynamique de population

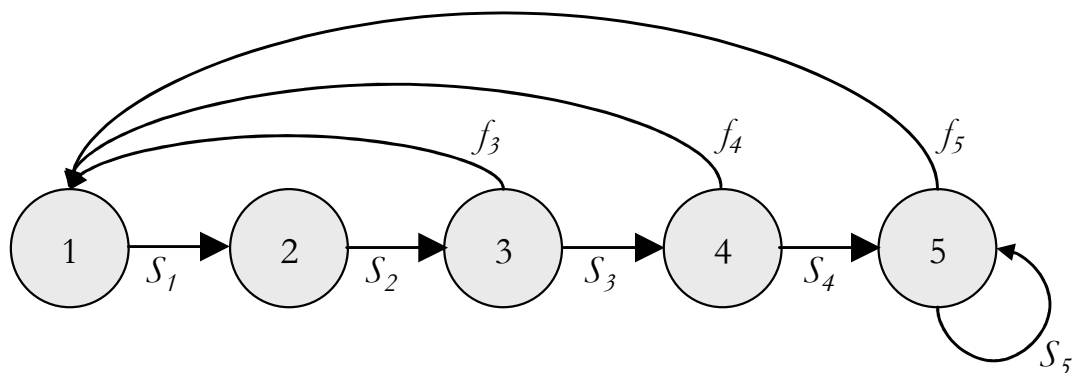
Les modèles matriciels de dynamique de population ont été proposés par Leslie (1945 ; 1948) pour décrire la dynamique de populations structurées en classes d'âge. Un peu plus tard, ces modèles furent adaptés pour des populations structurées en classe de taille ou en stade de développement (Lefkovitch 1965 ; Usher 1966). Nous allons décrire succinctement le principe de ces modèles matriciels de dynamique de population. Etant donné que le fonctionnement est le même pour les différents types de modèles matriciels, nous prendrons l'exemple d'un modèle de Leslie structuré en classes d'âge, proche du modèle original proposé par Leslie. La structuration en classe d'âge a été couramment utilisée, notamment en écotoxicologie.



Ces modèles font trois hypothèses de départ :

- La variable âge est discrétisée en différentes classes numérotées de 1 à  $\omega$
- Le temps est considéré comme une variable discrète. Le pas de temps est généralement appelé intervalle de projection
- Le pas de temps est exactement égal à la durée de chacune des classes d'âge, ce qui implique que de  $t$  à  $t + 1$  tous les individus passent de la classe d'âge  $i$  à la classe  $i + 1$

Comme illustré sur la **Figure I-5**, la dynamique de la population peut être schématisée par un graphe de cycle de vie qui décrit les relations entre les différentes classes d'âges. Ce graphe représente, selon Caswell (2001), « l'unité fondamentale de description d'un organisme sur laquelle est fondée la théorie des modèles matriciels de dynamique de populations. L'étude de ce cycle de vie, dans un contexte démographique et/ou de dynamique de populations animales, nécessite de disposer d'un outil de traduction des informations du niveau d'organisation écologique individuel vers le niveau populationnel ».



**Figure I-5 : Graphe de cycle de vie d'une population divisée en  $\omega = 5$  classes d'âges. Les taux de survie  $S_i$  et de fécondité  $f_i$  sont spécifiques pour chaque classe d'âge.**

A un temps  $t$ , la population est décrite par le nombre d'individus dans chacune des classes. Soit,  $\mathbf{n}_i(t)$  le nombre d'individus dans la classe d'âge  $i$  ( $i = 1, \dots, \omega$ ) au temps  $t$  et  $\mathbf{N}(t)$  est le vecteur population au temps  $t$ .

Alors :

$$\mathbf{N}(t) = (\mathbf{n}_1(t), \dots, \mathbf{n}_i(t), \dots, \mathbf{n}_\omega(t))^T$$

**Eq I-1**

Entre le temps  $t$  et le temps  $t + 1$ , le nombre d'individus dans la classe  $i$  est calculé à partir du nombre d'individus dans les autres classes au temps  $t$  et par la valeur des coefficients de survie et fécondité directement tirés du graphe du cycle de vie (**Figure I-5**) noté  $a_{ij}$ . Cette relation peut être formulée sous la forme d'une combinaison linéaire contenant ces coefficients :

$$\mathbf{n}_i(t+1) = \sum_{j=1}^{\omega} a_{ij} \mathbf{n}_j(t) \quad \forall i = 1, \dots, \omega. \quad \text{Eq I-2}$$

Ainsi, dans notre exemple :

$$\left[ \begin{array}{l} \mathbf{n}_1(t+1) = f_3 \mathbf{n}_3(t) + f_4 \mathbf{n}_4(t) + f_5 \mathbf{n}_5(t) \\ \mathbf{n}_2(t+1) = S_1 \mathbf{n}_1(t) \\ \mathbf{n}_3(t+1) = S_2 \mathbf{n}_2(t) \\ \mathbf{n}_4(t+1) = S_3 \mathbf{n}_3(t) \\ \mathbf{n}_5(t+1) = S_4 \mathbf{n}_4(t) + S_5 \mathbf{n}_5(t) \end{array} \right. \quad \text{Eq I-3}$$

L'équation **Eq I-2** peut facilement être convertie en une équation matricielle :

$$\mathbf{N}(t+1) = \mathbf{A} \mathbf{N}(t) \quad \text{Eq I-4}$$

où  $\mathbf{A}$  correspond à la matrice de transition ou matrice de Leslie. La première ligne de la matrice correspond aux fécondités  $f_i$  des différentes classes et la diagonale correspond aux survies  $S_i$ . Les coefficients  $f_i$  et  $S_i$  sont appelés les taux vitaux.

Dans notre exemple, 
$$\mathbf{A} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & f_3 & f_4 & f_5 \\ S_1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & S_2 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & S_3 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & S_4 & S_5 \end{pmatrix} \quad \text{Eq I-5}$$

L'analyse de la matrice de Leslie permet de calculer différents paramètres populationnel tels que le taux de croissance asymptotique de la population  $\lambda$ , le temps de génération  $T$  ou encore les valeurs reproductives. Le **Tableau I-3** résume le calcul de ces différents paramètres.

**Tableau I-3 : Liste des différentes caractéristiques populationnelles calculées à partir d'un modèle de Leslie avec leur signification mathématique et biologique (modifié d'après Charles et al. 2009).**

Symbole	Signification mathématique	Signification démographique
$\lambda$	Valeur propre dominante de la matrice de transition $\mathbf{A}$	Taux d'accroissement asymptotique de la population
$\mathbf{W}$	Vecteur propre à droite de la matrice de transition $\mathbf{A}$ associé à $\lambda$	Distribution d'âge stable
$\mathbf{V}$	Vecteur propre à gauche de la matrice de transition $\mathbf{A}$ associé à $\lambda$	Valeurs reproductives
$R_0$	$R_0 = \sum_{i=1}^{\omega} f_i \prod_{k=1}^{i-1} S_k$	Taux de reproduction net
$T$	$T = \frac{\ln R_0}{\ln \lambda} \rightarrow R_0 = \lambda^T$	Temps de génération
$\rho$	$\rho = \lambda /  \lambda_2 $ , où $\lambda_2$ est la valeur propre de $\mathbf{A}$ avec le 2 <sup>ème</sup> module le plus grand	Vitesse de convergence vers la structure stable de la population (ou <i>Damping ratio</i> )

Selon la valeur de  $\lambda$ , nous obtenons une dynamique de population différente :

- Si  $\lambda > 1$ , alors la population croît de manière exponentielle
- Si  $\lambda = 1$ , alors la population reste stable
- Si  $\lambda < 1$ , alors la population décroît et tend vers l'extinction à plus ou moins long terme

L'un des intérêts des modèles matriciels réside dans la possibilité de faire des analyses de sensibilité ou d'élasticité sur les paramètres du modèle. Les analyses de sensibilité et d'élasticité permettent de quantifier les effets de perturbations des valeurs des coefficients  $a_{ij}$  de la matrice de projection  $\mathbf{A}$  sur l'estimation du taux d'accroissement asymptotique de la population  $\lambda$  par exemple. L'effet de ces perturbations peut être quantifié de manière absolue, c'est l'analyse de sensibilité, ou de manière relative pour tenir compte d'ordres de grandeur différents des

coefficients  $a_{ij}$ , c'est l'analyse d'élasticité. En effet, pour tenir compte du fait que les fécondités et les taux de survie (compris entre 0 et 1) ne sont généralement pas du même ordre de grandeur, il est souvent plus judicieux de considérer la réponse de  $\lambda$  à des perturbations proportionnelles des coefficients  $a_{ij}$ . Par exemple, nous pouvons nous intéresser à l'effet sur  $\lambda$  d'une variation relative de 10% sur un taux de survie ou une fécondité.

### 3.1.2.2 Utilisation des modèles matriciels en écotoxicologie

Les modèles matriciels ont été proposés dans les années 1990 (Caswell 1996 ; Levin et al. 1996) pour l'écotoxicologie afin de comprendre les effets des contaminants observés lors de bioessais individuels sur la dynamique des populations. Ainsi, de nombreuses études ont utilisé ces modèles pour proposer une interprétation des effets au niveau populationnel. Le **Tableau I-4** propose une liste non exhaustive d'études qui ont utilisé cette méthodologie pour extrapoler au niveau populationnel des effets observés au niveau individuel lors de bioessais au laboratoire ou *in situ*. Cette méthodologie a été utilisée en écotoxicologie aussi bien terrestre qu'aquatique, pour une grande gamme de taxons (plantes, insectes, oiseaux, crustacés, mollusques, poisson) et pour des types de contamination très variés (métaux, pesticides, rejets de station d'épuration, PCB...).

La plupart des modèles matriciels utilisés pour analyser les données d'écotoxicologie sont des modèles en classe d'âge comme celui décrit précédemment. Cependant, d'autres types de modèles matriciels sont également employés. Les modèles structurés en classes de taille sont souvent utilisés pour des organismes où les traits de vie tels que la reproduction ou la croissance vont être fortement corrélés avec la taille de l'organisme. Ces modèles permettent alors de décrire de façon plus réaliste le fonctionnement de la population. Cette méthode est notamment couramment utilisée pour l'étude des populations végétales (Logofet and Denisenko 1999 ; Crone et al. 2009). Les modèles matriciels peuvent aussi être utilisés dans le cadre de populations avec des mécanismes de régulations densités-dépendants ou pour l'étude de populations fragmentées (Chaumot et al. 2002 ; Chaumot et al. 2003b ; 2003a) afin d'incorporer par exemple des processus migratoires entre différentes sous-populations dans le modèle et comprendre l'interaction entre l'hétérogénéité spatiale de la contamination et les processus démographiques.

Un des autres points forts des modèles matriciels en écotoxicologie vient également du fait qu'ils peuvent être couplés avec des modèles individuels comme par exemple les modèles DEBtox (Kooijman and Bedaux 1996 ; Lopes et al. 2005 ; Billoir et al. 2007 ; Billoir et al. 2008 ; Billoir et al. 2009).

Tableau I-4 : Liste non exhaustive de l'utilisation des modèles matriciels en écotoxicologie.

Facteur de stress	Type de données individuelles	Espèce	Type de modèle	Référence
Dichlorodiphényltrichloroéthane (DDE)	Impacts sur la survie des juvéniles	<i>Nycticorax nycticorax</i> (Oiseau)	Modèle en classes d'âge	(An et al. 2006)
Cadmium	Impacts sur la survie, la croissance et la fécondité	<i>Daphnia magna</i> (Crustacé)	Intégration d'un modèle DEBtox dans un modèle en classes d'âge	(Billoir et al. 2007)
Cyanobactéries <i>Microcystis aeruginosa</i>	Impacts sur la croissance et la reproduction	<i>Moina micrura</i> (Crustacé)	Intégration d'un modèle DEBtox dans un modèle en classes d'âge	(Billoir et al. 2009)
Insecticide (Fipronil)	Impacts sur la survie, la croissance et la reproduction	<i>Amphiascus tenuiremis</i> (Crustacé)	Modèle en classes de taille	(Chandler et al. 2004)
Disponibilité en nourriture	Impacts sur la reproduction	<i>Chironomus riparius</i> (Insecte)	Modèle en classes d'âge	(Charles et al. 2004)
Simulation de scénarios de contaminations au Cadmium	Données issues de la littérature sur la reproduction, la survie, la croissance	<i>Salmo trutta fario</i> (Poisson)	Modèle en classes d'âge spatialisé - modèle en classes d'âge spatialisé avec densité dépendance	(Chaumot et al. 2002 ; Chaumot et al. 2003a ; 2003b)
Zinc	Impacts sur la croissance, la reproduction et la survie	<i>Haliothis diversicolor supertexta</i> (Mollusque)	Modèle en classes d'âge	(Chen and Liao 2004)

Facteur de stress	Type de données individuelles	Espèce	Type de modèle	Référence
Température et de l'humidité	Impacts sur la mortalité, la reproduction et le temps de développement	<i>Paronychiurus kimi</i> (Insecte)	Modèle en classes d'âge	(Choi et al. 2006a)
Herbicide (Picloram)	Impacts sur la survie, la croissance	<i>Balsamorhiza sagittata</i> (Plante à fleur)	Modèle en classes de taille	(Crone et al. 2009)
Zinc	Impacts sur la survie, la croissance et la reproduction	<i>Valvata piscinalis</i> (Mollusque)	Intégration d'un modèle DEBtox dans un modèle en classes d'âge	(Ducrot et al. 2007)
Zinc	Impacts sur la survie, la croissance et la reproduction	<i>Branchiura sowerbyi</i> (Oligochète)	Intégration d'un modèle DEBtox dans un modèle en classes d'âge	(Ducrot et al. 2010)
Nonylphenol	Impacts sur la survie, la fécondité et l'âge de première reproduction	<i>Capitella sp.</i> (Polychète)	Modèle en classes d'âge	(Hansen et al. 1999a)
Contamination des rivières en Suède (HAP)	Réduction de la taille des gonades	<i>Perca fluviatilis</i> (Poisson)	Modèle en classes d'âge	(Hanson 2009a)
Perturbateurs endocriniens	Diminution de la proportion de femelles.	<i>Zoarces viviparus</i> (Poisson)	Modèle en classes d'âge	(Hanson et al. 2005)
Métaux lourds (Cuivre, Zinc, Cadmium, ...)	Impacts sur la survie, la fertilité issus de la littérature	<i>Pimephales promelas</i> (Poisson)	Modèle en classes d'âge	(Iwasaki et al. 2010)

Facteur de stress	Type de données individuelles	Espèce	Type de modèle	Référence
Cuivre	Impacts sur la croissance et la reproduction	<i>Lumbricus rubellus</i> (Oligochète)	Intégration d'un modèle DEBtox dans un modèle en classes de taille	(Klok and De Roos 1996)
Contamination métallique du sol	Impacts sur la croissance et la reproduction	<i>Lumbricus rubellus</i> (Oligochète)	Intégration d'un modèle DEBtox dans un modèle en classes d'âge	(Klok et al. 2006)
Contamination au cuivre du sol	Impacts sur la croissance et la reproduction	<i>Dendrobaena octaedra</i> (Oligochète)	Intégration d'un modèle DEBtox dans un modèle en classes d'âge	(Klok et al. 2007)
Métaux lourds	Impacts sur la croissance, la fécondité et la survie	<i>Americamysis bahia</i> (Crustacés)	Modèle en classes d'âge	(Kuhn et al. 2000)
Sédiments enrichis en cadmium	Impacts sur la croissance, la fécondité et la survie	<i>Ampelisca abdita</i> (Crustacé)	Modèle en classes d'âge	(Kuhn et al. 2002)
Mercuré	Impacts sur la reproduction	<i>Meretrix lusoria</i> (Mollusque)	Modèle en classes d'âge couplé à un modèle épidémiologique	(Liao and Yeh 2007)
Arsenic	Impacts sur la croissance et la reproduction	<i>Oreochromis mossambicus</i> (Poisson)	Intégration d'un modèle DEBtox dans un modèle en classes d'âge	(Liao et al. 2006)
Nonylphenol	Impacts sur la croissance, la fécondité et la survie	<i>Oryzias latipes</i> (Poisson)	Modèle en classes d'âge	(Lin et al. 2005 ; Lin and Meng 2009)

Facteur de stress	Type de données individuelles	Espèce	Type de modèle	Référence
Pesticide (Methiocarb)	Impacts sur la survie des œufs, des larves et des pupes	<i>Chironomus riparius</i> (Insecte)	Modèle en classes d'âge	(Lopes et al. 2005)
Rejets d'une usine de traitement des eaux usées	Impacts sur la survie, l'âge à la maturité sexuelle	<i>Nitocra spinipes</i> (Crustacé)	Modèle en classes de taille	(Lundström et al. 2010)
Perturbateur endocrinien (17 $\alpha$ -trenbolone & 17 $\beta$ -trenbolone)	Impacts sur la survie et la reproduction	<i>Pimephales promelas</i> (Poisson)	Modèle en classes d'âge	(Miller and Ankley 2004 ; Miller et al. 2007)
PCB, dioxine	Impacts sur la survie et la reproduction	<i>Fundulus heteroclitus</i> (Poisson)	Modèle en classes d'âge	(Munns Jr et al. 1997)
HHCB (1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylcyclopenta[ $\gamma$ ]-2-benzopyran)	Impacts sur la croissance des juvéniles et des adultes, la survie, l'âge de première reproduction, l'alimentation	<i>Potamopyrgus antipodarum</i> (Mollusque)	Modèle en classes d'âge	(Pedersen et al. 2009)
Méthoprène	Impacts sur la croissance et la reproduction	<i>Americamysis bahia</i> (Crustacés)	Modèle en classes d'âge	(Raimondo and McKenney Jr 2005)
Méthoprène, Nitrate d'argent, Thiobencarb, Fenthion, Tribufos	Impacts sur la survie et la reproduction	<i>Americamysis bahia</i> (Crustacés)	Modèle en classes d'âge	(Raimondo and McKenney Jr 2006)
Cadmium	Impacts sur la survie et la reproduction	<i>Biomphalaria glabrata</i> (Mollusque)	Modèle en classes d'âge - modèle en classe de taille	(Salice and Miller 2003)



Facteur de stress	Type de données individuelles	Espèce	Type de modèle	Référence
Température	Impacts sur la croissance, la reproduction et la survie	<i>Corophium volutator</i> (Crustacé)	Modèle en classes de taille incluant de la prédation	(Smit et al. 2006)
Scénarios de perturbations	Impacts sur la croissance et la reproduction	<i>Oncorhynchus kisutch</i> , <i>Oncorhynchus nerka</i> , <i>Oncorhynchus nerka</i> (Poisson)	Modèle en classes d'âge	(Spromberg and Birge 2005a)
Insecticide (Margosan-O)	Impacts sur la survie et la reproduction	<i>Acyrtosiphoni pisum</i> (Insecte)	Modèle en classes d'âge	(Wennergren and Stark 2000)

### 3.1.3 Les modèles individu-centré ou Individual Based Models (IBM)

L'approche individu-centrée se réfère aux modèles de simulation qui traitent les individus comme des entités uniques et discrètes possédant en plus de leur âge au moins une propriété (appelé attribut), qui change au cours de leur cycle de vie (Grimm and Railsback 2005). L'approche individu-centrée peut donc être considérée comme *une approche réductionniste cherchant à faire émerger les propriétés d'un système (une population par exemple) à partir de la représentation des propriétés des éléments le constituant (les individus) et de leurs interactions* (Grimm 1999 ; Lomnicki 1999). Ainsi, cette modélisation est basée sur le principe que la variabilité entre les individus et les interactions entre ces individus influencent de manière significative la dynamique globale des populations ou des communautés (Lomnicki 1999). La formulation d'un modèle individu-centré consiste à attribuer des règles de comportement aux individus sous la forme de fonctions discrètes ou continues (appelées tâches) qui déterminent l'activité d'un individu (la croissance, la reproduction, la survie, *etc.*). Ces tâches dépendent des variables environnementales, des états de l'individu et des états des autres individus présents (Beaudoin 2007). A partir des années 1990, les modèles individus-centrés ont commencé à être utilisés en écotoxicologie pour modéliser la dynamique de population de poissons (DeAngelis et al. 1991 ; Madenjian et al. 1993 ; Jaworska et al. 1997 ; Beard Jr and Essington 2000 ; Van Nes et al. 2002 ; Beaudouin et al. 2008), d'oligochètes (Baveco and De Roos 1996), de mollusques (Choi et al. 2006b), de crustacés (Rinke and Petzoldt 2008 ; Vanoverbeke 2008 ; Preuss et al. 2009a ; Preuss et al. 2010), d'oiseaux (Davidson and Armstrong 2002 ; Stillman 2008), de mammifères (Hickie et al. 2005) ou encore de végétaux (Van Nes et al. 2003). Ces modèles ont notamment été utilisés pour l'étude de l'accumulation et des effets des PCB chez les poissons (Madenjian et al. 1993 ; Jaworska et al. 1997).

Les modèles individu-centrés présentent néanmoins un certain nombre d'inconvénients (Grimm 1999) :

- un modèle individu-centré est difficile à communiquer, la seule description complète et correcte d'un tel type de modèle étant le programme lui-même
- les modèles individu-centrés ne sont pas faciles à comprendre puisque le lien entre les grandeurs observées et la formulation du modèle n'est pas explicite contrairement aux modèles matriciels. En effet, il n'y a pas de formalisme

mathématique et si beaucoup de propriétés sont prises en compte, ces modèles deviennent rapidement complexes.

- ils nécessitent de nombreuses données pour être calibrés et validés

## 3.2 Intérêts et limites des modèles démographiques dans les démarches d'évaluation du risque écologique

### 3.2.1 Intérêts des modèles démographiques pour l'évaluation du risque écologique

Les différentes réglementations conduisent à de plus en plus d'évaluation du risque écologique, que ce soit dans des démarches prédictives (*e.g.*, système REACH) ou de diagnostic (*e.g.*, DCE) avec pour objectif de protéger les populations naturelles. Etant donné la difficulté d'étudier directement les populations, l'extrapolation des effets observés sur les individus sur la persistance des populations représente une démarche prometteuse et les modèles apparaissent comme une bonne solution pour répondre aux demandes des réglementations (Landis 2006 ; Forbes et al. 2009 ; Forbes et al. 2010 ; Galic et al. 2010 ; Hommen et al. 2010). Bien que les modèles aient été utilisés de manière courante par les réglementations dans différents domaines d'application : en biologie de la conservation (Grimm et al. 2004 ; Drechsler et al. 2007), pour la gestion des forêts (Pretzsch et al. 2002 ; Huth and Tietjen 2007), la mise en place des quotas de pêche (Guénette and Pitcher 1999 ; Walters et al. 2000 ; Martell et al. 2008) ou en épidémiologie (Eisinger and Thulke 2008) par exemple, leur utilisation dans les démarches d'évaluation du risque écologique est encore relativement rare. Les industriels et les agences réglementaires se montrent cependant de plus en plus intéressés par le potentiel de ces modèles comme le souligne différents projets récents (Forbes et al. 2009 ; Grimm et al. 2009 ; Preuss et al. 2009b). Par exemple, dans le domaine de l'évaluation des risques liés à l'utilisation des pesticides, des démarches utilisant des modèles de dynamique de population commencent à être proposées (Forbes et al. 2009 ; Thorbek et al. 2009 ; Wang and Grimm 2010).

Un certain nombre d'interrogations persistent concernant le choix du type de modèle ou les indicateurs à utiliser à la sortie des modèles. Concernant le type de modèle, une revue récente sur l'utilisation des modèles dans les démarches d'évaluation du risque écologique (Galic et al. 2010), portant sur l'analyse de 68 études utilisant des modèles dans une problématique d'extrapolation, montre que les modèles matriciels sont les plus utilisés (51%). Ils représentent de bons outils pour être proposés dans un cadre réglementaire étant donné leur utilisation beaucoup

plus simple par rapport à des modèles d'équations différentielles ou des modèles individu-centrés. De plus, la possibilité de les combiner avec des modèles individuels comme les modèles DEBtox est particulièrement intéressante dans l'optique d'une approche de modélisation aux différents niveaux biologiques dans un contexte réglementaire (Massarin 2010).

Concernant les indicateurs populationnels, les indicateurs démographiques (*e.g.*, taux de croissance de la population, densité, biomasse) sont généralement utilisés. Parmi ceux-ci, le taux d'accroissement asymptotique de la population  $\lambda$  est le plus couramment utilisé et représente un indicateur pertinent de la santé des populations : il est sensible aux variations des traits de vie individuels à l'entrée des modèles, facile à interpréter et il est possible de faire des analyses de sensibilité ou d'élasticité afin de déterminer quels sont les traits individuels les plus influents au niveau de la population (Forbes and Calow 1999). Ainsi, de faibles variations au niveau d'un trait de vie clé vont pouvoir conduire, au niveau de la dynamique de population, à des impacts importants sur le taux d'accroissement de la population. Par exemple, Jensen et al. (2001) observent chez le mollusque *Potamopyrgus antipodarum* de faibles effets lors d'une exposition au cadmium sur les marqueurs individuels mais des conséquences fortes au niveau populationnel sur le taux d'accroissement de la population. A l'opposé, l'étude du taux d'accroissement permet aussi de relativiser les effets de certains contaminants observés lors de bioessais. Par exemple, Pedersen et al. (2009) observent, toujours chez le mollusque *Potamopyrgus antipodarum*, des effets significatifs d'un musc synthétique utilisé dans l'industrie (le 1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexaméthylcyclopenta[ $\gamma$ ]-2-benzopyrane) sur le taux de croissance des juvéniles, le temps de première reproduction, le nombre d'embryons par femelle. Cependant, une fois ces effets intégrés dans un modèle matriciel à deux classes d'âges (juvéniles et adultes), les effets sur le taux d'accroissement de la population ne se révèlent pas significatifs. Dans le même sens, Widarto et al. (2007) observent chez le collembole *Folsomia candida* une stimulation de la fécondité suite à une exposition au nonylphenol qui n'a pas d'impact sur le taux d'accroissement de la population.

Pour les expérimentations au laboratoire, il est possible de définir, à partir de la courbe dose-réponse entre la concentration du contaminant et le taux d'accroissement de la population la PNEC (« Predicted No Effect Concentration »), la concentration pour laquelle  $\lambda = 1$ , c'est-à-dire la concentration pour laquelle la population n'est ni en accroissement, ni en diminution mais dans un état stable (Selck et al. 2002 ; Lin et al. 2005 ; Billoir et al. 2007 ; Roman et al. 2007). Ainsi, une exposition à une concentration plus forte que la PNEC conduira à une extinction à plus ou moins long terme de la population.

Plusieurs auteurs ont critiqué l'utilisation du taux d'accroissement asymptotique de la population  $\lambda$  comme une valeur absolue utilisable pour l'évaluation du risque écologique (Jensen et al. 2001 ; Chaumot et al. 2002 ; Chaumot et al. 2003b). Ils proposent ainsi de plutôt s'intéresser à la sensibilité du  $\lambda$  lors d'une contamination en regardant les variations de  $\lambda$  par rapport à une situation de référence (*e.g.*, pourcentage de diminution de  $\lambda$  par exemple). En effet, le calcul du  $\lambda$  offre un indicateur de la santé démographique de la population mais n'est pas assez réaliste pour être considéré comme une valeur exacte.

D'autres indicateurs ont également été proposés pour évaluer les conséquences d'une contamination au niveau populationnel. Ainsi, nous pouvons citer divers indicateurs tels que le risque d'extinction de la population (Tanaka and Nakanishi 2000 ; Nakamaru et al. 2002 ; 2003 ; Tanaka 2003 ; An et al. 2006 ; Schmolke et al. 2010), le temps de récupération de la population (Beard Jr and Essington 2000 ; Stark et al. 2007 ; Wang and Grimm 2010), les modifications de la structure stable de la population (Chaumot 2002 ; Landis and Kaminski 2007) ou la taille de la population à l'équilibre (Hayashi et al. 2009) qui sont aussi régulièrement utilisés et qui peuvent être également très informatifs. En effet, dans un cadre réglementaire, il peut être plus parlant pour les gestionnaires de parler en terme de risque d'extinction ou de temps de récupération qu'en % de diminution du taux d'accroissement asymptotique de la population (Thorbeck et al. 2009 ; Galic et al. 2010 ; Schmolke et al. 2010). Enfin, d'autres indicateurs sur le fonctionnement plus global de la population et de l'écosystème ont également été proposés tels que la perte de biomasse, l'impact sur les chaînes trophiques, la dégradation de certains processus clés au sein de l'écosystème (*e.g.*, vitesse de dégradation de la matière organique) (Hayes and Landis 2004 ; Landis and Kaminski 2007). Ces indicateurs peuvent également être très pertinents dans une optique de gestion des milieux aquatiques mais sont généralement très complexes à estimer.

### 3.2.2 Limites des modèles démographiques pour l'évaluation du risque écologique

Bien que très prometteurs, les modèles actuellement utilisés dans les démarches d'évaluation de la qualité écologique présentent un certain nombre de limites en raison notamment de leur manque de pertinence écologique. En effet, de nombreux facteurs tels que la physiologie et l'histoire de vie de l'espèce, la variabilité saisonnière de la sensibilité aux contaminants, les interactions avec les autres espèces de l'écosystème (*e.g.*, prédation, compétition) ou encore les phénomènes de densité dépendance peuvent jouer un rôle central dans la sensibilité démographique d'une population à un facteur stress toxique. Cependant, ces

différents facteurs ne sont que rarement pris en compte dans les modèles utilisés jusqu'à présent pour l'évaluation du risque écologique.

### 3.2.2.1 Choix de l'espèce et importance des histoires de vie

Une des premières critiques concernant les modèles actuellement utilisés pour l'évaluation du risque écologique concerne le choix des espèces utilisées. En effet, les études sont réalisées la plupart du temps sur des espèces modèles utilisées dans des tests de toxicité au laboratoire. Ces espèces sont souvent peu représentatives des milieux étudiés (*e.g.*, large utilisation des crustacés de type daphnies ou des poissons tropicaux tels que *Danio rerio* pour les études portant sur des milieux lotiques tempérés). Ainsi, il est difficile de transférer les résultats observés sur ces espèces vers d'autres espèces plus représentatives de l'écosystème étudié (Forbes and Calow 2002). Perreira et al. (2000) suggèrent d'utiliser dans les modèles de dynamique de population des espèces pertinentes d'un point de vue écologique telles que des « espèces sentinelles » ou des « espèces clés ». Ces espèces devraient ainsi être abondantes et jouer un rôle clé au sein des écosystèmes comme par exemple dans les processus de décomposition de la matière organique (Baird et al. 2007a).

De plus, les modèles développés pour l'évaluation écotoxicologique au niveau populationnel sont en général limités à une seule espèce. Or, des effets similaires observés chez différentes espèces lors de bioessais au niveau individuel (*e.g.*, une diminution de 20% de la fécondité) peuvent se traduire par des conséquences très différentes au niveau de la population en fonction du cycle de vie des espèces (Møller et al. 1996 ; Forbes et al. 2001 ; Forbes and Calow 2002 ; Salice and Miller 2003 ; Stark et al. 2004 ; Spromberg and Birge 2005a ; Forbes et al. 2006 ; Stark et al. 2007). En effet, chaque espèce, et même chaque population, présente une histoire de vie adaptée à son habitat naturel tout en étant fixée par des contraintes phylogénétiques d'autre part. Comme une expression de ces adaptations, les individus de chaque espèce présentent des compromis évolutifs (*trade-offs*) différents entre leurs différents traits de vie (Spromberg and Birge 2005a). Il existe ainsi une très large gamme possible de stratégie au niveau des histoires de vie qui vont conduire à des réponses différentes face à un facteur de stress toxique. Par exemple, une inhibition ponctuelle de la reproduction aura des conséquences moins importantes sur la dynamique de population d'une espèce itéropare (c'est-à-dire une espèce où les individus se reproduisent à plusieurs reprises au cours de leur vie) que sur la dynamique de population d'une espèce sémelpare (c'est-à-dire une espèce où les individus se reproduisent à une seule reprise au

cours de leur vie). Stark et al. (2004), dans une étude récente, illustrent ainsi clairement l'influence des histoires de vie en comparant l'influence d'une diminution de 50% de la fécondité, d'une augmentation de 50% de la mortalité, ou d'une combinaison des deux sur la dynamique de population de sept espèces d'arthropodes (*A. pisum*, *C. septempunctata*, *D. rapae*, *D. pulex*, *B. dorsalis*, *F. arisanus* et *F. vandenboschi*). Les résultats des simulations montrent qu'un même niveau du facteur de stress appliqué aux critères individuels induit un impact sur la dynamique de population qui diffère entre les espèces testées en fonction de leur stratégie d'histoire de vie. Cette observation contredit clairement l'hypothèse selon laquelle un niveau d'effet donné est comparable d'une espèce à l'autre et souligne l'importance de prendre en compte les caractéristiques des histoires de vie. Spromberg and Bridge (2005b) propose ainsi un indice de sensibilité chez les poissons en comparant 34 espèces et souligne les fortes différences de sensibilité en lien avec les différences d'histoire de vie des espèces.

De même que pour les différences d'histoire de vie entre espèces, les variations entre populations peuvent également être très importantes en raison des adaptations locales et devraient aussi idéalement être prise en compte (Clark 2003). Par exemple, des différences importantes de tolérance au zinc ont été observées chez le crustacé *Gammarus pulex* entre différentes populations (Maltby 1999).

### 3.2.2.2 Importance de la variabilité saisonnière

La sensibilité d'une population à un facteur de stress toxique va aussi dépendre fortement de la saison à laquelle a lieu l'exposition à ce facteur (Ares 2003 ; Landis 2006 ; Smit et al. 2006 ; Banks et al. 2008 ; Meng et al. 2009). Par exemple, Smit et al. (2006) montrent, dans une étude avec le crustacé amphipode *Corophium volutator*, des différences importantes du taux de croissance de la population au cours de l'année ainsi que de l'impact de différents scénarios de mortalité. L'exposition à un contaminant ayant de forts effets reprotoxiques aura donc des conséquences bien plus importantes au niveau de la population si elle intervient durant une période de forte reproduction des individus plutôt que pendant une période où les femelles se reproduisent peu ou pas. Cependant, cette prise en compte de l'influence de la variabilité saisonnière des traits de vie dans les modèles est encore très rare alors que pour de nombreux contaminants (*e.g.*, les pesticides), les expositions sont souvent très ponctuelles à des périodes données de l'année. Il serait ainsi beaucoup plus pertinent de prendre en compte cette variabilité saisonnière des traits de vie dans la construction des modèles de dynamique de population (Ares 2003).

### 3.2.2.3 Importance du degré de réalisme du modèle

Les modèles développés pour décrire la dynamique de la population sont parfois très simplistes. Ainsi, la population est souvent résumée en deux ou trois classes d'organismes avec des juvéniles et des adultes (Calow et al. 1997) et la variabilité liée à l'âge ou la taille sur des traits de vie tels que la reproduction, la croissance ou la reproduction n'est dans ce cas pas prise en compte. La pertinence écologique de ces modèles est alors contestable. Ainsi, Hanson et Stark (2011) comparent chez trois espèces de crustacés (*D. magna*, *D. pulex* et *C. dubia*) un modèle simple à deux classes et un modèle plus complexe. Ils observent, en simulant différents scénarios de réduction de la survie et de la fécondité, que le modèle à seulement deux classes de taille surestime les effets au niveau populationnel chez *C. dubia* et les sous-estime chez *D. magna*.

Cependant, Hansen et al. (1999a), dans une étude sur l'impact du 4-n-nonylphenol sur la dynamique de population du polychète *Capitella sp.*, comparent deux modèles matriciels : un modèle avec seulement deux classes d'individus (juvéniles et adultes) et un modèle structuré en 11 classes d'âges, chaque classe ayant une durée d'une semaine. Ils observent pour les deux types de modèles des effets similaires sur le taux d'accroissement de la population. Une des difficultés pour pouvoir utiliser des modèles plus réalistes réside dans le fait de disposer de suffisamment de données individuelles sur les traits de vie. En effet, utiliser un modèle matriciel avec un grand nombre de classes de taille ou d'âge ne permettra pas d'être plus réaliste si nous ne disposons pas d'informations suffisantes pour chacune des classes et que les mêmes taux vitaux sont appliqués à chacune d'elles. De plus, les modèles plus complexes ont également des coûts en terme de paramétrisation et d'analyse et sont généralement plus compliqués à interpréter.

### 3.2.2.4 Prise en compte de la densité-dépendance

Les phénomènes de densité-dépendance peuvent également avoir un rôle important sur la sensibilité démographique d'une population exposée un facteur de stress toxique (Moe et al. 2002 ; Moe et al. 2005 ; Hanson 2009a ; Hayashi et al. 2009 ; Sibly et al. 2009 ; Hanson and Stark 2011). Lors d'un stress toxique, les mécanismes de densité dépendance peuvent jouer de deux façons principales sur la dynamique de la population :



- la densité des populations est souvent limitée par la quantité de nourriture disponible dans le milieu (on parle alors parfois de régulation de la population de type *bottom-up*, Hanson and Stark 2011). Lors de l'exposition à un facteur de stress toxique, la mortalité engendrée par le contaminant peut avoir pour conséquence une plus grande disponibilité de la nourriture pour les individus ayant survécu. La compétition entre les individus de la population pour l'accès à la nourriture est alors moins forte et leur fitness pourra ainsi être augmentée. L'effet sur la population à long terme sera alors relativement faible.

- une autre forme de densité-dépendance dans les populations vient de la régulation par les mécanismes de prédation (Stige et al. 2011) (on parle alors de régulation de la population de type *top-down*, Hanson and Stark 2011). Lors de l'exposition à un facteur de stress toxique, les populations de prédateurs qui régulaient la population étudiée peuvent elles aussi être impactées ce qui aura pour conséquence une diminution des pressions liées à la prédation sur la population de proies. Ainsi, l'effet sur la population de proies à long terme sera plus faible.

Hayashi et al. (2009) montrent ainsi, en comparant des modèles tenant compte de la densité dépendance, lors d'une étude de l'impact du zinc sur deux espèces de poissons (*P. promelas* et *S. fontinalis*), des différences importantes par rapport à des études n'en tenant pas compte. Ainsi, avec des analyses de sensibilité, il montre que la survie adulte est un paramètre sensible contrairement à ce qui avait été montré sans prendre en compte la densité dépendance.

### 3.2.2.5 Prise en compte des processus de migration entre population

L'influence d'un contaminant au niveau populationnel à travers des perturbations du comportement de migration des populations est très rarement prise en compte. Cependant, des études ont montrées que cela pouvait influencer de façon significative la dynamique des populations (Hansen et al. 1999b ; Ares 2003 ; Chaumot et al. 2003a ; 2003b). Par exemple, chez la truite (*Salmo trutta*), Chaumot (2003a) souligne le fait que des perturbations des processus migratoires liées à une exposition au cadmium peuvent conduire à une altération de la dynamique de la population, au même titre que des effets sur des traits de vie tels que la fécondité ou la survie.

### 3.3 Intégration des marqueurs sub-individuels dans les démarches d'extrapolation

Pour avancer vers une évaluation à la fois spécifique des effets des contaminants et pertinente d'un point de vue écologique, les démarches multi-échelles, limitées pour le moment à des liens entre des effets observés sur des marqueurs individuels et leurs conséquences au niveau des populations, pourraient être étendues à la prise en compte des effets observés sur des niveaux d'organisation biologique inférieurs (e.g., cellule, tissus) à travers la mesure de divers biomarqueurs.

Récemment, dans les démarches prédictives, le concept d'*adverse outcome pathway* (AOP) a été proposé dans ce sens (Ankley et al. 2010 ; Kramer et al. 2011). Un AOP est « un schéma conceptuel qui relie des effets observés au niveau moléculaire ou cellulaire (e.g., une interaction entre un xénobiotique et une protéine spécifique) jusqu'à leurs conséquences sur des niveaux d'organisation pertinent pour l'évaluation du risque (e.g., la population) » (Ankley et al. 2010) (**Figure I-6**). Ainsi, les AOP sont généralement constitués d'une série d'évènements qui se produisent aux différents niveaux d'organisation biologique. Les liens entre les différents niveaux doivent être des liens de causes, mécanistes, inférentiels ou basés sur des corrélations et la modélisation est alors utilisée en support pour formaliser ces liens entre les différents niveaux d'organisation biologique. Le terme *adverse outcome pathway* a été proposé pour élargir le terme *toxicity pathway* défini par le National Research Council américain qui se limite aux liens entre un xénobiotique et des effets moléculaire ou cellulaire.

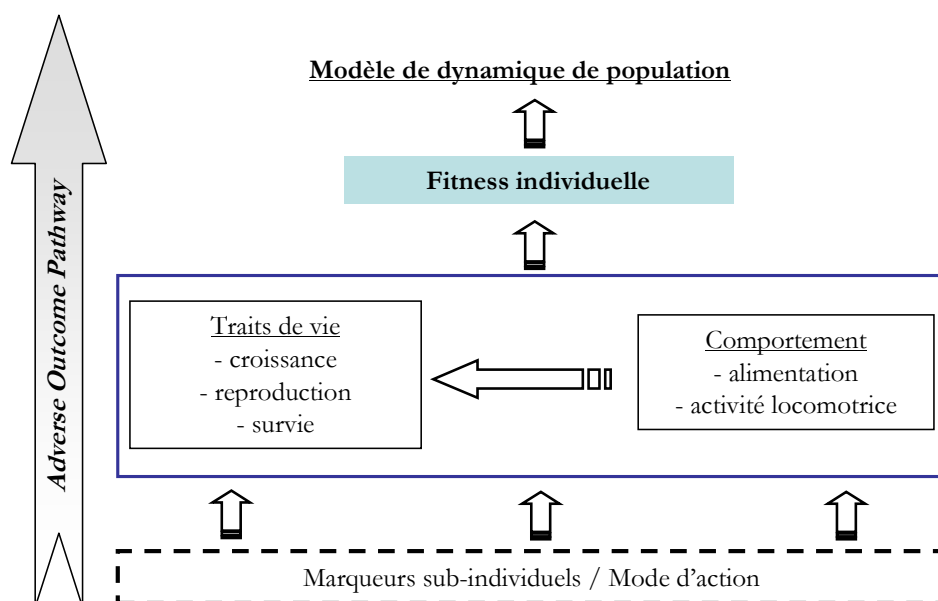
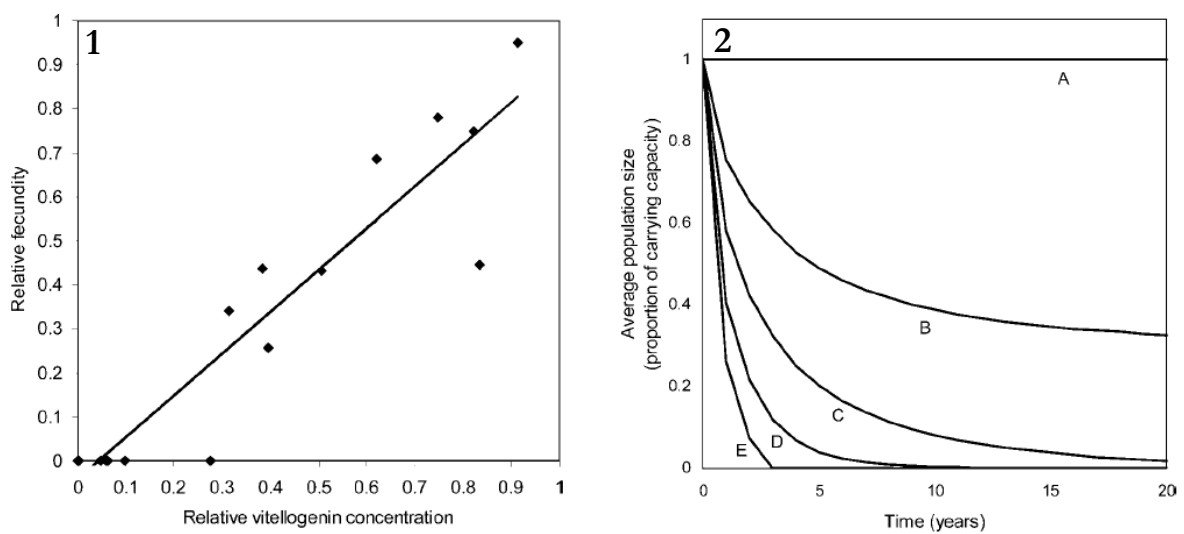


Figure I-6 : Illustration simplifiée du concept d'*Adverse Outcome Pathway* (modifié d'après Kramer et al. 2011).

Dans une étude récente, Miller et al. (2007) proposent un exemple qui illustre bien la démarche des AOP. Dans cette étude, les auteurs s'intéressent à l'impact de cinq xénobiotiques (le 17 $\beta$ -Trenbolone, le 17 $\alpha$ -Trenbolone, le Prochloraz, le Fenarimol et le Fadrozole) sur la quantité de vitellogénine (vtg) des femelles chez le poisson *Pimephales promelas* (cyprinidé d'eau douce). Une diminution de la quantité de vtg est alors observée en fonction de la concentration. Les auteurs montrent ensuite que cette diminution de la vtg est fortement corrélée à une diminution de la fécondité des femelles (**Figure I-7**). Une extrapolation au niveau populationnel est enfin réalisée *via* un modèle matriciel et différents scénarios soulignent alors l'impact d'une inhibition de la vtg chez les femelles sur la dynamique de population.



**Figure I-7 : Exemple d'utilisation de la démarche des *Adverse Outcome Pathway* dans les approches prédictives (Miller et al. 2007).**

(1) relation entre la quantité de vtg et la fécondité des femelles de *P. promelas* exposées à différents xénobiotiques. (2) impact au niveau populationnel de différents scénarios d'inhibition de la vtg (A : pas d'inhibition, B : 25% d'inhibition, C : 50% d'inhibition, D : 75% d'inhibition, E : 96% d'inhibition)

La même philosophie peut être proposée dans le cadre du diagnostic de la qualité des milieux aquatiques *via* l'intégration des réponses observées sur des biomarqueurs sub-individuels en lien avec la fitness des organismes (Forbes et al. 2006). Bien qu'il existe encore peu de données quant à la relation entre réponse biochimique et conséquence au niveau individuel, de plus en plus d'études tentent d'établir des liens entre ces différents niveaux d'organisation. Par exemple, nous pouvons citer l'étude de Xuereb et al. (2009b) qui démontre clairement qu'une inhibition de l'AChE chez le crustacé amphipode *Gammarus fossarum* entraîne une diminution de l'alimentation et de l'activité locomotrice des individus. Nous pouvons aussi citer l'étude de Lewis et Galloway

(2009) qui établit un lien statistique entre dommages à l'ADN des spermatozoïdes du ver *Arenicola marinus* et de la moule *Mytilus edulis* et un développement anormal des embryons issus de ces spermatozoïdes. Pour Amiard et Amiard-Triquet (2008), les perturbations dues aux contaminants aux niveaux individuels et sub-individuels qui paraissent avoir le plus de chance d'être liées à des effets aux niveaux d'intégration biologiques supérieurs sont toutes celles qui vont affecter la fonction de reproduction.

## Synthèse :

### Extrapolation des effets individuels au niveau populationnel

Un des principaux objectifs de l'écotoxicologie réside dans l'évaluation de **l'impact des contaminants sur le devenir des populations naturelles et sur la santé des écosystèmes**. Cependant, l'étude directe des effets sur de telles entités biologiques demeure un objectif utopique en raison des nombreuses difficultés méthodologiques, techniques ou financières que cela représente dans la grande majorité des cas.

Les **modèles de dynamique de population** représentent des outils très prometteurs pour **extrapoler** les effets observés au niveau individuel sur des impacts au niveau des populations et ouvrir ainsi l'accès à la compréhension des effets sur des niveaux d'organisation écologiquement pertinents. Ces modèles donnent accès à des indicateurs particulièrement intéressants pour les gestionnaires des milieux aquatiques (*e.g.*, taux de croissance de la population, probabilité d'extinction, temps de récupération) tout en permettant d'identifier les traits de vie clé *via* les analyses de sensibilité ou d'élasticité.

Cependant, les modèles proposés restent encore très simples et leur pertinence écologique peut encore largement être améliorée notamment en intégrant :

- des espèces représentatives des milieux et présentant des cycles de vie contrastés
- l'influence de la variabilité saisonnière et spatiale des histoires de vie
- l'influence des phénomènes de densité dépendance (compétition, prédation, *etc.*).

Le couplage des méthodologies **de surveillance active** (*via* l'encagement d'organismes calibrés) qui permettent de mesurer les effets sur les traits de vie *in situ* et de la **modélisation de la dynamique des populations** permet d'envisager la mise en œuvre de ces approches dans le cadre du diagnostic de la qualité des milieux aquatiques.

Ces modèles peuvent être intégrés dans des démarches d'évaluation multi-échelles en partant des impacts aux niveaux cellulaires ou tissulaires jusqu'à leurs conséquences sur le devenir des populations naturelles.





## CHAPTRE II

### Matériels et méthodes

Ce chapitre présente dans une première partie les deux modèles biologiques utilisés durant ce travail doctoral : le crustacé amphipode *Gammarus fossarum* et le mollusque gastéropode *Potamopyrgus antipodarum*, l'accent étant mis sur leurs **caractéristiques écologiques**, leur **morphologie** et **identification**, leur **anatomie générale** ainsi que leur **utilisation en écotoxicologie**.

La suite présente les **protocoles des différentes expérimentations** mises en œuvre pour répondre aux différents objectifs de ce travail. Rappelons que les objectifs que nous nous sommes fixés sont d'une part, d'avancer dans la compréhension des réponses biologiques observées sur le terrain au niveau individuel (intégration de l'influence des facteurs de confusion pour la lecture des tests *in situ* par encagement) et d'autre part, de développer une méthodologie permettant l'interprétation au niveau populationnel des effets mesurés lors de ces tests *in situ* via la construction de modèles de dynamique de population.

Ainsi, la deuxième partie détaille les **protocoles des bioessais mis en place chez *Gammarus fossarum*** que ce soit au laboratoire ou *in situ* pour l'étude **du taux d'alimentation, des taux de croissance et de différents paramètres en lien avec la reproduction**.

Enfin, les parties **3** et **4** présentent les **protocoles de suivis des populations** pour les deux espèces ainsi que ceux des différentes expérimentations au laboratoire et *in situ* qui ont été menées pour estimer la **variabilité des différents traits de vie** : variabilité saisonnière (*e.g.* influence de la température), influence des facteurs biotiques (*e.g.* taille, stade de mue).





## 1 Modèles biologiques

### 1.1 *Gammarus fossarum*

#### 1.1.1 Classification

Plus de 4500 espèces appartiennent au sous-ordre des crustacés amphipodes « *Gammaridae* ». Ce sont les amphipodes les plus représentés et les plus largement répandus. Ils sont présents dans les milieux marins, dulçaquicoles et même plus rarement terrestres. Le genre *Gammarus*, présent dans tout l'hémisphère nord, est représenté par plus d'une centaine d'espèces dont la plupart sont dulçaquicoles (Barnard and Barnard 1983 ; Karaman and Pinkster 1987). L'espèce de gammare choisie pour ce travail de thèse est *Gammarus fossarum* (Koch, 1836). Dans des études antérieures, cette espèce peut aussi être retrouvée sous d'autres noms tels que *Gammarus delebecquei* ou encore *Gammarus pulex fossarum* qui correspondait alors à une sous espèce (Pacaud 1945 ; 1952). Sa systématique détaillée est synthétisée dans le **Tableau II-1**.

**Tableau II-1 : Classification de *G. fossarum* (Martin and Davis 2001).**

Embranchement	Arthropode
Super-classe	Crustacé
Classe	Malacostracé
Sous-classe	Eumalacostracé
Super-ordre	Pécararide
Ordre	Amphipode
Sous-ordre	<i>Gammaridae</i>
Genre	<i>Gammarus</i>
espèce	<i>fossarum</i> (Koch, 1836)

### 1.1.2 Ecologie et biologie

L'espèce *G. fossarum* occupe les ruisseaux et les rivières de plaine et de montagne, à l'intérieur d'une aire qui s'étend des Pyrénées à l'Europe de l'est, en incluant l'Europe centrale (Barnard and Barnard 1983) (**Figure II-1**). Des travaux plus récents (Živić and Marković 2007) révèlent que cette aire de distribution serait même plus étendue que ce qui était admis jusqu'à présent. Regroupés en populations de forte densité pouvant atteindre plusieurs milliers d'organismes au mètre carré (Felten 2003), les gammares affectionnent les substrats grossiers comme les galets ou les graviers et les substrats organiques comme les bryophytes, les végétaux rivulaires et la végétation morte. *G. fossarum* est un représentant typique des sources et des ruisseaux de montagne peu profonds, très oxygénés, oligotrophes à fort courant. Il peut s'adapter à des conditions environnementales très variées. En plaine, *G. fossarum* cohabite fréquemment avec *G. pulex*, mais en montagne, il subsiste généralement seul (Roux 1982 ; Barnard and Barnard 1983 ; Pöckl 1995). Il est moins exigeant que les autres espèces de gammares quant à la teneur en calcium de l'eau, bien que cet élément soit indispensable à sa croissance (Pacaud 1945 ; Peeters and Gardeniers 1998). Concernant la température de l'eau, elle doit être comprise entre 0 et 25°C, la température critique létale étant située entre 28 et 32°C (Wijnhoven et al. 2003). Concernant la teneur en oxygène, bien que relativement peu exigeant, *G. fossarum* se révèle généralement plus sensible que les autres espèces proches de *gammaridae* à une diminution brutale (Meijering 1991 ; Janetzky 1994 ; Maltby 1995).

Le gammare est un organisme à croissance discontinue par mues successives. Les nouveaux-nés croissent puis deviennent matures après un nombre déterminé de mues (10 mues pour *G. pulex*), la rapidité de succession de celles-ci étant température-dépendante et sexe-dépendante, les mâles ayant des phases d'inter-mue plus longues que les femelles. *G. fossarum* est une espèce itéropare, sa reproduction ayant lieu plusieurs fois dans l'année. Sa durée de vie semble se limiter à deux ans (Tachet et al. 2000). Les gammares sont souvent associés aux amas de matière organique (accumulation de feuilles en décomposition), aux mousses ou aux racines qui constituent leur habitat préférentiel où ils peuvent trouver de la nourriture, se cacher et s'accrocher. Ils affichent un vaste répertoire trophique, étant à la fois herbivores, détritivores et carnivores. Leur régime alimentaire est ubiquiste (Felten et al. 2008b) : composé de feuilles mortes, de biofilms, de larves de chironomidés ou encore de petits isopodes (Macneil et al. 1997). De plus, les amphipodes peuvent faire acte de cannibalisme.



Figure II-1 : Répartition géographique de *Gammarus fossarum* en Europe (Barnard and Barnard 1983).

Les gammares représentent une importante source de nourriture pour différentes espèces de poissons, de macroinvertébrés, d'oiseaux et d'amphibiens (Welton 1979 ; MacNeil et al. 2000). Ainsi, Welton (1979) a évalué que plus de 60% de la production annuelle de *Gammarus pulex* pouvait être consommée par les poissons (en particulier la truite *Salmo trutta* et le chabot *Cottus cobio*). De plus, ils jouent un rôle clef dans l'incorporation et la décomposition du matériel organique terrestre fixé dans les réseaux trophiques d'eau douce et dans la redistribution de la matière et de l'énergie (Maltby 1994 ; Forrow and Maltby 2000). Pour ces raisons, le gammare constitue donc un organisme essentiel au bon fonctionnement écologique des rivières.

1.1.3 Morphologie et identification de l'espèce

Le corps des amphipodes est divisé en quatre régions distinctes comprenant de l'avant vers l'arrière, le prosoma (*i.e.*, tête), le mésosoma (*i.e.*, thorax), ainsi que le métasoma et l'urosoma qui forment l'abdomen (**Figure II-2**) (Chevreux and Fage 1970 ; Roux 1970). Le corps d'un gammare dépasse rarement 20 mm et est caractérisé par une convexité dorsale régulière.

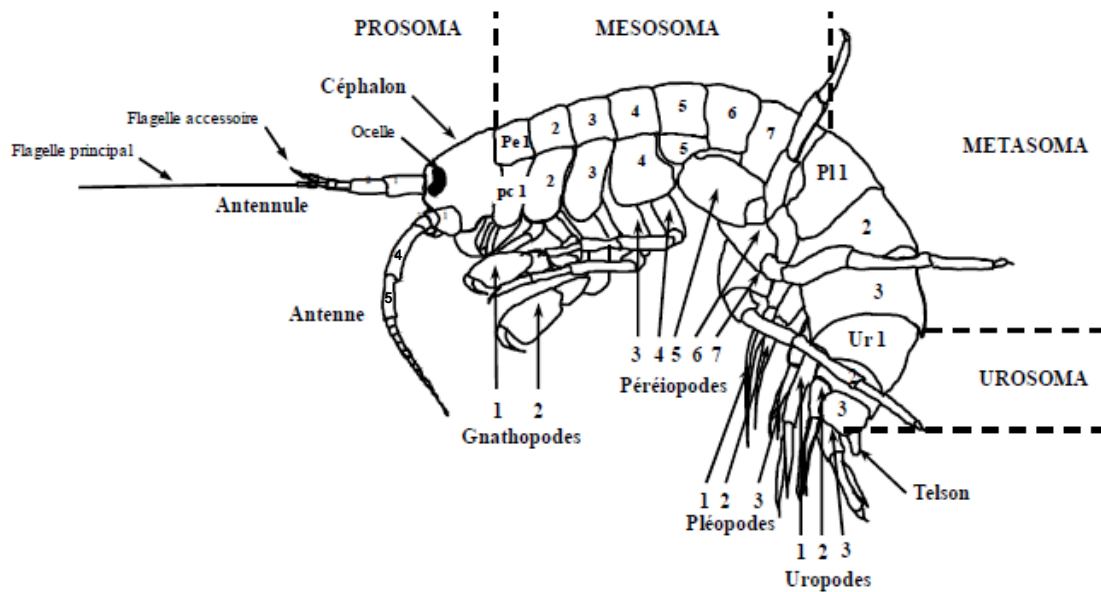


Figure II-2 : Vue latérale d'un *Gammaridae* (modifiée d'après Chevreux and Fage 1970 ; Roux 1970).

pc : plaques coxales ; Pe : périomères ; Pl : pléomères ; Ur : uropomères.

Le **prosoma** est constitué d'une seule pièce appelée céphalon, qui résulte de la fusion des métamères le constituant (*i.e.*, six segments céphaliques, plus le premier segment thoracique). Le céphalon porte latéralement une paire d'yeux composés et sessiles (*i.e.*, ocelles), une paire d'antennules et une paire d'antennes qui se prolongent vers l'avant, ainsi que quatre paires d'appendices masticateurs situées sur la face inférieure (*i.e.*, le labre, les mandibules, le labium, les maxillules et les maxilles).

Le **mésosoma** (encore appelé péréion) compte sept articles libres, chacun muni d'une paire d'appendices uniramés constituant les périopodes. Les deux premiers périopodes sont préhensibles et fixateurs. Ils constituent les gnatopodes 1 et 2. Les périopodes 3 à 7 sont locomoteurs. Chaque périopode est constitué, de la base vers son extrémité, d'un coxopodite, d'un basipodite, d'un ischiopodite, d'un mérupodite, d'un carpopodite, d'un propodite et d'un dactylopodite. Chez les femelles, la face interne des coxopodites de la deuxième paire de

gnatopodes et des trois paires de périopodes suivants porte une extension lobiforme, appelée oostégite. Les oostégites forment le plancher d'une chambre incubatrice (*i.e.*, le marsupium) au sein de laquelle les oeufs fécondés pourront se développer jusqu'à éclosion. La cavité ventrale qui abrite également les branchies est délimitée latéralement par des plaques coxales.

Le **métasoma** (ou pléon) est constitué de trois segments libres. Leurs tergites se prolongent latéralement en lamelles plus ou moins grandes appelées les plaques épimérales. Chaque segment porte une paire d'appendices biramés nommés les pléopodes. Ces pléopodes, en perpétuels mouvements synchronisés, jouent un rôle important dans la locomotion mais également dans la ventilation de la cavité branchiale ainsi que de la poche incubatrice chez les femelles.

L'**urosoma**, terminé par un court telson, est constitué de trois segments libres qui diminuent en taille de l'avant vers l'arrière. Chacun est muni d'une paire d'appendices biramés dénommés uropodes. Les uropodes 3 ont une partie interne (*i.e.*, endopodite) généralement plus court que l'externe (*i.e.*, exopodite).

Le genre *Gammarus* se distingue par son corps essentiellement lisse avec quelques épines et soies n'existant que sur le dos de l'urosoma. L'endopodite de l'uropode 3 est toujours présent et bien développé (toujours supérieur à 1/3 de l'exopodite) (Roux 1970 ; Karaman and Pinkster 1987). *Gammarus fossarum* se distingue des autres espèces du genre *Gammarus* par : 1- une cuticule non carénée, 2- l'absence de rayures sur le corps ; 3- de petites ocelles de formes ovales, 4- un rapport endopodite/exopodite (de l'uropode 3) compris entre 0.4 et 0.6 (**Figure II-3**) 5- des antennes portant un article 4 plus court que le 5, munies de longues soies insérées en six, sept ou exceptionnellement huit points (Roux 1970 ; Xuereb 2009 ; Lacaze 2011).



**Figure II-3 : Uropode 3 de *G. fossarum* (A) et *G. pulex* (B).**

(Photos : Hervé Quéau - Guillaume Jubeaux / Cemagref Lyon)

La **Figure II-4** donne les critères permettant de différencier et d'identifier *G. fossarum* des autres espèces de *Gammaridae* communément rencontrées en France. Les espèces les plus couramment rencontrées sont *G. fossarum* et *G. pulex*. Cependant, de nombreuses espèces invasives ont colonisé les systèmes lotiques et lenticues de la France. Les principales sont : *G. roeseli* (présente depuis plus d'une centaine d'années, et parfois considérée comme autochtone), *G. duebeni*, *G. tigrinus* et *G. lacustris* (Adam 2008). Depuis quelques années une espèce d'un genre proche de *Gammarus*, *Dikerogammarus villosus*, envahit très rapidement la plupart des bassins d'Europe de l'ouest provoquant la disparition des espèces autochtones. Nous trouvons actuellement cette espèce sur le Rhône et la Saône (Bollache 2003). Une autre espèce proche de *G. fossarum* a également été décrite dans la région Rhône-Alpes (Goedmakers and Roux 1975) et n'est pas représentée sur la clé de détermination, il s'agit de *Gammarus wautieri*. Elle se différencie de *G. fossarum* à partir de l'observation du deuxième segment de l'antennule et plus particulièrement des soies présentes le long de ce segment. Chez *G. fossarum*, le nombre d'insertions de soies est supérieur ou égal à 6 et leur longueur est supérieure à la largeur du segment alors que chez *G. wautieri*, le nombre d'insertions de soies est inférieur à six et elles ont une longueur inférieure à la largeur du segment. La séparation de *G. fossarum* et *G. wautieri* en deux espèces distinctes est parfois encore remise en question mais a été confirmée par la comparaison de marqueurs moléculaires (séquences du cytochrome C) (Meyran et al. 1997).

Récemment, des études sur des marqueurs moléculaires ont également souligné qu'au sein de *G. fossarum*, il était possible de discriminer trois groupes susceptibles de constituer trois espèces cryptiques (Westram et al. 2011). Ces groupes ne sont pas différenciables par des critères morphologiques mais présentent une divergence phylogénétique suffisamment importante pour qu'il soit envisageable de considérer qu'il s'agit d'espèces différentes. Cependant, la définition du degré de divergence phylogénétique nécessaire pour conclure à des espèces différentes est encore largement discutée actuellement. Dans la région Rhône-Alpes, une seule de ces espèces cryptiques est rencontrée, ce qui nous permet de considérer que nous avons bien travaillé sur un seul groupe de gammare dans ce travail. Toutefois, la présence de ces espèces cryptiques est à considérer pour des études à plus large échelle géographique étant donné que les différents groupes peuvent présenter une variabilité importante au niveau des traits de vie ou du comportement.

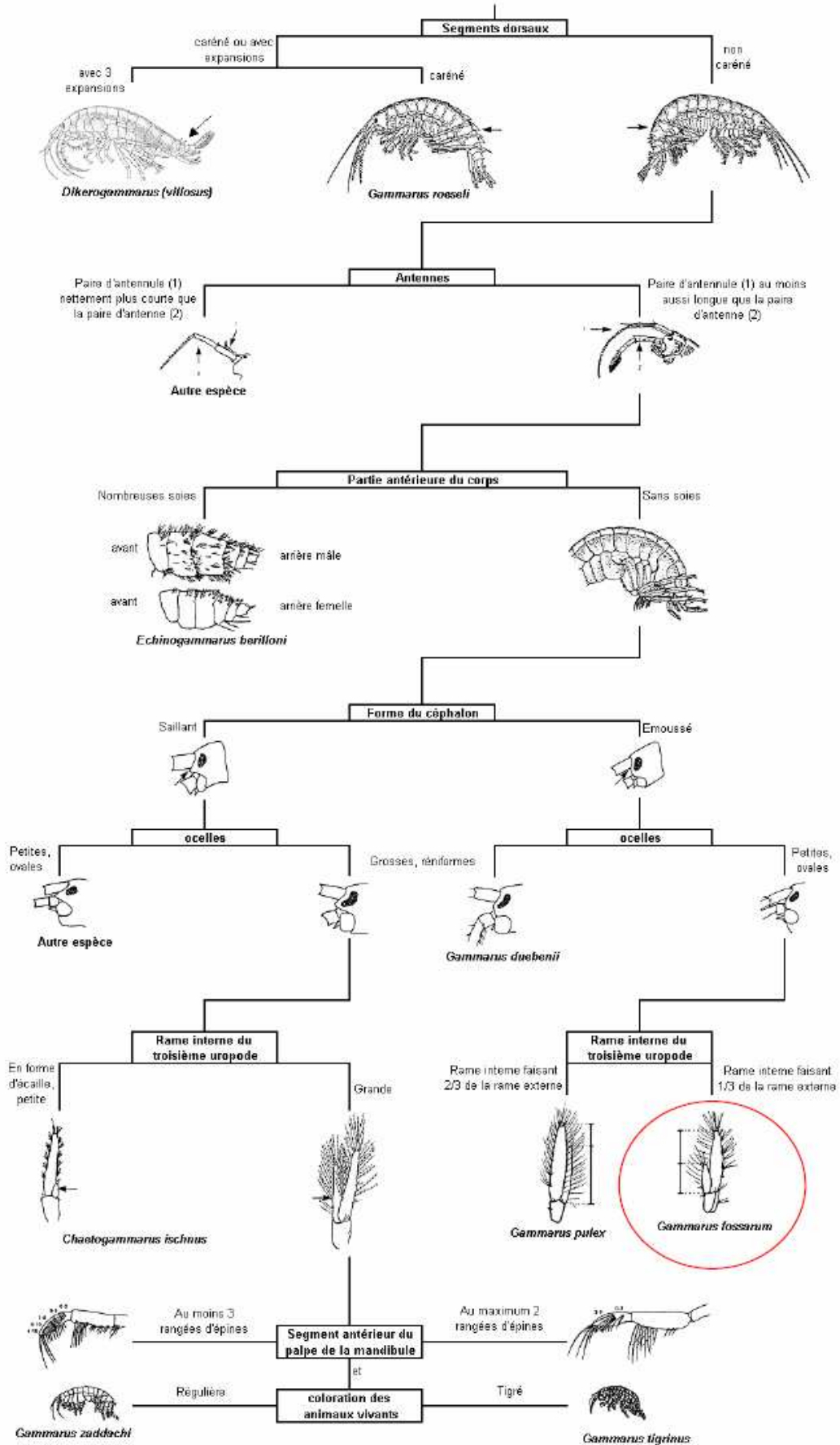
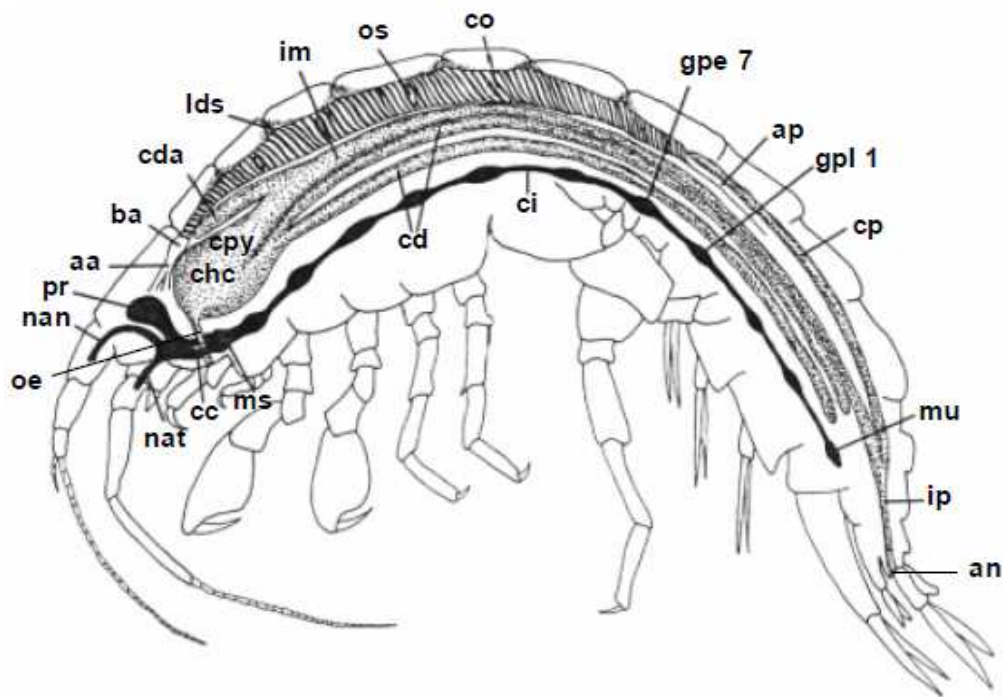


Figure II-4 : Clé de détermination de *G. fossarum* (Felten 2003).



1.1.4 Anatomie générale

La **Figure II-5** montre une coupe longitudinale d'un *Gammaridae*, permettant de situer les principaux organes. Bien que ne soient détaillés dans cette partie que l'appareil reproducteur et le fonctionnement de la reproduction en raison de l'importance de la reproduction pour la suite de ce travail, nous présentons quand même succinctement l'anatomie générale ainsi que le fonctionnement des principaux systèmes.



**Figure II-5 : Coupe latérale d'un *Gammaridae* présentant les principaux organes (Schmitz 1992).**  
**aa** : aorte antérieure ; **an** : anus ; **ap** : aorte postérieure ; **ba** : bulbe artériel ; **cc** : connexion circumoesophagiale ; **cd** : cæcum digestifs ; **cda** : cæcum dorsal antérieur ; **chc** : chambre cardiaque ; **ci** : connexion intersegmentaire ; **co** : coeur ; **cp** : cæcum postérieur ; **cpy** : chambre pylorique ; **gpe 7** : ganglion péronique 7 ; **gpl 1** : ganglion pléonique 1 ; **im** : intestin moyen ; **ip** : intestin postérieur ; **lds** : ligament dorsal suspendu ; **mu** : masse urosomique ; **ms** : masse suboesophagique ; **nan** : nerf antennulaire ; **nat** : nerf antennaire ; **oe** : oesophage ; **os** : oostégite ; **pr** : protocérèbrum.

**L'appareil digestif** est constitué d'un simple tube, presque entièrement rectiligne et cylindrique dans toute son étendue. Cependant, dans sa partie antérieure, il s'élargit pour former un sac ovoïde représentant l'estomac (**chc**, **cpy**). En avant de « l'estomac » se trouve l'oesophage s'ouvrant entre le labrum et le labium et formant la bouche. En arrière de « l'estomac » s'insère l'intestin moyen (**im**). L'intestin postérieur (**ip**) se termine par un orifice, ou anus (**an**), positionné

en dessous du telson. Les cæca s'insèrent en différents points de l'appareil digestif et constituent les principaux sites de production d'enzymes digestifs (Schmitz 1992 ; Felten 2003).

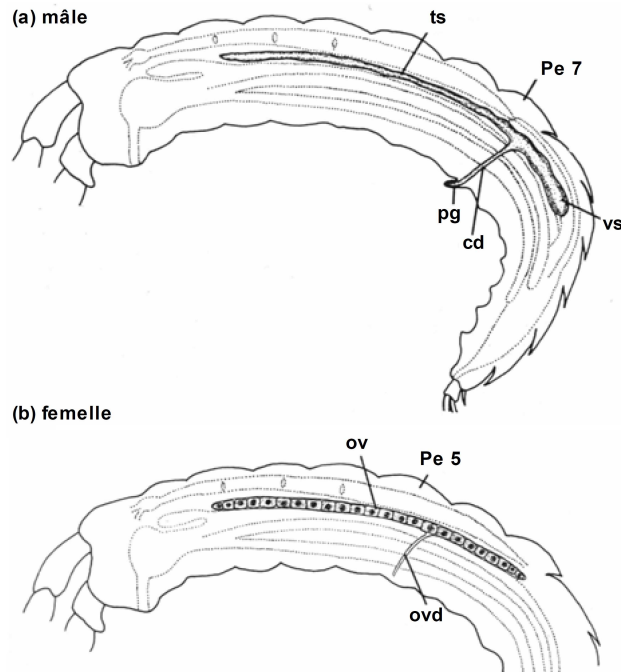
**Le système nerveux** comprend le cerveau, ou protocérébrum (**pr**), composé de deux grands lobes reliés par des nerfs aux ocelles, aux antennes (**nat**) et aux antennules (**nan**). Le protocérébrum est relié à une chaîne ganglionnaire située le long de la partie ventrale de l'intestin. Cette chaîne se compose d'une paire de ganglions soudés ensemble pour chacun des segments du mésosoma et métasoma. Dans le céphalon et l'urosoma, les ganglions sont réunis respectivement en une masse sub-oesophagique (**ms**) et une masse urosomique (**mu**). De ces ganglions et masses, reliées entre eux par des connexions nerveuses intersegmentaires (**ci**), partent des filets nerveux qui desservent chaque appendice (Felten 2003).

Concernant **l'appareil circulatoire**, la circulation sanguine, ou hémolympatique, s'effectue au moyen d'un coeur (**co**) mais peut aussi être affectée par des mouvements corporels, squeletto-musculaires ainsi que par des contractions stomacales. Le coeur, positionné dorsalement au dessus de l'appareil digestif, consiste en un tube cylindrique ouvert à ses deux extrémités. Il est entouré d'un « sac » rempli d'hémolymphe, nommé péricarde (ou encore hémocoèle), et s'étend sur presque toute la longueur du mésosoma.

## 1.1.5 Appareil reproducteur et reproduction

### 1.1.5.1 Appareil reproducteur

L'appareil génital mâle (**Figure II-6 a**) est constitué par une paire de tubes accolés à l'intestin et divisés en trois régions : les testicules (**ts**), la vésicule séminale (**vs**), et le canal déférent (**cd**). Ce dernier s'ouvre dans la partie ventrale du péréiomère 7 (**Pe 7**) et forme la papille génitale (**pg**, il en existe deux). Chez la femelle (**Figure II-6 b**), les ovaires (**ov**) occupent le même emplacement que les testicules chez les mâles et ont à peu près la même forme. Les oviductes (**ovd**) font suite aux ovaires et aboutissent sous les plaques coxales du péréiomère 5 (**Pe 5**). Les oeufs sont déposés dans le marsupium formé par les oostégites. C'est là que les oeufs achèvent leur développement et éclosent. Les caractères sexuels proprement dits sont assez difficilement identifiables (testicules, ovaires). Cependant nous distinguons facilement les femelles adultes par la présence des oostégites et les mâles par la présence de gnathopodes II plus robustes que chez les femelles et l'existence des papilles génitales (Chevreux and Fage 1970 ; Schmitz 1992). De plus les antennes, ayant un rôle dans la recherche des femelles, sont plus allongées chez les mâles (Steele 1995).



**Figure II-6 : Système reproducteur d'un *Gammaridae* mâle (a) et femelle (b) (Schmitz 1992).**

**cd** : canal déférent ; **ov** : ovaire ; **ovd** : oviducte ; **Pe 5 : 7** : périomère 5 : 7 ; **pg** : papille génitale ; **vs** : vésicule séminale ; **ts** : testicule.

### 1.1.5.2 Reproduction

Les gammares ont un cycle de reproduction relativement complexe. La reproduction est continue bien que fortement ralentie durant la période hivernale et atteint un maximum en avril - mai. La température optimum de fécondité pour *G. fossarum* est de 12,1°C (Pöckl and Humpesch 1990). Lorsque la femelle est prête à se reproduire, le mâle s'agrippe alors sur son dos au moyen de ses gnathopodes, et la maintient en place sous son corps. Le couple forme alors une figure appelée amplexus précopulatoire (ou precopula) (**Figure II-7**). Cette position permet au mâle de continuer à se déplacer et à se nourrir tout en maintenant la femelle sous son corps. Cette phase peut durer de quelques jours à une semaine (Bollache and Cezilly 2004).

L'ovulation, suivie immédiatement de la fécondation chez la femelle adulte, ne peut se produire qu'une fois la mue effectuée : l'expulsion des oeufs vers la poche ventrale de la femelle, aussi appelée poche marsupiale ou marsupium, est alors rendue possible par la présence d'un oviducte relativement flexible. Aussitôt l'exuvie de la femelle éjectée, le sperme est déposé *via* les

papilles génitales mâles dans la poche marsupiale de la femelle où la fécondation des ovocytes a lieu.



Figure II-7 : *Gammarus fossarum* mâle et femelle en précopula.

(Photo Hervé Quéau / Cemagref Lyon)

Chez la femelle *G. fossarum*, les cycles de mue et de reproduction ont été caractérisés précisément et sont fortement synchronisés, la femelle se reproduisant en même temps qu'elle mue (Geffard et al. 2010). Le cycle de mue dure environ 30 jours, à 12°C, chez la femelle adulte et se découpe en six stades successifs dont la détermination se base sur l'observation microscopique du développement de la nouvelle cuticule et du décollement de l'ancienne cuticule au niveau de la griffe des péréiopodes 3 et 4 (Figure II-8). Les deux premiers stades (*i.e.*, A et B) correspondent à la période de post-mue ; les deux suivants (*i.e.*, C1 et C2) à l'inter-mue et les deux derniers (*i.e.*, D1 et D2) à la pré-mue.

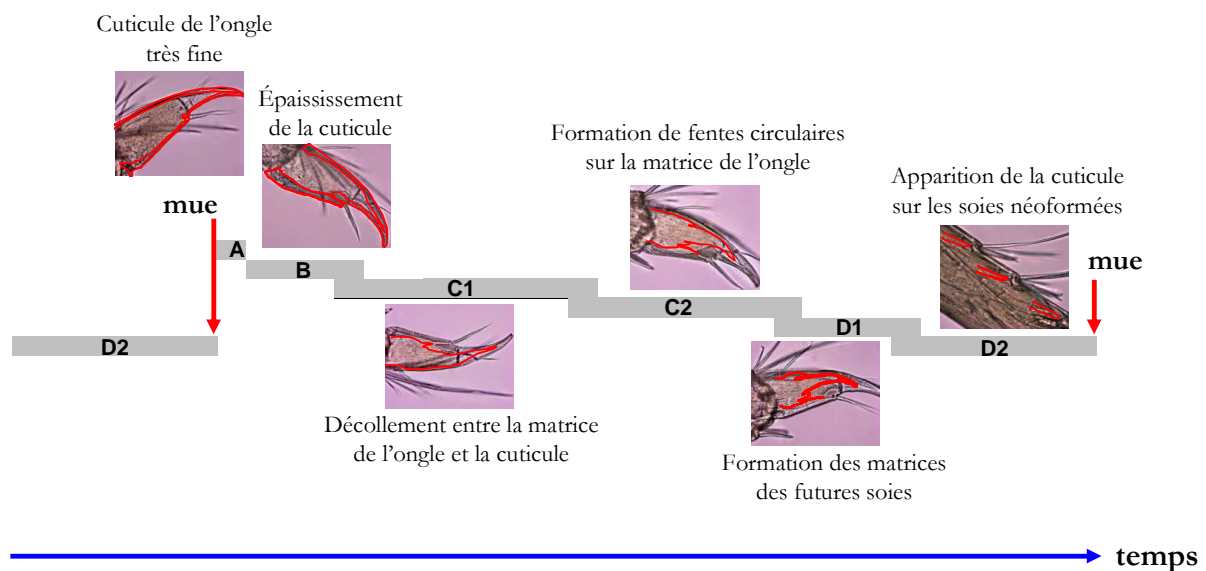


Figure II-8 : Caractérisation du cycle de mue chez la femelle *G. fossarum* (modifié d'après Geffard et al. 2010).

Chez les femelles sexuellement actives, la maturation des gonades (*i.e.*, vitellogenèse) et le développement des embryons dans le marsupium (*i.e.*, embryogenèse) se déroulent de manière parfaitement synchrone, à chaque cycle d'inter-mue. Les juvéniles éclos sortent du marsupium peu de temps avant l'exuviation de leur mère. Suite à cette exuviation, la femelle pond une nouvelle portée d'ovocytes matures qui seront aussitôt fécondés par un mâle. Parallèlement, dans la gonade, un nouveau lot d'ovocytes primaires entre en vitellogenèse. L'exuviation peut ainsi être considérée comme le point de départ et d'aboutissement de la maturation gonadique ainsi que du développement embryo-larvaire dans le marsupium (**Figure II-9**). Les mécanismes hormonaux qui contrôlent la reproduction des *gammaridae*, notamment le passage entre les différents stades, ont déjà été décrits (Hyne 2011) et ne seront pas détaillés dans ce manuscrit.

En fonction de la température de l'eau, la durée du cycle de mue est fortement variable ce qui va influencer la fréquence des épisodes de reproduction des femelles. La caractérisation de l'influence de la température sur le cycle de reproduction sera détaillée dans le **Chapitre III**.

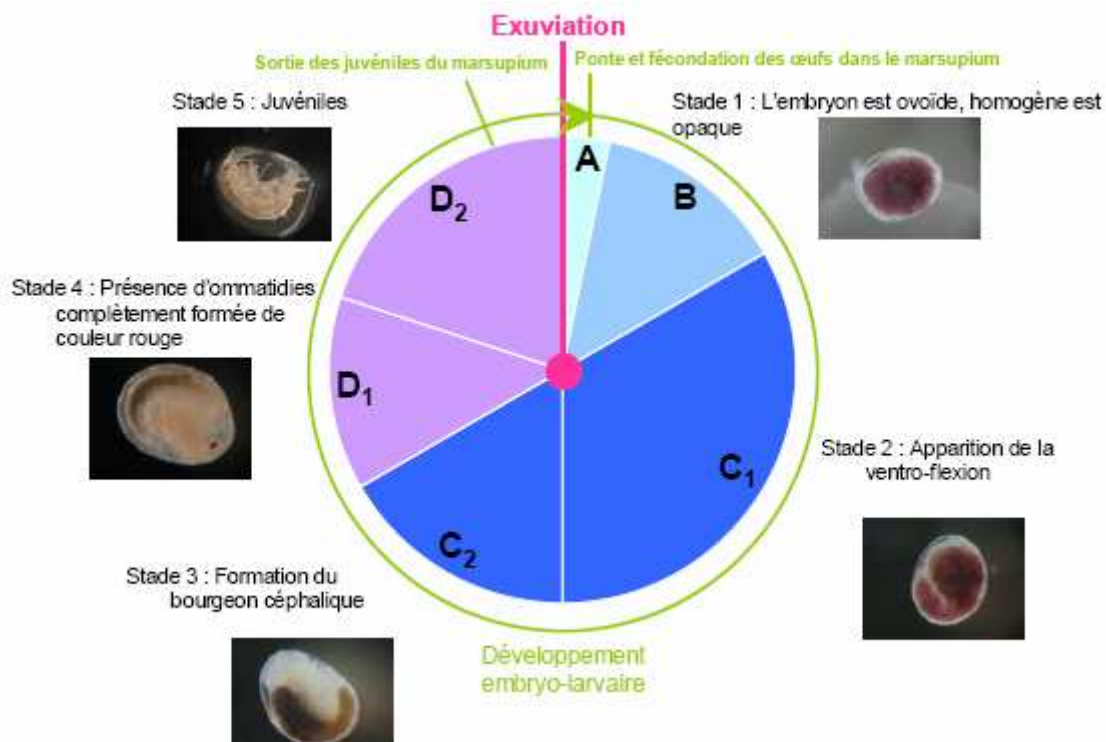


Figure II-9 : Stades embryonnaires et corrélation avec les stades de mues chez la femelle *G. fossarum* (Xuereb et al. 2009a).

### 1.1.6 Utilisation des gammares en écotoxicologie et pour l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques

Les gammares, en particulier *G. fossarum* et *G. pulex*, sont considérés comme de bons indicateurs de la santé des milieux aquatiques dulçaquicoles en raison de leur grande sensibilité à une large gamme de contaminants. Ainsi, von der Ohe and Liess (2004), dans une comparaison de la sensibilité d'un large panel d'invertébrés aquatiques, concluent que les gammares se situent parmi les espèces les plus sensibles lors de l'exposition à des contaminants métalliques ou organiques. De plus, ils présentent une bonne pertinence écologique de part leur rôle central au sein des écosystèmes que ce soit en tant que source de nourriture ou dans les flux de matière. Ils sont de ce fait largement utilisés pour l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques par de nombreux laboratoires d'écotoxicologie depuis le début des années 1990 (Rinderhagen et al. 2000). Ils présentent également l'avantage de pouvoir être utilisés aussi bien pour des expérimentations au laboratoire qu'*in situ* par des encagements, pour l'étude de la contamination de la colonne d'eau ou des sédiments (Kunz et al. 2010).

Le genre *Gammarus* est utilisé aussi bien pour le développement de marqueurs afin d'étudier l'impact des contaminants au niveau sub-individuel (biomarqueurs), au niveau individuel (*e.g.*, test alimentation, test de reprotoxicité, test croissance, tests comportementaux) ou pour des études au niveau populationnel (*e.g.*, modification des densités, structures en taille...).

De plus, les gammares offrent de nombreux avantages méthodologiques les validant comme de bonnes espèces sentinelles. Ils se retrouvent dans une multitude d'habitats marins, d'eaux saumâtres et d'eaux douces, et même dans les écosystèmes terrestres à fort taux d'humidité (*e.g.*, zones tidales, litières forestières) et présentent de larges aires de distribution ce qui rend possible la standardisation de méthodes sur une même espèce dans toute l'Europe. Les gammares sont généralement présents en fortes densités, tout au long de l'année et il est relativement aisé de les maintenir au laboratoire, de les identifier et de les manipuler. Ils offrent ainsi la possibilité de travailler aussi bien sur des individus autochtones qu'issus d'élevages ou stabulés au laboratoire.

Ainsi, le genre *Gammarus* est utilisé en tant que bioindicateur de la qualité du milieu avec par exemple, le ratio *Gammarus* / *Asellus* (Rinderhagen et al. 2000) a été proposé comme un bon indicateur de la qualité des milieux aquatiques.

De plus, les gammares sont utilisés en tant que bioaccumulateurs de certains contaminants notamment métalliques (Plénet 1999 ; Fialkowski et al. 2003 ; Lebrun et al. 2011) ou organiques (Ashauer et al. 2006b ; Ashauer et al. 2010).

Enfin, depuis les années 1990, les gammares ont été largement utilisés pour étudier les effets de divers contaminants à différentes échelles d'organisation biologique. Le **Tableau II-2** illustre de manière non exhaustive les différentes utilisations de *G. fossarum* et *G. pulex* en écotoxicologie, du niveau moléculaire au niveau populationnel.

Malgré ces nombreux avantages, aucun test standardisé n'a encore été validé chez les *Gammaridae*, notamment en raison de l'existence de tels tests chez d'autres espèces de crustacés (*e.g.*, tests standardisés chez les daphnies).

Tableau II-2 : Utilisation de *G. fossarum*, *G. pulex* et de quelques espèces proches en écotoxicologie aquatique.

Niveau d'organisation biologique	Paramètre biologique	Contaminant	Exposition	Espèce	Référence
Sub-individuel	AChE	Primiphos	Laboratoire / mésocosme	<i>G. pulex</i>	(Crane et al. 1999)
Sub-individuel	Vitellogénine	Contamination anthropique	<i>In situ</i>	<i>G. sp.</i>	(Gagné et al. 2005)
Sub-individuel	Histologie	Cadmium	Laboratoire	<i>G. fossarum</i>	(Issartel et al. 2010)
Sub-individuel	Stress oxydatif	Cuivre, Zinc	<i>In situ</i>	<i>G. pulex</i>	(Khan et al. 2011)
Sub-individuel	Génotoxicité	Cadmium, BaP, paraquat...	Laboratoire	<i>G. fossarum</i>	(Lacaze et al. 2010)
Sub-individuel	Génotoxicité	Rejet station d'épuration, Contamination métallique	<i>In situ</i>	<i>G. fossarum</i>	(Lacaze et al. 2011b)
Sub-individuel	Expression de protéines	PCB	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Leroy et al. 2010)
Sub-individuel	Expression de protéines	3-Benzylidène Camphor	Laboratoire	<i>G. fossarum</i>	(Scheil et al. 2008)
Sub-individuel	Expression de protéines	Bisphénol A	Laboratoire	<i>G. fossarum</i>	(Schirling et al. 2006)
Sub-individuel	Vitellogénine	Méthyl farnesoate	Laboratoire	<i>G. fossarum</i>	(Simon et al. 2010)
Sub-individuel	AChE	Parathion-methyl	Laboratoire	<i>G. tigrinus</i> , <i>G. fossarum</i>	(Kuhn and Streit 1994)
Sub-individuel	AChE	Chlorpyrifos	Laboratoire	<i>G. fossarum</i>	(Xuereb et al. 2007 ; Xuereb et al. 2009b)
Sub-individuel	Vitellogénine	Nonylphénol, Effluent de station d'épuration	Laboratoire, <i>In situ</i>	<i>G. fossarum</i>	(Xuereb et al. 2011)
Individuel	Reproduction	Lixiviat de décharge	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Bloor et al. 2005)



Niveau d'organisation biologique	Paramètre biologique	Contaminant	Exposition	Espèce	Référence
Individuel	Mortalité	Cypermethrine, Propiconazole, Tébuconazole	laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Adam et al. 2009)
Individuel	Taux d'alimentation	Cadmium	laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Alonso et al. 2009)
Individuel	Mortalité	Cadmium, Ivermectine	Laboratoire	<i>G. pulex</i> et <i>G. fossarum</i>	(Alonso et al. 2010)
Individuel	Respiration	Cadmium, Aluminium	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Aronsson and Ekelund 2005)
Individuel	Mortalité	Carbaryl	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Ashauer et al. 2007)
Individuel	Mortalité	Carbufofan, Malathion, dichlorophenol ... (12 composants)	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Ashauer et al. 2011)
Individuel	Mortalité	Thiacloprid	laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Beketov and Liess 2008a)
Individuel	Mortalité	Pesticides	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Beketov and Liess 2008b)
Individuel	Taux d'alimentation	Mecoprop (herbicide)	Laboratoire	<i>G. pseudolimnaeus</i>	(Bermingham et al. 1998)
Individuel	Croissance	Lindane	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Blockwell et al. 1996)
Individuel	Taux d'alimentation	Lindane	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Blockwell et al. 1998)
Individuel	Mortalité, Reproduction	Chlorobiphenyl	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Bloor and Banks 2006a)
Individuel	Taux d'alimentation	Rejets industriels	<i>In situ</i>	<i>G. pulex</i>	(Bloor and Banks 2006b)
Individuel	Mortalité	Sélénate de sodium	Laboratoire	<i>G. pseudolimnaeus</i>	(Brix et al. 2001)
Individuel	Osmorégulation	Cuivre	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Brooks and Mills 2003)
Individuel	Taux d'alimentation	Cadmium	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Brown and Pascoe 1989)

Niveau d'organisation biologique	Paramètre biologique	Contaminant	Exposition	Espèce	Référence
Individuel	Taux d'alimentation	Antibiotiques	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Bundschuh et al. 2009)
Individuel	Taux d'alimentation	Station d'épuration	Laboratoire	<i>G. fossarum</i>	(Bundschuh et al. 2011b)
Individuel	Mortalité	Thiodan	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Cengiz and Unlu 1999)
Individuel	Mortalité	Cadmium	Laboratoire	<i>G. fossarum</i>	(Chaumot et al. 2009)
Individuel	Reproduction	Esfenvarelate	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Cold and Forbes 2004)
Individuel	Taux d'alimentation	Rejets agricoles	<i>In situ</i>	<i>G. pulex</i>	(Crane et al. 1995)
Individuel	Taux d'alimentation	Acidification	<i>In situ</i>	<i>G. fossarum</i>	(Dangles and Guerold 2001)
Individuel	Locomotion	Composés pharmaceutiques	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(De Lange et al. 2006)
Individuel	Taux d'alimentation	Zinc, Plomb	<i>In situ</i>	<i>G. fossarum</i>	(Dedourge-Geffard et al. 2009)
Individuel	Respiration	Stress acide	Laboratoire	<i>G. fossarum</i>	(Felten and Guerold 2001)
Individuel	Survie, Taux d'alimentation, Locomotion, Respiration	Cadmium	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Felten et al. 2008a)
Individuel	Taux d'alimentation	Rejet d'autoroute	<i>In situ</i>	<i>G. pulex</i>	(Forrow and Maltby 2000)
Individuel	Reproduction	Cadmium, methomyl, nonylphénol	Laboratoire	<i>G. fossarum</i>	(Geffard et al. 2010)
Individuel	Locomotion, Respiration	Cuivre, Effluents industriels	<i>In situ</i>	<i>G. pulex</i>	(Gerhardt 1996 ; Gerhardt et al. 1998)
Individuel	Reproduction	Effluent de station d'épuration	<i>In situ</i>	<i>G. pulex</i>	(Gross et al. 2001)
Individuel	Taux d'alimentation	Nonylphénol	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Gross-Sorokin et al. 2003)

Niveau d'organisation biologique	Paramètre biologique	Contaminant	Exposition	Espèce	Référence
Individuel	Taux d'alimentation	Lindane	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Malbouisson et al. 1995)
Individuel	Taux d'alimentation	Fer, manganèse	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Maltby and Crane 1994)
Individuel	Taux d'alimentation	Effluents métalliques	<i>In situ</i>	<i>G. pulex</i>	(Maltby and Crane 1994)
Individuel	Taux d'alimentation	Zinc, ammonium	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Maltby and Naylor 1990)
Individuel	Taux d'alimentation	Etude à large échelle	<i>In situ</i>	<i>G. pulex</i>	(Maltby et al. 2002)
Individuel	Taux d'alimentation	Carburofan	<i>In situ</i>	<i>G. pulex</i>	(Matthiessen et al. 1995)
Individuel	Taux d'alimentation	Zinc, Lindane...	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(McLoughlin et al. 2000)
Individuel	Locomotion	Pyréthroides	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Nørum et al. 2010)
Individuel	Reproduction	Ammonium	Laboratoire	<i>G. sp.</i>	(Prenter et al. 2004)
Individuel	Reproduction	Effluent de station d'épuration	<i>In situ</i>	<i>G. fossarum</i>	(Schirling et al. 2005)
Individuel	Osmorégulation	Cadmium	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Spicer et al. 1998)
Individuel	Mortalité ; Croissance	Nitrate	Laboratoire	<i>G. pseudolimnaeus</i>	(Stelzer and Joachim 2009)
Individuel	Taux d'alimentation	Cuivre	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Taylor et al. 1993)
Individuel	Croissance	3,4 dichloroaniline	Mésocosme	<i>G. pulex</i>	(Taylor et al. 1994)
Individuel	Reproduction, Mortalité	Bisphenol A, Ethinylestradiol	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Watts et al. 2001)
Individuel	Taux d'alimentation	Zinc	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Wilding and Maltby 2006)
Individuel	Taux d'alimentation, Locomotion	Chlorpyrifos, Methomyl	Laboratoire	<i>G. fossarum</i>	(Xuereb et al. 2009b)
Individuel	Taux d'alimentation	Tébuconazole	Laboratoire	<i>G. fossarum</i>	(Zubrod et al. 2010)
Populationnel	Densités	Contamination agricole	Microcosme	<i>G. pulex</i>	(Liess and Schulz 1999)

Niveau d'organisation biologique	Paramètre biologique	Contaminant	Exposition	Espèce	Référence
Populationnel	Densité de population, nombre de femelles en reproduction	Station d'épuration	Microcosme	<i>G. fossarum</i>	(Bundschuh and Schulz 2011)
Populationnel	Occurrence de l'intersexualité	Effluent de station d'épuration	<i>In situ</i>	<i>G. fossarum</i>	(Ladewig et al. 2006)
Populationnel	Densités	Cuivre	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Maund et al. 1992)
Populationnel	Densité	Rejets agricoles	<i>In situ</i>	<i>G. pulex</i>	(Schulz and Liess 1999)
Populationnel	Densité, sex-ratio	Ethinylestradiol	Laboratoire	<i>G. pulex</i>	(Watts et al. 2002)

1.2 *Potamopyrgus antipodarum*

## 1.2.1 Classification

L'autre espèce choisie pour ce travail est *Potamopyrgus antipodarum* (Gray, 1843) (**Figure II-10**). Dans des études anciennes, nous retrouvons aussi cette espèce sous le nom de *Potamopyrgus jenkinsi* (Dorgelo and Hengst 1986 ; Dorgelo 1987). Jusqu'au milieu des années 1990, *P. antipodarum* faisait partie de la sous-classe des Prosobranches. Cependant, des études moléculaires ont conduit à modifier la phylogénie des gastéropodes (Ponder and Lindberg 1997). A l'heure actuelle, la phylogénie des Gastropodes est encore en pleine évolution et des modifications sont régulièrement observées. La systématique détaillée de *P. antipodarum* selon Ponder and Lindberg (1997) est synthétisée dans le **Tableau II-3**.



**Figure II-10 : Vue générale de *P. antipodarum*.**

(Photo Hervé Quéau / Cemagref Lyon)

**Tableau II-3 : Classification de *P. antipodarum* (Ponder and Lindberg 1997; Gust 2010).**

Embranchement	Mollusque
Classe	Gastéropode
Sous-classe	Caenogastropoda
Ordre	Littorinimorpha
Super-famille	Rissooidea
Famille	Hydrobiidae
Genre	<i>Potamopyrgus</i>
espèce	<i>antipodarum</i> (Gray, 1843)

### 1.2.2 Ecologie et biologie

Originnaire de Nouvelle-Zélande, *P. antipodarum* est une espèce invasive (Alonso and Castro-Díez 2008) qui a colonisé l'Europe (Winterbourn 1970 ; Roth 1987), l'Australie (Ponder 1988) ou encore l'Amérique du Nord (Jacobsen and Forbes 1997 ; Zaranko et al. 1997 ; Gangloff 1998) et qui est présente maintenant sur une grande partie du globe. Des études génétiques (Städler et al. 2005) ont démontré que les populations européennes provenaient bien de Nouvelle-Zélande. Une fois introduites, les populations connaissent généralement un accroissement rapide et colonisent très vite les rivières et plans d'eau avoisinants (Ponder 1988).

*P. antipodarum* est un macroinvertébré benthique qui se retrouve généralement dans divers habitats tels que les fonds vaseux, les substrats sableux ou pierreux ou encore dans la végétation aquatique (Michaut 1968). Des études ont montré que l'on retrouve généralement environ 70% des individus dans la vase et 30% sur les végétaux (Heywood and Edwards 1962) bien que ces proportions puissent fortement varier entre les populations et au cours de l'année. *P. antipodarum* a été retrouvé dans les rivières de plaine, les ruisseaux rocheux, les criques, les fossés, les estuaires, les lacs ou les étangs. Cependant, *P. antipodarum* n'est pas capable de coloniser des masses d'eau temporaires par manque de forme de résistance pour survivre pendant la saison sèche (Winterbourn 1970). Il est généralement enfoui dans la couche superficielle du sédiment (Michaut 1968 ; Dorgelo 1987). Les densités de population peuvent être très importantes, jusqu'à plusieurs centaines de milliers d'individus au mètre carré (Mouthon 1982 ; Schreiber et al. 1998 ; Kerans et al. 2005). Il semblerait que la présence de végétation favorise des densités plus importantes (Schreiber et al. 1998).

*P. antipodarum* peut tolérer des conditions environnementales très variées ce qui permet d'envisager des études écotoxicologiques sur le terrain à large échelle spatiale. Il peut ainsi s'adapter à une salinité de 12 à 32 ‰ (Winterbourn 1970 ; Mouthon 1982) mais une augmentation de la mortalité est cependant observée avec l'augmentation de la salinité contrairement à beaucoup d'autres espèces de la même famille (Hylleberg and Siegismund 1987). Il s'adapte également à une large gamme de température (Roth 1987 ; Dorgelo 1988). La température critique létale est située entre 28 et 32,4 °C pour les températures chaudes. Par contre, il supporte très mal les très basses températures comparativement aux autres *Hydrobiidae*. Il peut aussi bien vivre dans des eaux anthropisées que non polluées (Dorgelo 1988). Certains auteurs le considère même très tolérant aux contaminations biodégradables (Mouthon and Dubois 2001).

*P. antipodarum* est rhéotactique positivement, c'est-à-dire qu'il se déplace généralement diagonalement dans le sens du courant (Haynes et al. 1985). C'est un mollusque très actif pouvant se déplacer à une vitesse de 3 cm.minute<sup>-1</sup>. Il est la proie de nombreuses espèces de poissons (truite, brème, gardon) et certains oiseaux aquatiques plongeurs (Mouthon 1982 ; Dorgelo 1987). Il se disperse généralement par l'intermédiaire de ses prédateurs ou par dérive (Mouthon 1982). Il est particulièrement adapté à la dispersion passive par les oiseaux (Zaranko et al. 1997). Il survie également relativement bien au passage dans le tube digestif des poissons (Haynes et al. 1985).

*P. antipodarum* est une espèce itéropare (Calow 1978), sa reproduction ayant lieu plusieurs fois dans l'année tout en étant sous l'étroite dépendance des facteurs environnementaux comme la photopériode ou la température (Sternberg et al. 2010). Il s'agit d'une espèce ovovivipare et parthénogénétique (Robson 1926). Cette dernière caractéristique est essentielle dans le caractère invasif de l'espèce. En effet, dans les zones où *P. antipodarum* est invasif, les populations sont constituées quasi exclusivement de femelles (Ponder 1988 ; Schreiber et al. 1998 ; Gerard and Dussart 2003) et la reproduction parthénogénétique semble être le mode extrêmement majoritaire. En Nouvelle-Zélande, sa zone d'origine, nous retrouvons des mâles, et la reproduction peut également se faire par voie sexuée. Il semble que la persistance de mâles soit due à la coévolution entre *P. antipodarum* et ses parasites trématodes (Schreiber et al. 1998). Les milieux où l'on retrouve le plus de lignées sexuées sont également ceux où les lignées les plus anciennes sont absentes. Il est possible que des conditions environnementales particulières favorisent cette situation (Neiman et al. 2005). La ponte est continue mais la reproduction peut quand même être considérée comme saisonnière, la fécondité des femelles étant décrite comme maximale au printemps et très faible voire nulle en hiver (Schreiber et al. 1998). Les mécanismes hormonaux qui contrôlent la reproduction des mollusques sont encore relativement méconnus par rapport aux autres espèces d'invertébrés, en particulier en ce qui concerne les mollusques anciennement appelés « prosobranches » tels que *P. antipodarum* (Gust 2010,) et ne seront pas détaillés dans ce manuscrit. Une synthèse des connaissances relatives à la régulation hormonale de la reproduction de *P. antipodarum* est disponible dans les travaux de Gust (Gust 2010).

Concernant la croissance, elle est là encore sous l'influence forte des facteurs environnementaux. La qualité de la nourriture est également très importante pour la croissance (Dorgelo et al. 1995). *P. antipodarum* présente un régime alimentaire assez large. Il est principalement détritivore, mais également végétarien (algues et débris de macrophytes) (Mouthon 1982). Il se nourrit de fins dépôts organiques et affectionne les diatomées (Dorgelo and Leonards 2001).

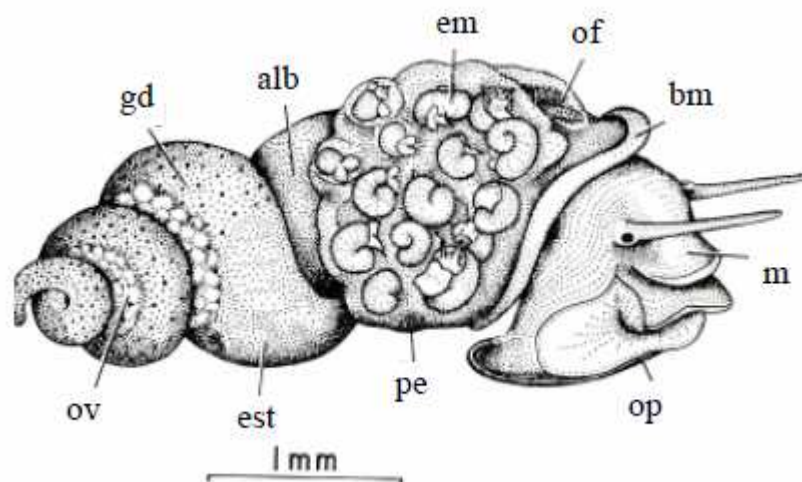
### 1.2.3 Morphologie et anatomie générale

#### 1.2.3.1 Morphologie

*P. antipodarum* est facilement identifiable par sa coquille dextrale, fine et solide (Zaranko et al. 1997). Elle est conique, de couleur brun - jaune (**Figure II-10**), formée de tours convexes ou arrondis (Michaut 1968). L'ouverture est elliptique et large, avec une marge concave et collumnaire. Elle mesure de 0,5 à 12 mm de longueur maximale et comporte jusqu'à huit tours chez les individus de grande taille. Il semble y avoir une importante variabilité de taille entre populations (OECD 2010). La coquille possède chez les adultes des ornements divers principalement lisses ou carénés qui pourraient avoir un rapport avec la composition du milieu (Michaut 1968). Chez les juvéniles, la coquille est semi transparente et ne possède aucune ornementation.

#### 1.2.3.2 Anatomie

La **Figure II-11** montre l'anatomie générale d'une femelle *P. antipodarum*. Bien que ne soit détaillé dans cette partie que l'appareil reproducteur, l'anatomie générale d'une femelle est présentée sur le schéma ci-dessous. Etant donné l'absence de mâle dans les populations d'Europe, nous n'insisterons pas sur leur anatomie.



**Figure II-11 : Anatomie d'une femelle *P. antipodarum* (modifié d'après Fretter and Graham 1994).**

**alb** : glande à albumen ; **bm** : bord du manteau ; **em** : embryons ; **est** : estomac ; **gd** : glande digestive ;  
**m** : museau ; **op** : opercule ; **ov** : ovaire ; **pe** : poche embryonnaire.



Concernant l'appareil génital femelle, l'ovaire (**ov**) est situé du côté collumnaire de la glande digestive (**gd**), dans les spires apicales de la coquille. Il est blanc et contraste avec l'appareil digestif qui est lui marron. L'oviducte est étroit mais s'élargit vers la bourse copulatrice et le *receptaculum seminis* (Gust 2010). La partie inférieure de l'oviducte forme une poche embryonnaire. Dans la partie antérieure, nous trouvons le canal spermatique. La glande à albumen (**alb**) et la glande à mucus entourent la partie postérieure de la poche embryonnaire (Winterbourn 1970). La poche embryonnaire contient les embryons en développement. On en distingue deux types selon leur degré de maturité : les embryons nouvellement formés, sans coquille et les embryons coquillés qui vont être expulsés de la poche sous peu.

#### 1.2.4 Utilisation en écotoxicologie et pour l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques

Les mollusques sont généralement considérés comme relativement peu sensibles aux contaminations de faible intensité mais lorsque la contamination augmente, ils peuvent se montrer plus sensibles que certains arthropodes tels que les éphéméroptères ou les trichoptères (Gust 2010). Parmi les mollusques, les « prosobranches » dont fait partie *P. antipodarum* sont considérés comme les plus sensibles aux contaminants (Mouthon 1982), en particulier en ce qui concerne les juvéniles (Watton and Hawkes 1984a).

*P. antipodarum* présente plusieurs avantages méthodologiques. Il peut être utilisé aussi bien pour des expérimentations au laboratoire qu'*in situ* par des encagements (Schmitt et al. 2010). Il est généralement présent en fortes densités une bonne partie de l'année, et il est relativement aisé de l'identifier, de le manipuler et de le maintenir au laboratoire.

Le caractère invasif de cette espèce la rend également intéressante d'un point de vue écologique, en particulier comme point de comparaison avec des espèces autochtones. En effet, certaines études montrent que *P. antipodarum* se révèle plus sensible que des espèces autochtones, ce qui pourrait constituer un facteur limitant à son caractère invasif (Gerard and Poullain 2005).

Jusqu'à présent, la plupart des tests réalisés avec *P. antipodarum* ont été faits dans des conditions de laboratoire. Ainsi, *P. antipodarum* a récemment été proposé à l'OCDE comme une espèce pertinente pour tester l'impact des perturbateurs endocriniens (Matthiessen 2008 ; OECD 2010). Les travaux *in situ* sont beaucoup plus rares. En effet, malgré une première utilisation

précoce de *P. antipodarum in situ* (Brown 1980), peu d'études ont été menées sur le terrain. Récemment, plusieurs études ont vu le jour, notamment pour évaluer les effets de diverses sources de contaminations sur la fécondité (Gust et al. 2010a ; Schmitt et al. 2010 ; Gust et al. 2011b), et comparer avec des populations locales (Lance et al. 2010). Le **Tableau II-4** illustre de manière non exhaustive les différentes utilisations de *P. antipodarum* en écotoxicologie.

Tableau II-4 : Utilisation de *P. antipodarum* en écotoxicologie aquatique.

Niveau d'organisation biologique	Paramètre biologique	Contaminant	Exposition	Référence
Sub-individuel	AChE	Chlorpyrifos	Laboratoire	(Gagnaire et al. 2008)
Sub-individuel	Histologie, Vitellogénine	Bisphenol A, Octylphenol, Tributyltin chloride	Laboratoire	(Gagnaire et al. 2009)
Sub-individuel	Expression de protéines	Benzo(a)pyrène	Laboratoire	(Gagnaire et al. 2010)
Sub-individuel	Stéroïdes	Effluents de station d'épuration	<i>In situ</i>	(Gust et al. 2010a)
Individuel	Mortalité	Ion fluorure	Laboratoire	(Aguirre-Sierra et al. 2011)
Individuel	Mortalité	Ammonium, Nitrite, Nitrate	Laboratoire	(Alonso and Camargo 2003)
Individuel	Locomotion	Ammonium	Laboratoire	(Alonso and Camargo 2009)
Individuel	Mortalité, Locomotion	Ion fluorure	Laboratoire	(Alonso and Camargo 2011a)
Individuel	Mortalité, Reproduction, Locomotion	Ion fluorure	Laboratoire	(Alonso and Camargo 2011b)
Individuel	Mortalité	Cuivre, Zinc	<i>In situ</i>	(Brown 1980)
Individuel	Reproduction, Croissance	Cuivre, Zinc, Cadmium	Laboratoire	(Dorgelo et al. 1995)
Individuel	Reproduction	Triphenyltin, Tributyltin	Laboratoire	(Duft et al. 2003a)
Individuel	Reproduction	Bisphenol A, Octylphenol, Nonylphénol	Laboratoire	(Duft et al. 2003b)
Individuel	Croissance	Cadmium	Laboratoire	(Forbes et al. 1995)
Individuel	Reproduction	Bisphenol A, Octylphenol, Tributyltin chloride	Laboratoire	(Gagnaire et al. 2009)

Niveau d'organisation biologique	Paramètre biologique	Contaminant	Exposition	Référence
Individuel	Reproduction, Croissance, Survie, Locomotion	Atrazine, Toxine de cyanobactérie	Laboratoire	(Gerard and Poullain 2005)
Individuel	Evitement	Arsenic	Laboratoire	(Golding et al. 1997)
Individuel	Reproduction	Fluoxétine	Laboratoire	(Gust et al. 2009 ; Gust et al. 2011a)
Individuel	Reproduction, Mortalité	Effluents de station d'épuration	<i>In situ</i>	(Gust et al. 2010a)
Individuel	Reproduction	Fadrozole	Laboratoire	(Gust et al. 2010b)
Individuel	Reproduction, Croissance, Mortalité	Contamination métallique	<i>In situ</i>	(Gust et al. 2011b)
Individuel	Reproduction, Croissance, Taux d'alimentation	Cadmium	Laboratoire	(Jensen et al. 2001)
Individuel	Reproduction, Croissance	17 $\alpha$ -Ethinylestradiol, DMSO, BPA, octylphenol	Laboratoire	(Jobling et al. 2004)
Individuel	Croissance	Microcystines de cyanobactéries	Laboratoire	(Lance et al. 2008)
Individuel	Reproduction	Contaminants organiques de sédiments de lacs.	Laboratoire	(Mazurová et al. 2008)
Individuel	Mortalité, Reproduction	Cadmium	Laboratoire	(Møller et al. 1996)
Individuel	Reproduction	Fluoxétine	Laboratoire	(Nentwig 2007)
Individuel	Reproduction	Carbamazépine	Laboratoire	(Oetken et al. 2005)

Niveau d'organisation biologique	Paramètre biologique	Contaminant	Exposition	Référence
Individuel	Mortalité, Digestion	Sodium Chloride, Tricaine Methanesulfonate,	Laboratoire	(Oplinger et al. 2009)
Individuel	Reproduction, Croissance	HHCB	Laboratoire	(Pedersen et al. 2009)
Individuel	Reproduction	« Crème solaire »	Laboratoire	(Schmitt et al. 2008)
Individuel	Reproduction, Mortalité	Métaux	<i>In situ</i>	(Schmitt et al. 2010)
Individuel	Reproduction	Sédiments contaminés	Laboratoire	(Schmitt et al. 2011a ; Schmitt et al. 2011b)
Individuel	Reproduction	Bisphenol A, Cadmium	Laboratoire	(Sieratowicz et al. 2011)
Individuel	Reproduction	Sédiments contaminés	Laboratoire	(Tuikka et al. 2011)
Individuel	Evitement, Survie	Cuivre, Ammonium	Laboratoire	(Watton and Hawkes 1984a)
Populationnel	Densités	Effluents station d'épuration	Canaux	(Watton and Hawkes 1984b)

### Synthèse :

Choix des deux espèces : *G. fossarum* et *P. antipodarum*

Pour ce travail doctoral, nous avons choisi d'utiliser deux espèces d'invertébrés aquatiques : le crustacé amphipode *G. fossarum* et le mollusque gastéropode *P. antipodarum*.

Ces deux espèces se caractérisent par :

- **des caractéristiques écologiques très différentes** : *Gammarus fossarum* qui est une espèce autochtone de l'amont des cours d'eau rapides **vs** *Potamopyrgus antipodarum* qui est une espèce invasive de l'aval des cours d'eau lents.
- **des caractéristiques biologiques très différentes** : *Gammarus fossarum* qui a un mode de reproduction sexuée **vs** *Potamopyrgus antipodarum* qui est une espèce parthénogénétique
- **des caractéristiques phylogénétiques contrastées** : un crustacé amphipode **vs** un mollusque gastéropode

#### ————→ 2 espèces aux caractéristiques très contrastées

Ces deux espèces sont couramment utilisées en écotoxicologie car :

- elles sont abondamment présentes dans les cours d'eau européens
- elles sont sensibles à une grande gamme de contaminants
- elles ont des cycles de vie assez courts et sont faciles à maintenir au laboratoire
- elles sont faciles à prélever, à identifier, à maintenir au laboratoire et à manipuler dans le cadre d'expérimentations au laboratoire et sur le terrain.

## 2 Biotests individuels chez *G. fossarum*

Dans le cadre du développement de biotests individuels avec *G. fossarum*, nous nous sommes intéressés durant ce travail de thèse à caractériser l'influence de différents facteurs de confusion sur trois bioessais basés sur la mesure de traits de vie et utilisés notamment par le laboratoire d'écotoxicologie de l'IRSTEA de Lyon : la mesure du taux d'alimentation, du taux de croissance et de la reproduction. Depuis plusieurs années, ces marqueurs sont mesurés, lors d'encagements sur le terrain, pour le diagnostic de la qualité des milieux aquatiques. Nous nous sommes attachés à montrer comment la prise en compte de ces facteurs de confusion permet d'améliorer l'interprétation des réponses obtenues lors des tests *in situ*.

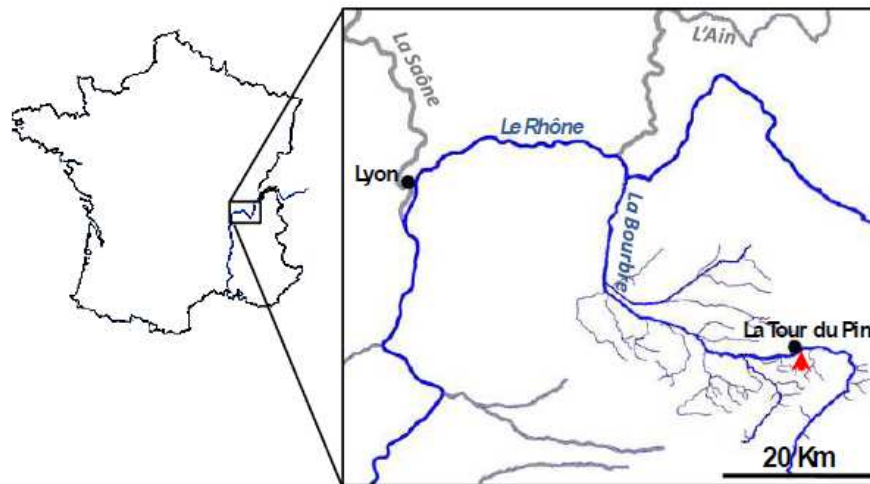
Concernant les facteurs de confusion biotiques (*e.g.*, variabilité entre population, parasitisme, sexe), nous avons choisi de nous affranchir de l'influence de ces facteurs en transplantant des organismes calibrés issus d'une même population d'origine (la Bourbre au niveau de La Tour du Pin, *cf.* paragraphe 2.1), de même sexe, non parasités. Durant ce travail, nous nous sommes focalisés sur l'influence de la taille afin de déterminer le degré de précision à apporter lors de la calibration des organismes. Ce type d'approche, en utilisant des organismes calibrés pour les expérimentations, se révèle particulièrement intéressant pour diagnostiquer la toxicité de l'eau dans un site. En revanche, il ne cherche pas à fournir une évaluation précise des impacts sur les communautés en place, dans lesquelles de nombreux facteurs supplémentaires sont à prendre en compte tels que les mécanismes d'adaptations locales des organismes par exemple.

Concernant les facteurs de confusion abiotiques, ils ne peuvent pas être contrôlés lors d'expérimentation sur le terrain et il est donc nécessaire de caractériser leur influence. Nous nous sommes intéressés à l'influence de la température et de la conductivité qui sont décrits comme étant deux des principaux facteurs de confusion abiotiques. Le choix de ces facteurs est détaillé dans le **Chapitre III**.

Dans ce chapitre, nous présenterons en détail 1- les protocoles de prélèvement et de maintien des organismes au laboratoire, 2- les protocoles pour les expérimentations au laboratoire et 3- les protocoles pour les expérimentations *in situ*. Les résultats des expérimentations et leur discussion seront présentés dans le **Chapitre III**.

## 2.1 Prélèvement et maintien des organismes au laboratoire

L'élevage des gammares étant relativement complexe à réaliser (Kunz et al. 2010), dans le but d'obtenir des quantités conséquentes d'organismes, le choix a été fait de travailler avec des organismes prélevés sur un site de référence très peu contaminé puis acclimatés au laboratoire. Le site de prélèvement est situé à l'amont de la Bourbre au niveau de La Tour du Pin (longitude :  $05^{\circ}27'34''\text{E}$ , latitude :  $45^{\circ}27'34''\text{N}$ , Isère, France), un affluent du Rhône (**Figure II-12**). Ce site a été retenu car il héberge une population de gammares présentant de fortes densités (Xuereb 2009 ; Lacaze 2011), exclusivement composée de *G. fossarum*. La hauteur d'eau et le débit de la Bourbre permettent un échantillonnage toute l'année.



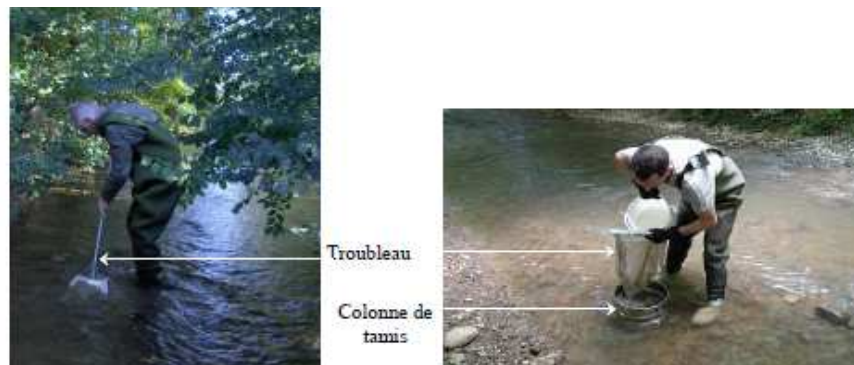
**Figure II-12** : Localisation géographique du site de prélèvement de *G. fossarum* sur la Bourbre.

### 2.1.1 Technique de prélèvement des organismes

La technique de prélèvement consiste à remuer le fond de la rivière avec le pied pour provoquer la fuite des organismes qui dérivent alors dans le courant et sont récupérés avec un troubleau (taille 25 x 18 cm, maille 630  $\mu\text{m}$ ) (**Figure II-13**) placé légèrement à l'aval. Un premier tri rapide permet de relâcher les organismes des autres espèces (larves d'odonates, de coléoptères, trichoptères). Ensuite, les organismes sont déposés sur une colonne de tamis (**Figure II-13**) de maille comprise entre 375  $\mu\text{m}$  et 2,5 mm. Pour récupérer des adultes de taille homogène, seuls les organismes retenus entre les tamis de 2 et 2,5 mm sont conservés. Pour les juvéniles, nous conservons les organismes retenus entre les tamis 375  $\mu\text{m}$  et 1,25 mm. Une fois tamisé, les



organismes sont placés dans des seaux en polyéthylène remplis d'eau de la rivière et conservés dans des glacières le temps du retour au laboratoire.

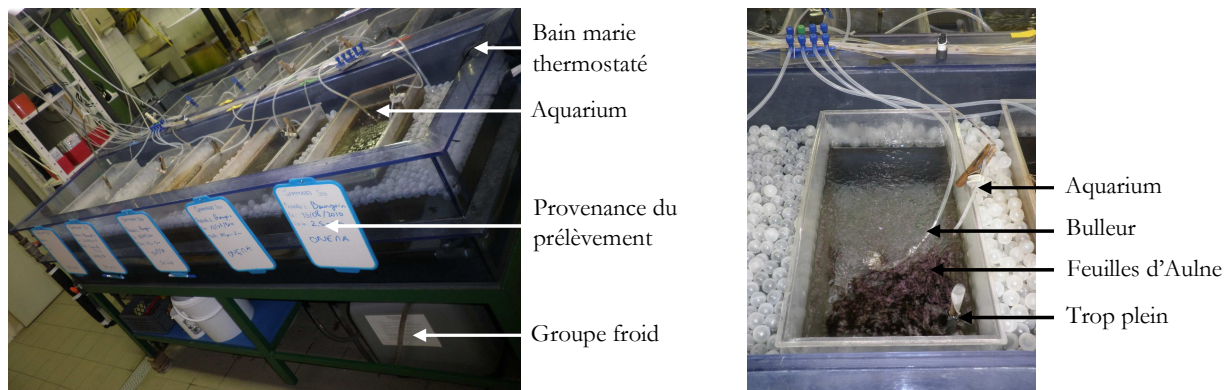


**Figure II-13 : Prélèvement des organismes au troubleau et tri sur la colonne de tamis.**

(Photos Emilie Lacaze / Cemagref Lyon)

### 2.1.2 Stabulation au laboratoire

Une fois arrivés au laboratoire, les organismes sont à nouveau triés afin d'enlever la matière organique, le gravier ainsi que les organismes non désirés (sangues, annélides, *etc.*). Ils sont alors répartis dans des aquariums de 30 L placés dans un bain marie thermorégulé à  $12 \pm 1^\circ\text{C}$  contenant l'eau du site de prélèvement. Cette température de  $12^\circ\text{C}$  a été choisie car elle permet de ne pas faire subir un choc thermique trop important aux individus par rapport à la température du site de prélèvement et représente la température décrite comme optimale pour de nombreux processus biologique chez les *gammaridae* (Pöckl and Humpesch 1990 ; Pöckl 1995). Cette eau est alors remplacée par un système de goutte à goutte par un mélange d'eau issue d'un forage et d'eau osmosée. Cette eau a un pH compris entre 7,4 et 7,8 et une conductivité de  $600 \pm 50 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  correspondant à celle de la rivière. Les aquariums sont oxygénés en permanence afin de maintenir une quantité élevée d'oxygène dissous et bénéficient d'un renouvellement continu de l'eau (quatre renouvellements par jour). La photopériode est réglée à 14 heures de jour / 10 heures de nuit. La **Figure II-14** présente le système de stabulation.



**Figure II-14 : Installations pour la stabulation des organismes au laboratoire.**

(Photos Emilie Lacaze / Cemagref Lyon)

Les organismes sont alors acclimatés 15 (+/- 1) jours avant toute expérimentation, que ce soit au laboratoire ou pour être transplantés *in situ*. Ils sont nourris *ad libitum* avec des feuilles d'aulne (*Alnus glutinosa*). Afin de limiter l'apparition de carences alimentaires, des vers (*Tubifex sp.*) sont distribués deux fois par semaine comme source de nourriture supplémentaire.

## 2.2 Expérimentations au laboratoire sur les gammares acclimatés issus de la Tour du Pin

Nous avons réalisé nos expérimentations au laboratoire dans le but de caractériser l'influence de la température et de la conductivité de l'eau sur nos trois marqueurs : les taux croissance et d'alimentation ainsi que la reproduction. Ces expériences ont été réalisées avec un renouvellement continu de l'eau (quatre renouvellements par jour) et sous oxygénation constante. La photopériode était réglée à 14 heures de jour / 10 heures de nuit.

Le pH, la conductivité de l'eau, la température et la quantité d'oxygène dissous étaient mesurés quotidiennement. Afin d'avoir un suivi plus régulier et plus précis de la température, des sondes (Tinytag temperature logger Aquatic 2 ®) étaient également placées dans les bains-marie.

### 2.2.1 Influence de la taille, de la température et de la conductivité sur le taux d'alimentation de *G. fossarum*

Les expérimentations ont été réalisées entre le 10 et le 25 mars 2010. Pour la mesure de l'influence de la taille, nous avons utilisé trois classes de tailles :  $7,3 \pm 0,6$  ;  $10,6 \pm 0,4$  et  $16,4 \pm$

0,3 mm couvrant la gamme de taille envisageable pour le développement d'un test au regard de la disponibilité en organismes dans le site de prélèvement. Afin de déterminer leur taille, les organismes étaient photographiés à l'aide d'une loupe binoculaire équipée d'un appareil photo numérique, puis mesurés dans un deuxième temps avec le logiciel d'analyse d'image SigmaScan® Pro v5.0. La taille des organismes était estimée entre le début du prosoma (à la base de l'antenne) et la fin du métasoma (*cf.* **Figure II-2**).

Pour étudier l'influence de la température et de la conductivité, nous nous sommes intéressés à trois températures :  $7,0 \pm 0,05$  ;  $12,1 \pm 0,01$  et  $16,4 \pm 0,3^\circ\text{C}$  et deux conductivités :  $200 \pm 50$  et  $600 \pm 50 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  afin de couvrir une gamme assez large et représentative des conditions observées lors d'expérimentations *in situ* dans nos régions. Pour des raisons techniques, nous n'avons pas pu tester plus de conductivités et de températures.

Nous avons utilisé pour chaque condition quatre réplicats de 20 mâles. Ils étaient nourris *ad libitum* avec 20 disques d'aulne (*Alnus glutinosa*) de 2 cm de diamètre. Deux réplicats contenant seulement des disques étaient également utilisés comme contrôle pour chaque condition.

Le dispositif expérimental est décrit sur la **Figure II-15**. Les organismes étaient placés dans des béchers en verre de 600 mL équipés d'une surverse afin d'évacuer le trop plein d'eau et permettre son renouvellement. L'ouverture des surverses était obstruée avec de la maille de 300  $\mu\text{m}$  pour éviter la fuite des organismes. Le renouvellement de l'eau était assuré par des pompes péristaltiques permettant un renouvellement constant au cours du temps et homogène entre les réplicats. Les béchers étaient placés dans des bains-marie thermorégulés à la température souhaitée et alimentés en continu par de l'eau à la conductivité souhaitée. Pour une bonne précision et une meilleure stabilité dans la température des bains-marie, l'eau était sur-refroidie par un groupe froid puis chauffée par un thermostat à la bonne température. Une pièce de toile à bluter en polyamide (porosité : 500  $\mu\text{m}$  ; longueur x largeur : 6 x 5 cm) était disposée dans chaque bécher de façon à fournir une surface d'accroche aux gammares, permettant ainsi de minimiser les agressions entre organismes.



**Figure II-15 : Photo du dispositif expérimental utilisé pour l'étude du taux d'alimentation et du taux de croissance.**

(Photos Benoît Xuereb / Cemagref Lyon)

**b.** : bécber ; **b.m.** : bain-marie thermorégulé ; **g.f.** : groupe froid ; **d.a.** : disques d'aulne ; **id.** : identifiant de l'expérimentation ; **p.e.** : plan expérimental ; **t.b.** : toile à bluter ; **th.** : thermostat.

Après sept jours d'exposition, les disques de feuilles étaient retirés, scannés et mesurés avec le logiciel d'analyse d'image SigmaScan ® Pro v5.0. Les gammares étaient comptés afin d'estimer leur survie. Une autre semaine d'exposition était alors lancée avec un nouveau lot de disques.

Le taux d'alimentation (FR) était obtenu pour chaque réplicat avec la formule suivante adaptée de Maltby et al. (1990a ; 1990b), qui nous permet d'exprimer ce taux en mm<sup>2</sup> de feuille consommée par gammare et par jour :

$$FR_i = \frac{(S_{\text{control}_e} - S_i)}{((l_{i,t_0} + l_{i,t_0+\Delta t})/2) \Delta t} \quad \text{Eq II-1}$$

où  $FR_i$  correspond au taux d'alimentation du réplicat  $i$ ,  $S_{\text{control}_e}$  à la surface des disques de feuilles issus des lots de contrôle sans gammares à la fin de l'exposition,  $S_i$  à la surface des disques de feuilles restant après l'expérience pour le réplicat  $i$ ,  $l_{i,t_0}$  au nombre de gammares au début de l'exposition,  $l_{i,t_0+\Delta t}$  au nombre de gammares à la fin de l'exposition et  $\Delta t$  à la durée en jours de l'exposition (ici sept jours).

Pour la mesure du taux d'alimentation chez les *gammaridae*, plusieurs auteurs utilisent comme mesure la biomasse consommée en mg de poids sec de feuilles (Maltby et al. 2002 ; Zubrod et al. 2010 ; Bundschuh et al. 2011a ; Bundschuh et al. 2011b). Cette mesure de biomasse peut se révéler pertinente afin, par exemple, de relier le taux d'alimentation à des taux de décomposition de la matière organique. Cependant, dans ce travail, l'objectif était de développer une méthodologie permettant de diagnostiquer la toxicité de l'eau d'un site sur des organismes calibrés et acclimatés et pas sur les communautés en place. Dans ce contexte, la mesure de la surface consommée présente un certain nombre d'avantages. En effet, contrairement au poids sec, la mesure de surface offre la possibilité 1- de réaliser une cinétique de mesure à partir d'un même lot de disques de feuilles, et 2- d'écarter la variabilité induite par la formation de biofilm et/ou l'accumulation de matière organique (notamment dans le cadre de tests *in situ*) sur les disques qui peut fausser la mesure de poids sec. De plus, nous avons montré, en réalisant les deux types de mesures sur les mêmes lots de disques de feuilles, qu'il existait une très bonne corrélation entre la mesure de surface et de biomasse (Coulaud et al. 2011).

Pour ces expériences au laboratoire, les taux de survie étaient très bons (supérieurs à 90 % pour toutes les conditions) mais pour les expériences *in situ*, la mortalité était un peu plus importante et nous avons décidé de ne conserver que les réplicats pour lesquels les taux de survie étaient supérieurs à 75 %.

### 2.2.2 Influence de la température et de la conductivité sur le taux de croissance de *G. fossarum*

Pour la mesure du taux de croissance, nous avons utilisé le même dispositif technique que pour l'étude du taux d'alimentation. L'expérimentation a été menée entre le 23 janvier et le 8 mars 2010.

La croissance du gammare étant relativement lente, en particulier à faible température, nous n'avons pas étudié le développement de juvéniles jusqu'au stade adulte dans son intégralité. En effet, des expositions trop longues sont d'une part difficiles à mener dans des conditions de laboratoire d'un point de vue technique et d'autre part conduisent à des carences pour les organismes ainsi qu'à une mortalité importante ce qui biaise l'estimation des taux de croissance. Nous avons donc utilisé deux classes de taille : 2,50 (0,26) et 5,00 (0,51) mm de départ. Nous avons étudié quatre réplicats de 15 individus pour la première classe et quatre réplicats de 10 individus pour la seconde classe pour chaque condition. Les gammares étaient nourris *ad libitum*

avec des feuilles d'aulne (*Alnus glutinosa*) préalablement maintenues quelques jours dans l'eau pour les réhydrater. Afin de limiter l'apparition de carences, des vers (*Tubifex sp.*) étaient distribués deux fois par semaine comme source de nourriture supplémentaire. Pour la première classe, des fèces (récupérés dans les élevages et préalablement congelés et broyés pour éviter l'ajout de nouveaux organismes) étaient également distribués une fois par semaine, des études ayant montrées que les juvéniles de gammares se nourrissaient en parties des fèces des adultes.

Les gammares étaient mesurés selon la méthode décrite pour le taux d'alimentation et comptés (afin d'estimer les taux de survie) après différents temps d'exposition (0, 14, 32 et 46 jours).

Dans le but de proposer une mesure suffisamment représentative du taux de croissance pour toutes les expériences, nous n'avons conservé pour nos analyses que les réplicats présentant des taux de survie supérieur à 50 %.

### 2.2.3 Influence de la taille, du stade de mue, de la température et de la conductivité sur la reproduction de *G. fossarum*

Pour la reproduction, les expériences ont été menées entre février et mai 2009. Les expériences n'ont pas été réalisées en béccher de 600 mL comme pour la mesure de l'alimentation et de la croissance mais dans des systèmes en polypropylène de 5 cm de diamètre et 12 cm de hauteur ce qui nous a permis d'individualiser les couples (**Figure II-16**). Les systèmes étaient placés dans des bains-marie thermorégulés à la température souhaitée (7, 12 ou 16 °C) et alimentés en continu par de l'eau à l'une des deux conductivités (200 et 600  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

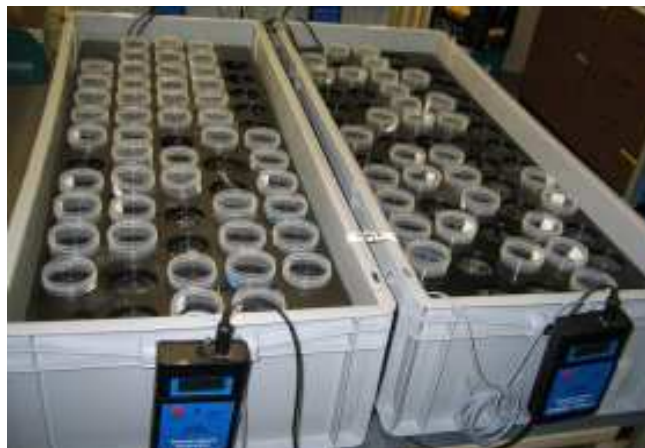


Figure II-16 : Photo du dispositif expérimental utilisé pour l'étude de la reproduction.

(Photo Romain Coulaud / Cemagref Lyon)

Différents marqueurs de la reproduction, décrits dans Geffard et al. (2010), étaient mesurés toutes les 72 h pour les femelles exposées à 7°C, 48 h pour celles à 12°C et 36 h pour celles à 16°C, du début jusqu'à la fin du cycle de reproduction. Nous avons choisi ces pas de temps différents selon les températures car d'après les données de la littérature, nous savions que la durée du cycle de reproduction était beaucoup plus longue à faible température qu'à forte température. Ceci nous a permis 1- d'avoir un nombre d'individus commun entre nos différentes modalités ce qui n'aurait pas été le cas si nous avions réalisés des mesures avec la même fréquence dans les différentes conditions de température et 2- de diminuer le nombre de femelles à sélectionner qui aurait été très important avec des arrêts plus rapprochés ce qui nous aurait obligé à étaler le lancement de l'expérimentation sur une période trop longue. Etant donné le nombre important de couples nécessaires, nous n'avons pas pu lancer toutes les modalités le même jour comme cela a été le cas pour les mesures du taux d'alimentation et du taux de croissance. En effet, pour nous situer en début de cycle de reproduction, il nous fallait sélectionner des femelles venant juste de muer (et donc de finir leur cycle de reproduction précédent). Pour ce faire, les femelles de l'élevage étaient contrôlées tous les jours afin de récupérer celles en début de cycle. Afin de ne pas induire de biais liés aux différentes dates de lancement de l'expérimentation, chaque couple était attribué aléatoirement à une des modalités (température, conductivité et temps d'exposition). Au final, la période de lancement s'est étalée durant tout le mois de février et les arrêts des différentes modalités entre février et mai.

Au total, six cent femelles en début de cycle de reproduction ont ainsi été exposées dans les différentes conditions de température et de conductivité puis six femelles étaient analysées pour chaque temps d'exposition.

Les différents marqueurs mesurés étaient **le stade de mue, la taille, la fécondité** (nombre d'ovocytes) ainsi que **la fertilité** (nombre et stade de développement des embryons) :

- La détermination des différents stades de mue a été effectuée sur la base des critères développés par Blanchet-Tournier (1980) chez l'amphipode marin *Orchestia gammarelus* puis adaptés chez *Gammarus fossarum* par Geffard et al. (2010). Cette méthode est basée sur l'observation microscopique des tissus de l'extrémité des périopodes. En effet, les amphipodes présentent une caractéristique particulière assez rare chez les crustacés (Charniaux-Cotton 1957). Dès l'achèvement de l'exosquelette, au début de la phase d'intermue, l'épiderme se décolle au niveau de la griffe dactylienne des périopodes (**Figure II-8**). La matrice tégumentaire s'invagine

progressivement, puis se recouvre précocement (en comparaison au reste du corps) d'un étui cuticulaire.

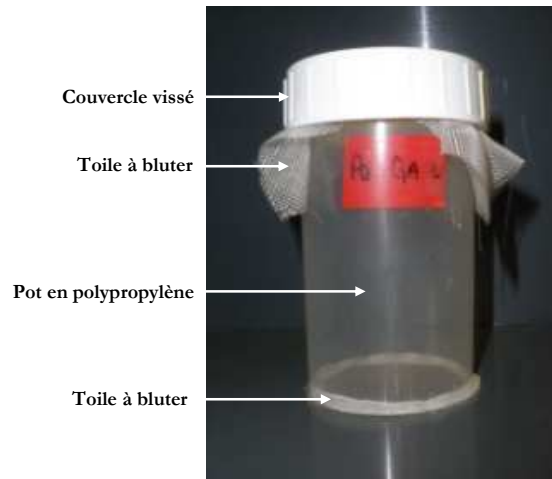
- Afin de déterminer leur taille, les femelles étaient photographiées à l'aide d'une loupe binoculaire équipée d'un appareil photo numérique, puis mesurées dans un deuxième temps avec le logiciel d'analyse d'image SigmaScan<sup>®</sup> Pro v5.0. La taille des organismes était estimée entre le début du prosoma (à la base de l'antenne) et la fin du métasoma (cf. **Figure II-2**).
- Afin d'estimer la fertilité des femelles, le nombre d'ovocytes secondaires de chaque gonade était décompté *in vivo*, par observation directe à travers la cuticule translucide au moyen d'une loupe binoculaire (x 30).
- Enfin, afin d'évaluer la fécondité, les embryons étaient retirés manuellement du marsupium, puis placés dans une goutte d'eau sur une lame de verre afin d'être comptés à l'aide d'une loupe binoculaire (x 30). Le stade embryonnaire était également déterminé sur la base des critères définis chez *G. pulex* (McCahon and Pascoe 1988) et adaptés chez *G. fossarum* par Geffard et al. (2010).

## 2.3 Encagements *in situ* des gammares acclimatés issus de la population de la Tour du Pin

### 2.3.1 Méthodologie d'encagement

Nous avons réalisé des encagements *in situ* d'organismes 1- dans des sites faiblement contaminés afin d'étudier sur le terrain les trois marqueurs et de valider les observations faites au laboratoire et 2- dans des sites contaminés afin de tester la sensibilité de nos différents marqueurs. Le choix et la description des différents sites seront détaillés dans le **Chapitre 3**. La méthodologie d'encagement a été adaptée à partir de celle proposée par Maltby et al. (1990b) pour l'étude du taux d'alimentation *in situ* chez le crustacé *G. pulex*. Les organismes étaient répartis dans des chambres cylindriques d'encagement en polypropylène de 5 cm de diamètre et 12 cm de hauteur. Ces systèmes étaient clos par un couvercle percé au préalable, vissé sur un carré de toile à bluter avec une maille de 500  $\mu\text{m}$  (**Figure II-17**). Le fond de la chambre d'encagement était un carré de toile à bluter soudé sur les bords du tube de polypropylène.





**Figure II-17 : Système d'encagement *in situ* pour les organismes de *G. fossarum*.**

(Photo Emilie Lacaze / Cemagref Lyon)

Les systèmes étaient transportés dans des bidons en polypropylène contenant le même milieu que celui de stabulation. Lors du transport sur les sites, les bidons étaient placés dans des glacières avec un système de bullage pour les longs trajets.

Les chambres d'encagement étaient placées dans des caisses en PVC (longueur x largeur x hauteur : 60 x 40 x 20 cm) afin de les protéger des branches ou des pierres pouvant dériver dans l'eau (**Figure II-18**). Une sonde programmable enregistrant la température toutes les quatre heures était placée à l'intérieur de la caisse. Ce pas de temps nous a permis de mesurer les variations de la température de l'eau pendant toute la durée des expérimentations ainsi que les variations nyctémérales. Les caisses étaient fixées sur la berge par une corde et lestées par des pierres posées sur le couvercle.

Les chambres d'encagement étaient relevées au minimum toutes les semaines pour mesurer le taux de survie des organismes et ajouter de la nourriture si besoin. Si les conditions climatiques étaient défavorables (forte pluie, crue), les caisses étaient relevées et nettoyées pour éviter une sédimentation trop importante de la matière organique. Lors de l'arrêt d'une expérimentation de terrain, les gammares étaient ramenés au laboratoire dans leurs chambres d'encagement originelles placées dans un bidon contenant de l'eau du site.



**Figure II-18 : Caisse contenant les systèmes d'encagement.**

(Photos Emilie Lacaze / Cemagref Lyon)

### 2.3.2 Mesures physico-chimiques

Lors de chaque installation de caisses d'encagement sur un site, des mesures physicochimiques de base, à savoir pH, conductivité, température étaient effectuées à l'aide d'une sonde multimètre WTW Multi350i. La teneur en oxygène était également mesurée par un oxymètre WTW oxi 315i. En plus de ces mesures, un échantillon d'eau était prélevé dans un flacon de 500 ml en polyéthylène. Dans les 48 heures suivant l'échantillonnage, le pH, la conductivité, les concentrations en anions majeurs  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  et  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , en cations  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , et  $\text{NH}_4^+$  ainsi que la teneur en matières en suspension (MES) étaient déterminés par un laboratoire de chimie accrédité (Laboratoire d'analyses physicochimiques des milieux aquatiques, Cemagref, UR Milieux Aquatiques, Ecologie et Pollutions). Bien que ces mesures chimiques ponctuelles ne soient pas forcément représentatives des caractéristiques des sites sur le long terme, elles nous ont permis d'avoir une idée des conditions au moment de nos encagements. De plus, ces mesures nous ont permis de mesurer la conductivité ainsi que la teneur en calcium et en magnésium (qui permettent de calculer la dureté de l'eau) qui sont relativement stables dans le temps et qui sont souvent décrits comme étant des facteurs de confusion potentiels sur la réponse de nos marqueurs.

### 2.3.3 Protocoles des tests

De la même manière que pour les expérimentations au laboratoire, le taux d'alimentation, le taux de croissance et la reproduction étaient étudiés durant chaque campagne.

Pour le **taux d'alimentation**, le test était réalisé selon le même protocole qu'au laboratoire avec deux essais successifs de sept jours. Quatre réplicats de 20 mâles de taille homogène étaient nourris *ad libitum* avec 20 disques d'aulne (*Alnus glutinosa*) de 2 cm de diamètre. Deux réplicats contenant seulement des disques étaient également utilisés comme contrôle. Dans le but de proposer une mesure suffisamment représentative du taux d'alimentation pour toutes les expériences, nous n'avons conservé pour nos analyses que les réplicats présentant des taux de survie supérieur à 75 %.

Pour la **croissance**, quatre réplicats de 12 juvéniles étaient utilisés et exposés durant 28 jours. La taille des organismes était mesurée à la fin de l'exposition. Un lot de 30 organismes témoins, choisis aléatoirement dans le pool d'organismes de départ, était mesuré au début de l'expérience afin d'estimer les tailles initiales des organismes. Nous n'avons conservé pour nos analyses que les réplicats présentant des taux de survie supérieur à 50 %.

Pour la **reproduction**, six réplicats de sept couples étaient utilisés. Les couples étaient sélectionnés pour que les femelles soient en fin de cycle de reproduction, prêtes à muer et à pondre. Trois des réplicats étaient alors exposés durant 21 jours. A la fin de l'exposition, les différents marqueurs présentés pour l'exposition au laboratoire (stade de mue, taille, fertilité et fécondité) étaient mesurés. Pour les trois autres réplicats, l'objectif était de mesurer la durée du cycle de reproduction dans son intégralité. Pour cela, les couples étaient exposés jusqu'à la ponte suivante des femelles. Les systèmes étaient surveillés régulièrement (tous les deux à trois jours) afin de pouvoir estimer précisément la durée du cycle de mue. Nous n'avons conservé pour nos analyses que les réplicats présentant des taux de survie supérieur à 75 %.

**Synthèse :**

Bioessais avec *Gammarus fossarum*

Nous avons mis en place dans ce travail des expérimentations avec *Gammarus fossarum* afin de **caractériser l'influence des facteurs de confusion abiotiques** (température, conductivité) et **biotiques** (taille, stade de mue) sur trois bioessais individuels : la mesure **du taux d'alimentation**, du **taux de croissance** et de **différents marqueurs de la reproduction** (fécondité, fertilité, développement embryonnaire).

Pour ce faire, nous avons utilisé une approche combinant 1- des **expérimentations au laboratoire** (étude de l'influence des facteurs de confusion en conditions contrôlées) et 2- **sur le terrain** : développement de protocoles d'encagement *in situ via* la transplantation d'organismes issus d'un site de prélèvement connu (la Bourbre au niveau de la Tour du Pin), acclimatés au laboratoire puis exposés dans plusieurs sites très peu contaminés (dans le but de valider l'influence des différents facteurs de confusion) et dans plusieurs sites contaminés (dans le but de tester sur le terrain la sensibilité des différents marqueurs).

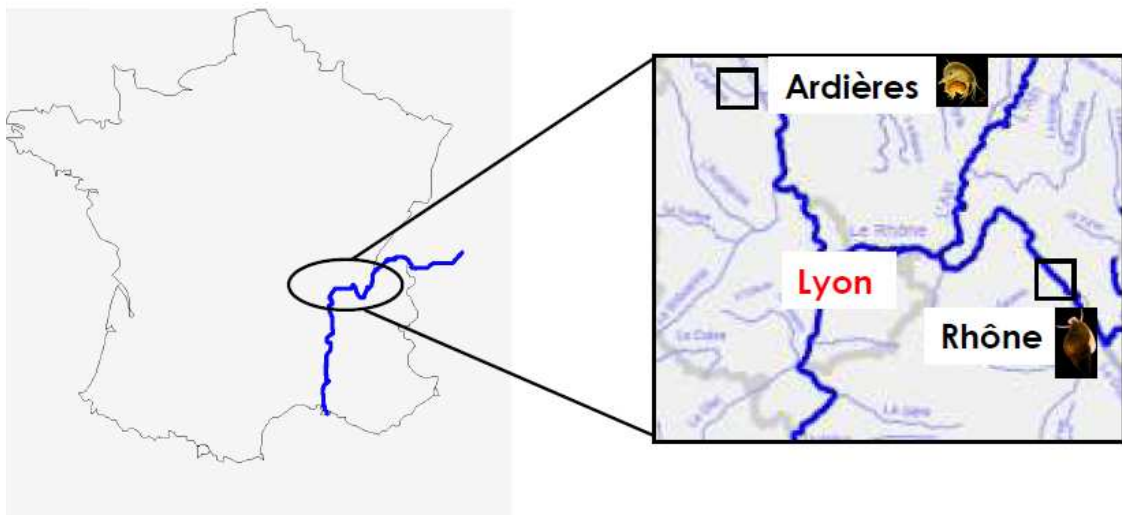
Les résultats de ces expérimentations seront présentés et discutés dans le **Chapitre III**.

### 3 Suivi de population de *G. fossarum* sur l'Ardières

#### 3.1 Site de suivi

Le site de suivi de *G. fossarum* est situé à l'amont de l'Ardières au niveau de la commune des Ardillats (longitude : 04°31' 15.9" E, latitude : 46°11' 11.8" N, Rhône, France), un affluent de la Saône (**Figure II-19**). Ce site, situé très en amont de la rivière à proximité de la source de la rivière, a été retenu car il héberge une population de gammares présentant de fortes densités et exclusivement composée de *G. fossarum*. La hauteur d'eau et le débit de l'Ardières permettent un échantillonnage toute l'année. Ce site représente un habitat caractéristique des habitats préférentiels de *G. fossarum* avec une hauteur d'eau assez faible, une forte oxygénation de l'eau et un courant assez fort. De plus, des bryophytes sont présents de façon abondante une bonne partie de l'année, constituant ainsi des zones de refuge pour les gammares.

Afin de suivre l'évolution des températures tout au long de l'année, une sonde mesurant la température en continu toutes les quatre heures était placée dans l'eau au niveau du site d'étude. Elle était relevée tous les mois.



**Figure II-19 : Localisation géographique des sites de suivi de population de *G. fossarum* sur l'Ardières et *P. antipodarum* sur le Rhône.**

### 3.2 Suivi de terrain mensuel pour le site de l'Ardières

Un suivi mensuel de cette population a été réalisé entre décembre 2008 et décembre 2009. Nous allons détailler dans cette section le protocole de ce suivi. Il se compose de deux parties distinctes : 1- un relevé démographique des densités et des structures en taille et 2- un relevé de l'état reproductif de la population.

#### 3.2.1 Suivi démographique

Le relevé démographique était réalisé à l'aide d'un filet de Surber (surface de 1/20<sup>ème</sup> de m<sup>2</sup> prélevée dans un filet avec une maille de 250 µm) (**Figure II-20**). Les prélèvements étaient réalisés dans les différents types de substrat rencontrés dans la rivière (entre deux et quatre substrats selon la période de l'année) puis tamisés en deux classes de taille (avec un tamis de 1,25 mm et un de 375 µm). Les différents types de substrats prélevés nous permettaient d'être représentatifs de l'ensemble de la rivière. Les substrats les plus favorables à l'hébergement de gammares (bryophytes, gravier, matière organique) (Maitland 1966 ; Janetzky 1994 ; Dahl and Greenberg 1996 ; Elliott 2002) étaient tous échantillonnés même s'ils représentaient une faible surface de recouvrement. Le nombre de Surber prélevés au sein de chaque type de substrat (de quatre à 10) était estimé en fonction de la densité d'individus du substrat afin d'obtenir un nombre suffisant d'organismes. Cette méthodologie, avec un effort d'échantillonnage concentré à la fois sur les substrats favorables à la présence des gammares et sur les substrats majoritaires dans le site, permet d'estimer précisément les densités et les distributions en taille des organismes.



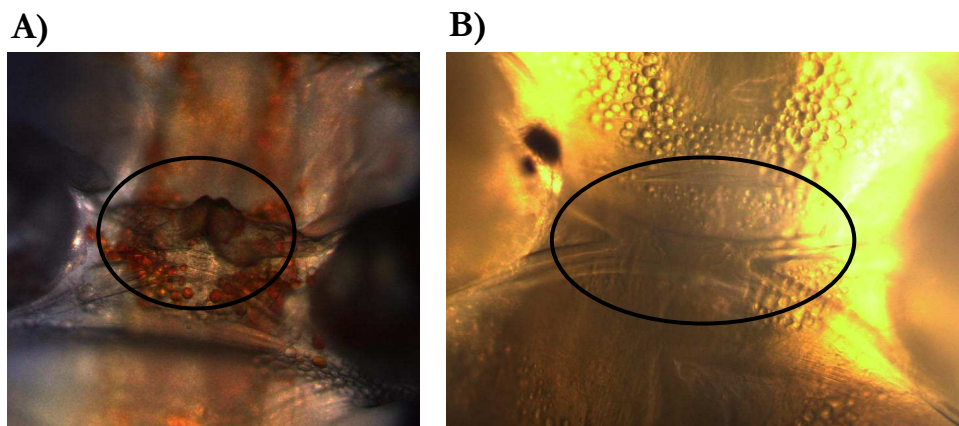
**Figure II-20 : A) Illustration de la méthodologie de prélèvement des organismes au Surber ; B) illustration de l'estimation du pourcentage des différents substrats dans la rivière.**

(Photos Romain Coulaud / Cemagref Lyon)



La surface de recouvrement de chaque type de substrat était estimée à l'aide d'un quadra de 50 cm de côté. Pour cela, nous estimions sur un transect de rivière (d'une rive à l'autre) la proportion des différents substrats. Un minimum de six transects était réalisé au sein du site d'échantillonnage. Une moyenne des différents transects était réalisée afin d'estimer la surface moyenne de recouvrement de chaque type de substrat prélevé à l'échelle du site.

Une fois au laboratoire, les gammares retenus pour chaque substrat dans le grand tamis (maille de 1,25 mm) étaient triés en deux groupes : les femelles gravides possédant des ovocytes et/ou des embryons dans le marsupium d'un côté et les mâles et les femelles non gravides (non différenciables à l'œil nu) de l'autre. Ils étaient alors comptés puis un échantillon de 60 femelles gravides était mesuré et un échantillon de 60 individus indifférenciés (mâles + femelles non gravides) sexé et mesuré. Le sexage des individus était réalisé par observation de la présence ou de l'absence de papilles génitales situées ventralement au niveau du 5<sup>ème</sup> segment du mésosoma (Xuereb 2009) (**Figure II-21**). Nous obtenions ainsi la distribution en taille des mâles et des femelles, la sex-ratio, la taille à la puberté ainsi que le pourcentage de femelles en reproduction pour chaque substrat échantillonné.



**Figure II-21 : Observation du 5<sup>ème</sup> segment du mésosoma de *G. fossarum* chez le mâle et la femelle A) un mâle de *G. fossarum* avec la présence des papilles génitales et B) une femelle de *G. fossarum* chez qui les papilles génitales sont absentes.**

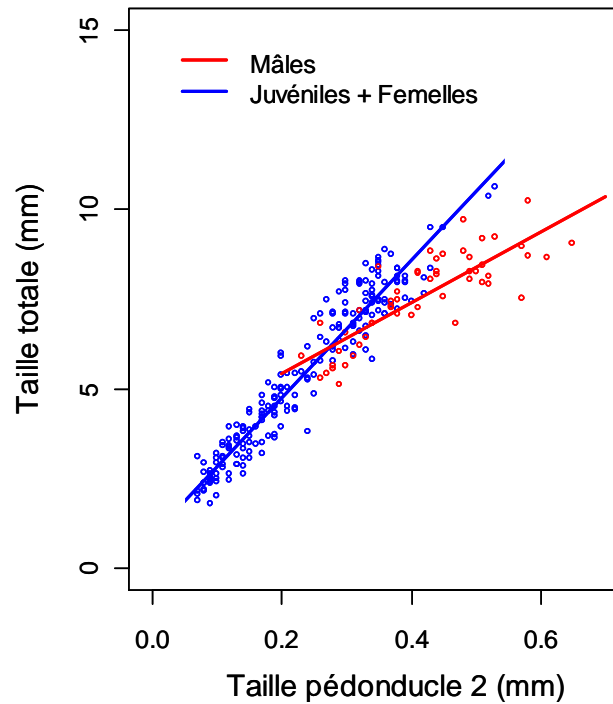
(Photos Romain Coulaud / Cemagref Lyon)

Les gammares retenus dans le plus petit tamis (contenant en grande majorité des juvéniles) étaient conservés dans l'alcool. Leur densité pouvant être très importante, leur nombre était estimé ensuite à l'aide d'un cadrat de 25 cases : les individus de cinq cases sur 25 étaient dénombrés. Ce comptage de cinq cases sur 25 a été déterminé lors des premiers mois de suivi en

comptant l'ensemble des cases et en estimant à partir de quel nombre nous étions représentatif du nombre total d'individus dans le prélèvement. Ensuite, 60 individus tirés aléatoirement étaient mesurés. La moitié des juvéniles était alors considérés comme des mâles et l'autre comme des femelles. Nous faisons alors l'hypothèse que la sex-ratio était équilibrée comme cela a déjà pu être souligné dans des études précédentes sur des populations de *gammaridae* situées dans des sites peu ou pas impactés (Welton 1979 ; Devin et al. 2004).

Pour la mesure de la taille des organismes, nous avons procédé comme précédemment par prise de photo et analyse par le logiciel d'analyse d'image SigmaScan ® Pro v5.0. Cependant, étant donné le nombre important d'organismes à mesurer tous les mois, nous avons cherché à trouver un indicateur de taille plus facile et rapide à mesurer que la taille totale des organismes. Nous avons ainsi établi une relation entre la taille totale classiquement mesurée et la taille du deuxième segment de l'antenne (correspondant au pédoncule 2 (**Figure II-22**)). Nous avons observé une différence entre les mâles et les femelles pour cette relation conforme avec les observations de Steele (1995), les mâles ayant pour une taille donnée un pédoncule 2 plus grand que les femelles. Lorsque nous considérons les mâles d'un côté et les femelles + juvéniles de l'autre, nous observons une bonne corrélation entre la taille totale et la taille du pédoncule 2 ( $r^2 = 0.95$  pour les femelles + juvéniles et  $r^2 = 0.86$  pour les mâles). Les informations nécessaires sur la taille des organismes pour construire les modèles de dynamique de population basés sur des grandes classes de tailles (**Chapitre IV**) n'étant pas des mesures extrêmement précises et ces modèles étant construit uniquement à partir des femelles pour lesquelles la corrélation est la meilleure, nous avons choisi d'utiliser cet indicateur comme mesure de la taille des organismes.





**Figure II-22 : Relation entre la taille totale (en mm, de la base de l'antenne à la fin du métasoma) et la taille du pédoncule 2 de l'antenne (en mm) chez *G. fossarum*.**

Un regroupement des différents substrats était alors réalisé en fonction de leur proportion surfacique ce qui nous permet d'obtenir les densités et la distribution en taille des individus au niveau de la station.

### 3.2.2 Suivi de l'état reproducteur des femelles

En parallèle du suivi démographique, des organismes étaient prélevés aléatoirement sur les différents substrats de la zone d'étude avec un troubleau (taille 25 x 18 cm, maille 630  $\mu\text{m}$  ; cf. **Figure II-13**). Les individus adultes (retenus sur un tamis de maille 1,25 mm) étaient ramenés au laboratoire. Parmi les femelles gravides (*e.g.*, possédant des ovocytes et/ou des embryons dans le marsupium), 60 étaient échantillonnées aléatoirement. Les différents marqueurs de reproduction décrits précédemment (cf. paragraphe 2.2.3) étaient alors analysés (taille, stade de mue, fécondité, fertilité).

### 3.3 Estimation de la variabilité des traits de vie pour le site de l'Ardières

Nous nous sommes intéressés à la variabilité saisonnière des traits de vie (croissance et reproduction) au cours de l'année. Nous avons alors opté pour une double approche avec des expérimentations au laboratoire et des encagements *in situ*. Au laboratoire, nous avons étudié l'influence de la température, qui peut être considérée comme un des principaux facteurs responsables de la variabilité saisonnière de ces traits. Sur le terrain, nous avons réalisé des encagements à différentes saisons afin d'obtenir des données dans des conditions contrastées.

#### 3.3.1 Expérimentation au laboratoire sur les organismes de l'Ardières

Nous avons choisi de nous intéresser au laboratoire uniquement à la croissance. En effet, pour la reproduction, réaliser une expérimentation similaire à celle présentée dans le paragraphe 2.2.3 pour le bioessai sur la reproduction n'a pas été envisagé en raison de la durée de l'expérimentation (presque deux mois à 7°C) et des moyens matériels et techniques que ce type d'expérience représente. Cependant, nous avons pu avoir une bonne estimation de la variabilité des taux de reproduction et de la durée du cycle de reproduction *via* l'expérience au laboratoire sur les organismes acclimatés issus de la Bourbre sur le site de la Tour du Pin.

Afin de valider la transposition des résultats obtenus sur ces organismes acclimatés pour l'étude de la population de l'Ardières, nous avons réalisé en même temps sur le site de l'Ardières des encagements (*cf.* paragraphe 3.3.2) 1- d'organismes issus directement de la population de l'Ardières et 2- d'organismes acclimatés issus de la Bourbre, similaires à ceux utilisés lors de l'expérimentation au laboratoire. Nous avons ainsi pu comparer les réponses de ces deux types d'organismes.

Pour la croissance, nous avons utilisé la même méthodologie que celle décrite dans la partie 2.2.2. Cependant, à la place d'organismes acclimatés au laboratoire, nous avons utilisé des organismes de l'Ardières directement prélevés dans le site de suivi de la population. Afin de conserver des individus dans des conditions le plus proches possibles de celles du terrain, nous n'avons pas utilisé une période d'acclimatation, l'expérience commençant dès le retour au laboratoire après le prélèvement des organismes. Nous avons étudié trois températures : 7, 12 et 16°C qui correspondent à la gamme de températures observée au cours de l'année dans le site sur l'Ardières. Pour la conductivité, nous l'avons fixée à 200  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  afin d'être au plus proche de

celle rencontrée dans la rivière. En effet, étant donnée que celle-ci est globalement constante tout au long de l'année (comprise entre 150 et 250  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), il n'y avait pas de raison d'étudier, comme lors du développement du bioessai sur la croissance, l'influence de ce paramètre.

Nous avons utilisé trois classes d'organismes ayant des tailles de départ de  $2,5 \pm 0,3$  mm ;  $4,5 \pm 0,8$  mm et  $5,8 \pm 0,7$  mm. Quatre réplicats de 15 individus pour la première classe et de 10 individus pour les deuxième et troisième classes ont été étudiés pour chaque condition. Les gammars étaient mesurés et comptés (afin d'estimer les taux de survie) après 0, 14, 32, 46 et 56 jours d'exposition.

### 3.3.2 Encagements *in situ* aux différentes saisons sur le site de l'Ardières

Nous avons effectué des encagements *in situ* d'organismes de l'Ardières issus de notre population selon la même méthodologie que celle présentée dans la partie 2.2.4. Nous nous sommes intéressés à la croissance et la reproduction. Afin de pouvoir étudier la variabilité saisonnière, les encagements ont été réalisés aux quatre saisons dans des périodes présentant des variations importantes de la température de l'eau. Les organismes étaient sélectionnés directement sur le terrain, juste après le prélèvement, sans passage au laboratoire.

Pour la **croissance**, quatre réplicats de 12 juvéniles étaient utilisés et exposés durant 28 jours. La taille des organismes était mesurée à la fin de l'exposition. Un lot de 30 organismes témoins était mesuré au début de l'expérience afin d'avoir les tailles initiales des organismes.

Pour la **reproduction**, six réplicats de sept couples étaient utilisés. Les couples étaient sélectionnés pour que les femelles soient en fin de cycle de reproduction, prêtes à muer et à pondre. Trois des réplicats étaient alors exposés durant 21 jours. A la fin de l'exposition, les différents marqueurs présentés pour l'exposition au laboratoire (stade de mue, fertilité et fécondité) étaient mesurés. Pour les trois autres réplicats, l'objectif était de mesurer la durée du cycle de reproduction dans son intégralité. Pour cela, les couples étaient exposés jusqu'à la ponte suivante des femelles. Les systèmes étaient surveillés tous les deux jours afin d'avoir une idée précise de la durée du cycle.

En utilisant un protocole strictement identique à celui développé pour la partie sur les bioessais, nous avons pu, en réalisant des encagements d'organismes de l'Ardières et la transplantation d'organismes de la Bourbre en même temps sur le même site, comparer les réponses afin de vérifier si les observations faites au laboratoire sur des organismes acclimatés pouvaient être utilisés dans le cadre de l'étude de la population naturelle de l'Ardières.

## 4 Suivi de population de *P. antipodarum* sur le Rhône

### 4.1 Site de suivi

Le site de suivi de *P. antipodarum* est situé sur le Rhône au niveau de la commune de Creys-Malville (longitude : 05°27' 55.3" E, latitude : 45°46' 30.7" N, Rhône, France) (**Figure II-19**). Ce site a été retenu car il héberge une population de *P. antipodarum* présentant de fortes densités et l'échantillonnage est possible toute l'année (situé en aval du barrage de Sault-Brénaz, ce site présente des variations de débit et de hauteur d'eau très faibles durant l'année). Diverses espèces de mollusques sont suivies sur ce site depuis de nombreuses années (Mouthon 2001). Il représente un habitat très favorable pour *P. antipodarum*. En effet, située entre deux barrages, la zone forme une vaste étendue lentique et un sédiment meuble a pu se déposer. Durant la période estivale, la zone est colonisée par des macrophytes qui fournissent des refuges aux *P. antipodarum*. Afin de suivre l'évolution des températures tout au long de l'année, une sonde mesurant la température en continu toutes les quatre heures était placée dans l'eau au niveau du site d'étude. Elle était relevée tous les mois.

### 4.2 Suivi mensuel

Un suivi mensuel de cette population a été réalisé entre octobre 2009 et octobre 2010. Nous allons détailler dans cette section le protocole de ce suivi. Le suivi se scinde en deux parties : 1-un relevé démographique et 2- un suivi de la fécondité.

#### 4.2.1 Suivi démographique

Le relevé était fait à l'aide d'un troubleau avec une maille de 250  $\mu\text{m}$ . L'habitat étant très homogène sur le site, nous n'avons pas considéré différents types de substrat comme pour *G. fossarum*. Chaque mois, un mètre carré de vase était prélevé en quatre points d'échantillonnage proches (4 x 0,25 m<sup>2</sup>). Le prélèvement était alors tamisé sur une colonne de tamis avec un tamis de maille 630  $\mu\text{m}$  et un de maille 450  $\mu\text{m}$ . La matière organique ainsi que les organismes des autres espèces (crustacés, annélides, larves d'insectes, *etc.*) étaient retirés.

Une fois au laboratoire, les prélèvements étaient conservés dans l'alcool. Celui correspondant au petit tamis était trié sous une loupe binoculaire afin de retirer les coquilles vides puis le nombre de juvéniles était alors compté. Durant les premiers mois du suivi, les individus étaient mesurés de la pointe de la coquille à la base de l'opercule. Leur taille se révélant très homogène (entre 0,4 et 0,6 mm) nous avons alors décidé de seulement les compter à partir de décembre 2009. Pour les organismes du grand tamis, leur nombre étant souvent très important, nous avons utilisé un cadrat de 25 cases pour sous-échantillonner le prélèvement. Neuf cases sur 25 étaient triées sous la loupe binoculaire afin de retirer les coquilles vides. Les organismes étaient alors comptés et mesurés de la pointe de la coquille à la base de l'opercule. Ce comptage de neuf cases sur 25 a été déterminé lors des premiers mois de suivi de la même façon que pour *G. fossarum*, en comptant l'ensemble des cases et en estimant à partir de quel nombre nous étions représentatif du nombre total d'individus dans le prélèvement.

#### 4.2.2 Suivi de la fécondité

Un échantillon de 60 individus était sélectionné à partir la taille à la maturité (environ 3 mm) (Gust 2010). Ces individus étaient alors mesurés puis « craqués ». Pour cela, la coquille était cassée à l'aide d'un marteau, la poche embryonnaire retirée puis le nombre d'embryons compté. Cette méthode, bien qu'invasive, nous a permis d'estimer en fonction de leur taille le pourcentage d'organismes en reproduction (contenant au moins un embryon) ainsi que d'étudier la relation entre la taille des organismes et le nombre d'embryons (*cf.* **Chapitre IV**). Cependant, cette méthodologie ne permet pas d'estimer le nombre d'embryons qui seront véritablement pondus par un organisme durant une période donnée. Cette observation a pu être obtenue durant les encagements *in situ* d'organismes.

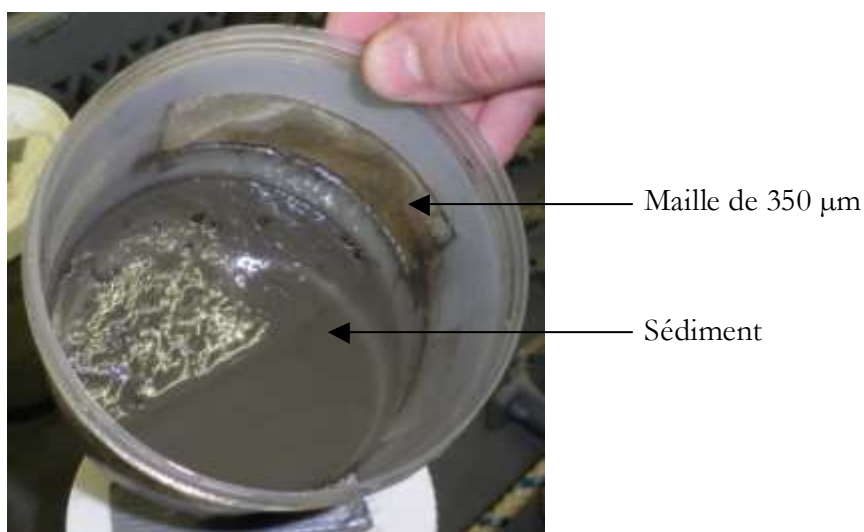
#### 4.3 Etude de la variabilité saisonnière des traits de vie par encagements *in situ* d'organismes

Nous avons réalisé des encagements *in situ* sur le site d'étude tout au long de l'année de suivi afin d'estimer en conditions naturelles la variabilité des taux de croissance et de reproduction au cours de l'année. Nous avons réalisés 11 campagnes d'encagement de 21 jours.

### 4.3.1 Méthodologie d'encagement

Les organismes étaient disposés dans des systèmes d'encagement cylindriques en polypropylène de 10 cm de diamètre et 12 cm de hauteur (**Figure II-23**). Les systèmes étaient fermés par un couvercle vissé. Pour permettre la circulation de l'eau, des ouvertures étaient percées sur les côtés et recouvertes de tamis de diamètre 100  $\mu\text{m}$ . *P. antipodarum* vivant dans les premiers centimètres du sédiment, nous avons choisi, contrairement à nos encagements avec *G. fossarum*, de mettre une couche de sédiments dans le fond des systèmes d'exposition. Pour cela, du sédiment était prélevé sur le site d'étude et tamisé à 350  $\mu\text{m}$  afin de retirer les organismes autochtones. Une couche de deux cm de sédiment était alors déposée dans le fond des systèmes d'exposition. Afin de vérifier qu'il ne restait aucun organisme dans le sédiment, deux systèmes avec uniquement du sédiment étaient utilisés comme témoins. Ces systèmes, contenant du sédiment du site, nous ont permis de fournir des conditions d'exposition optimales, notamment pour l'alimentation des organismes.

Les chambres d'encagement étaient placées dans des caisses en PVC (longueur x largeur x hauteur : 60 x 40 x 20 cm) afin de les protéger des branches ou des pierres pouvant dériver dans l'eau. Une sonde programmable enregistrant la température toutes les 4 heures était placée à l'intérieur de la caisse. Les caisses étaient fixées sur la berge par une corde et lestées par des pierres posées sur le couvercle.



**Figure II-23 : Systèmes d'encagement *in situ* pour les organismes de *P. antipodarum*.**

(Photos Romain Coulaud / Cemagref Lyon)

#### 4.3.2 Protocole des tests

Pour la **croissance**, quatre réplicats de 30 juvéniles étaient utilisés et exposés durant 21 jours. La taille des organismes était mesurée à la fin de l'exposition et les organismes étaient comptés pour estimer la survie. Un lot d'organismes témoins était mesuré au début de l'expérience afin d'estimer les tailles initiales des organismes.

Pour la **reproduction**, quatre réplicats de 50 adultes étaient utilisés et exposés durant 21 jours. Un lot d'organismes témoins était mesuré et « craqué » au début de l'encagement afin d'estimer les tailles initiales et le nombre d'embryons dans les organismes. A la fin de l'exposition, les nouveaux nés pondus pendant les 21 jours étaient comptés, les organismes étaient également comptés pour estimer la survie, mesurés et « craqués ».

### Synthèse :

Suivi de population de *G. fossarum* et *P. antipodarum*

Nous avons mis en place dans ce travail des protocoles de suivi de population afin d'étudier le fonctionnement et la dynamique d'une population de *Gammarus fossarum* sur l'Ardières au niveau de la commune des Ardillats et d'une population de *Potamopyrgus antipodarum* sur le Rhône au niveau de la commune de Creys-Malville, deux sites peu contaminés présentant des populations abondantes et présentes toute l'année.

L'étude de ces deux populations naturelles s'est déroulée selon une démarche comprenant :

- **un suivi démographique mensuel** basé sur un échantillonnage des différents habitats de chacune des populations afin d'estimer différents paramètres démographiques (*e.g.*, densités d'individus, distributions en taille, sex-ratio, taux de fécondité, tailles à la maturité sexuelle, *etc.*) tout au long d'une année
- **des expérimentations au laboratoire et/ou sur le terrain** *via* des encagements d'organismes prélevés sur le site de suivi de la population afin d'estimer la variabilité saisonnière des différents traits de vie (*e.g.*, taux de croissance, fécondité, fertilité)

Les résultats de ces expérimentations et les modèles de dynamique de population qui ont pu être paramétrés à partir de celles-ci seront présentés et discutés dans le **Chapitre IV**.





## CHAPITRE III

# Bioessais par encagement et modélisation de l'influence des facteurs environnementaux chez *Gammarus fossarum*

Dans le cadre du développement de biotests *in situ* avec *G. fossarum*, nous nous sommes intéressés durant ce travail de thèse à l'influence des facteurs environnementaux (température et conductivité de l'eau) sur trois bioessais couramment utilisés pour l'évaluation *in situ* de la toxicité des milieux aquatiques : la mesure du **taux d'alimentation**, du **taux de croissance** et de **la reproduction**. Les protocoles des différentes expérimentations ont été décrits dans la deuxième partie du **Chapitre II**.

Dans le présent chapitre, nous justifierons le choix des trois traits de vie que nous avons utilisés en insistant sur la pertinence de leur utilisation avec *G. fossarum* et sur les facteurs de confusion qui influent sur ceux-ci.

Ensuite, nous présenterons l'approche que nous avons mise en place pour modéliser l'influence des facteurs de confusion et nous illustrerons *via* des cas d'étude les apports de notre méthodologie pour l'interprétation de ces bioessais lors de leur utilisation sur le terrain.



## 1 Introduction

### 1.1 Contexte général

Comme nous l'avons souligné dans le premier chapitre de ce manuscrit, les bioessais individuels sub-létaux représentent des outils très prometteurs pour les démarches de surveillance de la qualité des milieux aquatiques. En effet, ils sont à la fois :

- pertinents d'un point de vue écologique car ils sont soit en lien direct avec la fitness des organismes (*e.g.*, taux de croissance, activité de reproduction), soit ils peuvent être facilement reliés à ces marqueurs de fitness (*e.g.*, marqueur comportementaux).
- sensibles et spécifiques aux effets toxiques des contaminants. Ils représentent donc des indicateurs précoces des impacts de l'exposition à des contaminants (Maltby et al. 2002). Ainsi, contrairement à l'étude des altérations de la structure et du fonctionnement à des niveaux d'organisation supérieurs (*e.g.* population, communauté), ils permettent de détecter les effets d'une contamination relativement rapidement (heures, jours) (Damásio et al. 2008).
- les effets observés sur les traits de vie peuvent être intégrés dans des modèles de dynamique de population afin d'être extrapolés au niveau populationnel (Baird et al. 2007a ; Forbes et al. 2008).

Cependant, bien que les réponses individuelles soient utilisées relativement fréquemment dans les démarches prédictives au laboratoire, leur utilisation dans les démarches de diagnostic de la qualité des milieux aquatiques est beaucoup plus rare. En effet, les traits de vie sont fortement influencés par des facteurs environnementaux et biotiques qui constituent des facteurs de confusion pour la lecture des effets toxiques des contaminants. Il est alors difficile de définir des gammes de valeurs de référence en absence de stress toxique et de les interpréter en conditions non contrôlées (Maltby et al. 2002 ; Brian et al. 2008 ; Hagger et al. 2008). Ainsi, les bioessais *in situ* se sont jusqu'à présent généralement limités à des comparaisons entre des stations proches, en amont et en aval d'une source de contamination (*e.g.*, effluents de station d'épuration, rejets industriels). Ces études font alors l'hypothèse que la seule différence entre les sites réside dans leur niveau de contamination.

Pour palier l'influence des facteurs biotiques, les méthodologies d'encagements d'organismes calibrés représentent des outils intéressants. En effet, elles permettent de s'affranchir de l'influence de ces facteurs, qu'ils soient d'origine physiologique (*e.g.*, sexe, taille, état reproducteur) ou écologique (*e.g.*, prédation, compétition), tout en offrant des conditions d'exposition réalistes en contact direct avec la, ou les, source de contamination (Crane et al. 2007 ; Liber et al. 2007). Ainsi, des protocoles ont été proposés pour de nombreuses espèces (mollusques, crustacés, poisson, insectes) dont les *Gammaridae* (Maltby et al. 1990b ; Maltby et al. 2002) et le mollusque *Potamopyrgus antipodarum* (Schmitt et al. 2010).

Cependant, pour utiliser ces bioessais sur le terrain, il est également nécessaire de tenir compte de l'influence des facteurs abiotiques qui ne peuvent par définition pas être contrôlés lors des expositions *in situ*. Cette prise en compte des facteurs abiotiques est souvent difficile à mettre en œuvre ce qui explique pourquoi les applications *in situ* de ces bioessais sont encore rares. Une approche possible consiste à modéliser l'impact de ces facteurs (*e.g.*, température, pH, conductivité de l'eau) afin de définir des gammes de valeurs de réponses en absence de stress toxique indépendantes des facteurs environnementaux et rendre ainsi les mesures comparables dans le temps et l'espace (Maltby et al. 2002 ; Moreira et al. 2006 ; Hanson et al. 2010 ; Krell et al. 2011). Durant ce travail, c'est l'approche que nous avons choisie de mettre en œuvre pour trois bioessais individuels : les mesures du **taux d'alimentation**, du **taux de croissance** et de la **reproduction** chez une espèce sentinelle couramment utilisée en écotoxicologie : le gammare *Gammarus fossarum*. Pour des raisons de temps mais aussi à cause du plus faible degré d'avancement dans le développement de ces bioessais chez *Potamopyrgus antipodarum* au laboratoire d'écotoxicologie de l'IRSTEA de Lyon, nous avons fait le choix pour cette partie de ne nous intéresser qu'à une seule des deux espèces utilisées dans ce travail.

Ces trois traits de vie ont déjà été utilisés chez plusieurs espèces d'amphipodes, principalement au laboratoire (*cf.* **Tableau II-2**). Ils sont connus comme étant sensibles à une large gamme de contaminants tout en étant influencés par des facteurs environnementaux ce qui limite encore fortement leur utilisation *in situ*. Ils constituent ainsi des marqueurs très intéressants dans ce contexte afin de tester la pertinence de ce type d'approche pour permettre l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques sur de larges échelles spatiales et temporelles.

## 1.2 Choix des traits de vie

### 1.2.1 Taux d'alimentation

Depuis les années 1990, plusieurs études au laboratoire ont montré que le taux d'alimentation de plusieurs espèces d'amphipodes, et particulièrement les gammares, pouvait être inhibé par une large gamme de contaminants tels que des métaux lourds, des insecticides, des fongicides, des herbicides, des médicaments ou encore certains composés organiques (*cf.* **Tableau II-2**). L'inhibition de l'alimentation représente dans beaucoup de cas l'une des premières réponses observées lors de l'exposition à un facteur de stress toxique et constitue donc un marqueur très précoce (McLoughlin et al. 2000 ; Macedo-Sousa et al. 2007). De plus, étudier les effets des contaminants sur le comportement alimentaire est particulièrement intéressant d'un point de vue écologique car bien qu'il ne représente pas en lui-même un trait de fitness des organismes, il est possible d'établir des liens mécanistes entre le taux d'alimentation et des traits de vie tels que la croissance, la survie ou la reproduction (Maltby 1999 ; Pestana et al. 2007 ; Alonso et al. 2009 ; Xuereb et al. 2009b ; Geffard et al. 2010).

De plus, la mesure du taux d'alimentation, en particulier sur les amphipodes, est également pertinente pour des études *in situ*. En effet, les gammares sont des espèces sentinelles qui jouent un rôle clé dans les processus de décomposition de la matière organique et des études ont montré qu'une inhibition de l'alimentation chez ces espèces avait pour conséquence une diminution de la vitesse de décomposition de la matière organique (Forrow and Maltby 2000). Cette mesure peut alors être considérée comme un indicateur du bon fonctionnement global de l'écosystème.

Plusieurs études ont montré que le taux d'alimentation était un marqueur relativement sensible *in situ* dans de nombreux contextes environnementaux (*cf.* **Tableau II-2**). Cependant, la lecture du taux d'alimentation *in situ* est complexe. En effet, il peut être influencé par les contaminations mais aussi par plusieurs facteurs de confusion biotiques et abiotiques qu'il est donc nécessaire de caractériser et de prendre en compte pour une lecture pertinente des tests. Plusieurs facteurs biotiques ont été décrits chez le gammare comme ayant une influence sur le taux d'alimentation. Nous pouvons notamment citer des variations entre populations (Veerasingham and Crane 1992 ; Maltby and Crane 1994 ; Crane et al. 1995), une influence de la taille des organismes (Nilsson 1974) ou encore du parasitisme qui peut être assez fréquent dans les populations de gammares (McCahon et al. 1988 ; Pascoe et al. 1995 ; Fielding et al. 2003 ;

Lettini and Sukhdeo 2010). Concernant les facteurs abiotiques, la teneur en oxygène dissous (Maltby et al. 1990a), le pH (Naylor et al. 1989), la température de l'eau (Maltby et al. 1990b ; Maltby et al. 2002) ou encore la conductivité de l'eau (Maltby et al. 2002) ont été identifiés comme pouvant influencer significativement le taux d'alimentation. Maltby et al. (2002) ont ainsi souligné que la température et la conductivité de l'eau étaient les deux principaux facteurs environnementaux influençant le taux d'alimentation, ce qui justifie que nous ayons choisi de nous focaliser sur ces deux facteurs dans ce travail.

### 1.2.2 Reproduction

Geffard et al. (2010) ont récemment proposé un test de reprotoxicité avec *G. fossarum* au laboratoire. Plusieurs études au laboratoire ont déjà montré que la reproduction des gammares pouvait être perturbée par divers contaminants (Arthur 1970 ; Nebeker et al. 1989 ; Maltby and Naylor 1990 ; Watts et al. 2001 ; Cold and Forbes 2004 ; Prenter et al. 2004 ; Costa et al. 2005 ; Korpinen et al. 2006 ; Dietrich et al. 2010 ; Mazurová et al. 2010 ; Lacaze et al. 2011c). Par exemple, Cold and Forbes (2004) montrent un impact significatif de pics de différentes concentrations d'un pesticide (l'esfenvalerate) sur le nombre de juvéniles produits par femelle dans des conditions contrôlées au laboratoire. Lacaze et al. (2011c) observent également un impact significatif d'un génotoxique modèle, le MMS, sur le nombre d'embryons par femelle ainsi qu'une augmentation du pourcentage d'embryons anormaux chez les femelles exposées.

Cependant, les études *in situ* sont beaucoup plus rares (Gerhardt et al. 1998 ; Gross et al. 2001 ; Schirling et al. 2005). En effet, plusieurs travaux ont souligné le fait que la reproduction chez les crustacés pouvait être fortement influencée par des facteurs environnementaux tels que la température (Pöckl and Timischl 1990 ; Pöckl 1992 ; 1995 ; Pöckl et al. 2003) ou la conductivité de l'eau (Martin 1965 ; Meyran 1997 ; Rukke 2002 ; Lasier et al. 2006 ; Muysen et al. 2009 ; Kestrup and Ricciardi 2010). La modélisation de l'influence de ces deux facteurs sur les marqueurs choisis pour caractériser la reproduction lors de ces bioessais pourrait ainsi permettre de proposer ce test pour une utilisation *in situ* large échelle.

### 1.2.3 Taux de croissance

Enfin, bien qu'il soit beaucoup moins étudié que la reproduction ou la survie, la croissance représente un trait de vie très pertinent d'un point de vue écologique étant donné qu'il est en lien direct avec la fitness des organismes. De plus, la croissance est un paramètre d'entrée important pour les modèles de dynamique de population structurés en classe de taille et représente donc un marqueur très intéressant pour les problématiques de changement d'échelle et donc pour l'interprétation des effets au niveau populationnel.

Quelques études ont montré que la croissance des gammares pouvait être inhibée en présence de contaminants tels que des surcharges en nitrates liées à l'utilisation d'engrais chimiques (Stelzer and Joachim 2009) ou la 3,4 dichloroaniline (molécule utilisée dans la fabrication de certains herbicides) (Taylor et al. 1994). Brown et al. (1999) observent également une diminution du taux de croissance individuel lors de l'exposition à différentes concentrations de 4-nonylphenol chez l'amphipode *Corophium volutator*. Haeba et al. (2008) concluent dans une étude récente sur *Daphnia magna* à un impact significatif de l'exposition à un composé reconnu comme perturbateur endocrinien chez les vertébrés : le flutamide.

Cependant, de la même façon que pour les deux autres marqueurs, l'utilisation de la mesure du taux de croissance *in situ* est encore très limitée en raison de l'influence des facteurs de confusion. En effet, la croissance chez les crustacés est influencée par de nombreux facteurs abiotiques tels que la température (Pöckl 1992 ; 1995 ; Neuparth et al. 2002), la conductivité de l'eau (Kestrup and Ricciardi 2010), le pH (Hargeby and Petersen Jr 1988) ou encore la salinité (Prato et al. 2008).

### 1.3 Démarche

Afin de modéliser et de prendre en compte l'influence des facteurs de confusion pour la lecture des bioessais *in situ*, nous avons mis en place une démarche en trois étapes :

1- Dans un premier temps, nous avons étudié et modélisé, en conditions contrôlées, l'influence de deux facteurs de confusion abiotiques (la température et la conductivité) et de deux facteurs de confusion biotiques (la taille et le stade de mue) sur des organismes calibrés provenant d'une population sur la Bourbre et classiquement utilisés lors des bioessais au laboratoire ou sur le terrain par le laboratoire d'écotoxicologie de l'IRSTEA. Nous avons sélectionné ces facteurs à



partir d'une étude bibliographique sur les traits de vie étudiés dans ce travail : le taux d'alimentation, le taux de croissance et la reproduction (*cf.* paragraphe 1.2). Nous n'avons pas étudié tous les facteurs de confusion possibles, nous nous sommes focalisés sur ceux qui nous ont semblé le plus pertinent par rapport aux conditions environnementales rencontrées dans la région Rhône-Alpes. Ainsi, dans d'autres situations, il aurait été important de considérer des facteurs de confusion supplémentaires tels que la salinité en milieu marin ou saumâtre ou encore le pH dans des zones où l'on retrouve de fortes variations de ce paramètre dans les cours d'eau et dont la prise en compte se serait alors révélée importante. Ou encore, si notre objectif avait été d'évaluer précisément les effets sur les organismes et les communautés en place, il aurait alors été nécessaire de nous intéresser à l'influence d'autres facteurs de confusion tels que le parasitisme ou l'adaptation locale des populations. Mais dans ce travail, notre objectif est de développer une méthodologie qui nous permette de rendre comparable les réponses observées sur ces traits de vie à partir d'organismes calibrés lors de la comparaison de différents sites sur une large échelle spatiale et temporelle afin de mesurer de manière fiable la toxicité des milieux aquatiques et non pas d'évaluer les impacts sur les organismes autochtones.

2- Ensuite, nous avons cherché à valider la capacité de nos modèles à corriger les variations spatiales et temporelles des différents traits de vie. Pour ce faire, nous avons réalisé des encagements *in situ*, par la transplantation d'organismes calibrés provenant de la Bourbre, dans des sites de références très peu contaminés à différentes saisons et présentant de fortes variations de conditions physico-chimiques. Nous avons alors voulu d'une part vérifier que les facteurs environnementaux testés (*e.g.*, la température et la conductivité) étaient bien les deux principaux facteurs de confusion responsables de la variabilité des traits de vie et d'autre part définir des gammes de réponses en absence de facteurs de stress toxique tenant compte des variations environnementales.

3- Enfin, nous avons réalisé des encagements *in situ* dans des sites à fort risque de contamination et présentant des variations importantes des paramètres physico-chimiques ainsi que des profils de contaminations variés afin de tester la sensibilité des différents tests ainsi que les apports de la modélisation pour l'interprétation des bioessais *in situ*. Pour ce faire, nous avons également réinterprété des études antérieures réalisées par le laboratoire d'écotoxicologie de l'IRSTEA lors de comparaisons amont – aval sans prise en compte de l'influence des facteurs de confusion.

Durant ce travail doctoral, nous avons pu réaliser ces trois étapes pour l'étude du taux d'alimentation (Coulaud et al. 2011 ; **Annexe 1**). Concernant l'étude du taux de croissance et de la reproduction, la première étape a été réalisée entièrement (Chaumot et al. in prep) et la deuxième étape a été réalisée sur un petit nombre de sites de référence. Des études à plus large échelle spatiale et temporelle restant à faire, ainsi que des encagements dans des sites potentiellement contaminés même si des premiers essais ont déjà été réalisés (Jubeaux et al. in prep).

## 2 Résultats

2.1 Etape 1 : Modélisation de l'impact de la température et de la conductivité de l'eau au laboratoire sur les marqueurs individuels mesurés sur des organismes acclimatés au laboratoire et issus d'une même population sur la Bourbre

### 2.1.1 Mesure du taux d'alimentation

Dans un premier temps, nous avons regardé l'influence de la taille sur le taux d'alimentation en comparant les taux d'alimentation d'organismes de trois classes de taille différentes : 7,3 (0,6) ; 10,6 (0,9) ; 12,8 (0,9). Nous avons décidé de nous intéresser uniquement à l'étude d'adultes, d'une part pour être cohérent avec les précédents travaux réalisés sur le taux d'alimentation dans notre laboratoire (Dedourge-Geffard et al. 2009 ; Geffard et al. 2010) et d'autre part car l'utilisation des juvéniles n'aurait pas été pertinente étant donné que leur régime alimentaire est différent de celui des adultes (*e.g.*, fèces) et qu'un biotest basé uniquement sur la consommation de feuilles n'est donc pas approprié.

Nous observons une augmentation significative de la taille sur le taux d'alimentation (**Figure III-1 A**) et aucune différence entre les deux semaines d'exposition (ANOVA, interaction :  $p = 0,53$  ; effet taille :  $p < 10^{-14}$  ; effet semaine :  $p = 0,68$ ). Ainsi, les organismes de la plus grande classe de taille ont en moyenne un taux d'alimentation trois fois plus élevé que ceux de la plus petite classe.

Par la suite, afin de nous affranchir de l'influence de la taille sur le taux d'alimentation des gammarès, nous avons utilisé des mâles de taille homogène : 10,6 (0,9) mm correspondant à la deuxième classe de taille utilisée précédemment. Ce choix se justifiait par le fait que cette classe de taille est la plus abondante dans la population de la Bourbre d'où sont issus les organismes et que cela permet alors de prélever des organismes facilement toute l'année pour la mise en place d'expérimentations au laboratoire ou de campagnes d'encagements sur le terrain. Ainsi, lors de l'étude de l'influence de la température et de la conductivité au laboratoire puis lors des différentes campagnes d'encagements *in situ* que nous avons réalisé, nous avons toujours utilisé le même type d'organisme calibré : des mâles non parasités issus de la population de la Bourbre et mesurant environ 10 mm afin de diminuer au maximum la variabilité liée à l'influence des facteurs biotiques physiologiques.

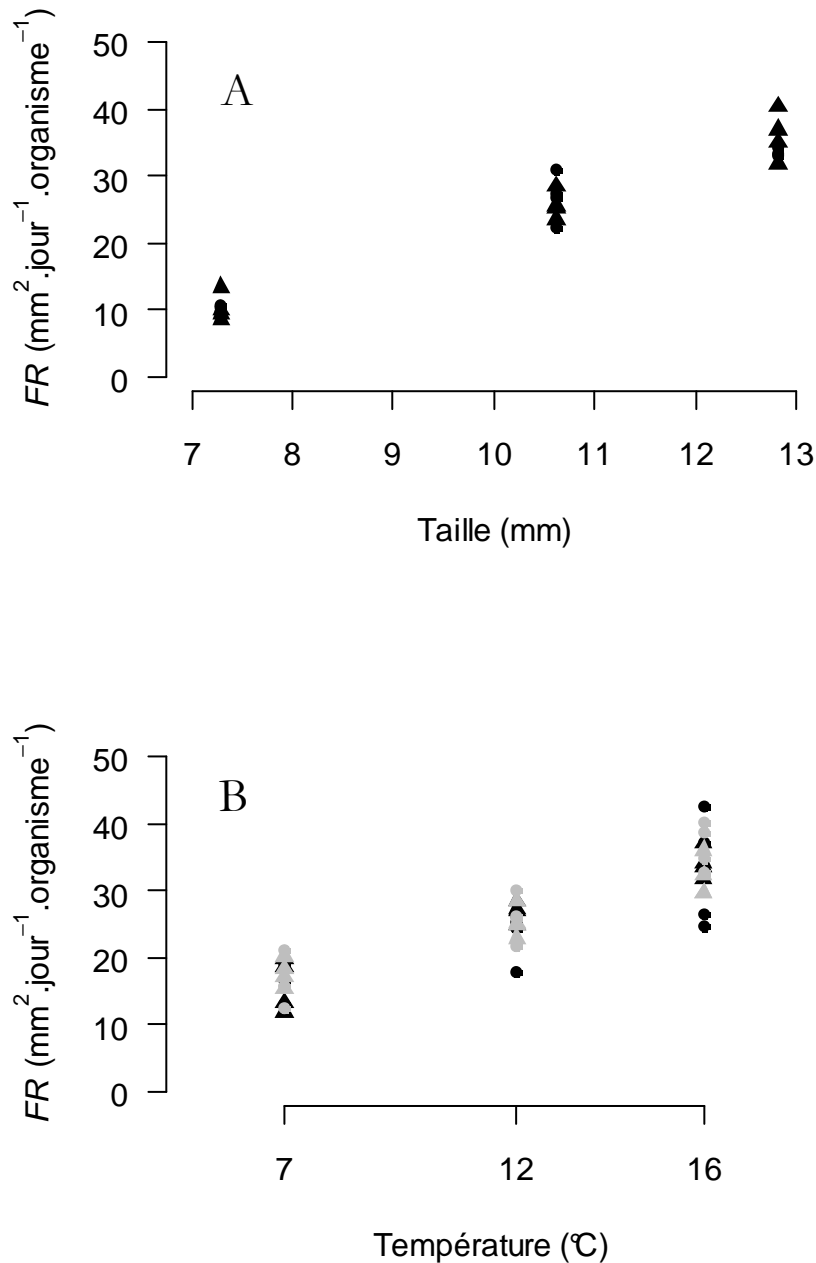


Figure III-1 : Influence de la taille, de la température et de la conductivité sur le taux d'alimentation (*FR*) de *G. fossarum* au laboratoire.

(A) *FR* (mm<sup>2</sup>.jour<sup>-1</sup>.organisme<sup>-1</sup>) pour les trois classes de taille : 7,3 (0,6) ; 10,6 (0,9) ; 12,8 (0,9) mm. (B) *FR* (mm<sup>2</sup>.jour<sup>-1</sup>.organisme<sup>-1</sup>) pour les trois températures : 7,0 (0,05) °C ; 12,1 (0,01) °C et 16,4 (0,3) °C et les deux conductivités : 200 (50) µS.cm<sup>-1</sup> en noir et 600 (50) µS.cm<sup>-1</sup> en gris. Les cercles correspondent à la première semaine d'expériences et les triangles à la deuxième.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'influence de la température et de la conductivité sur le taux d'alimentation en considérant trois températures : 7,0 (0,05) °C ; 12,1 (0,01) °C et 16,4 (0,3) °C et deux conductivités : 200 (50) µS.cm<sup>-1</sup> et 600 (50) µS.cm<sup>-1</sup>. Nous n'observons d'effet ni de la conductivité ni de la semaine d'exposition sur le taux d'alimentation

de *G. fossarum* (ANOVA, termes d'interactions :  $p > 0,1$  ; effet semaine :  $p = 0,99$  ; effet conductivité :  $p = 0,8$ ) (**Figure III-1 B**). En revanche, nous remarquons une augmentation significative du taux d'alimentation en fonction de la température (ANOVA,  $p < 10^{-15}$ ).

Ainsi, pour un mâle de  $10,6 \pm 0,9$  mm, nous pouvons définir une relation linéaire entre le taux d'alimentation ( $FR_{pred}$ ,  $\text{mm}^2 \cdot \text{jour}^{-1} \cdot \text{individu}^{-1}$ ) et la température ( $\Theta$ , °C) qui explique 79 % de la variabilité observée :

$$FR_{pred} = 1,85 (0,13) \Theta + 3,14 (1,75) \quad (r^2 = 0,79) \quad \text{Eq III-1}$$

Pour une augmentation de température de 1°C, nous pouvons ainsi prédire une augmentation moyenne de l'activité alimentaire de  $1,85 \text{ mm}^2 \cdot \text{jour}^{-1} \cdot \text{individu}^{-1}$ , soit par exemple entre 12 et 13 °C une augmentation de 7,3 % en moyenne du taux d'alimentation (**Eq III-1**).

### 2.1.2 Reproduction

De la même manière que pour l'étude du taux d'alimentation, nous nous sommes intéressés à l'influence de la température et de la conductivité sur la reproduction de *G. fossarum*. Le cycle de reproduction de *G. fossarum* a été décrit par Geffard et al. (2010) et nous avons choisi de nous intéresser à différents marqueurs proposés par cette étude : **le cycle de mue, la fertilité et la fécondité**.

Le cycle de reproduction chez les crustacés amphipodes est fortement corrélé au cycle de mue (Geffard et al. 2010). En effet, la femelle se reproduit au moment de chaque épisode de mue en libérant dans le milieu les embryons stockés dans son marsupium et qui sont arrivés à maturité puis en procédant à la ponte, dans le marsupium, des oeufs qui viennent d'être fécondés par le mâle. Ainsi, la fréquence entre deux épisodes de reproduction est contrainte par la fréquence des mues, étant donné qu'il s'agit de la seule période où le mâle peut féconder les ovocytes de la femelle. Nous avons donc dans un premier temps étudié l'influence des facteurs environnementaux sur la durée du **cycle de mue**.

Ensuite, nous avons analysé pour la **fertilité** (nombre d'ovocytes) et la **fécondité** (nombre d'embryons) l'influence conjointe des facteurs environnementaux et du cycle de reproduction. Nous avons testé trois températures : 7,0 (0,05) °C ; 12,1 (0,01) °C et 16,4 (0,3) °C

et deux conductivités : 200 (50)  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  et 600 (50)  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Notre protocole expérimental (*cf.* **Chapitre II**) nous a permis de suivre en continu (tous les 1,5 jours pour 16°C, 2 jours à 12°C et 3 jours à 7°C) ces différents paramètres sur un cycle de reproduction complet en analysant six femelles à chaque pas de temps. Un total de 695 femelles a ainsi été analysé.

### 2.1.2.1 Cycle de mue

Six stades de mue successifs composent le cycle de mue chez *G. fossarum* (Geffard et al. 2010) (*cf.* **Chapitre II**). Cependant, le premier stade de mue (stade A) étant très court, il n'a pas pu être observé durant nos expériences. De ce fait, seuls les stades B, C1, C2, D1 et D2 ont été étudiés. Le passage d'un stade à un autre n'étant pas un processus continu mais de type « tout ou rien » (par exemple, soit l'individu est encore dans le stade C1, soit il est passé au stade suivant), les modèles linéaires classiques n'étaient pas appropriés pour analyser ces données et nous avons donc choisi d'utiliser des modèles linéaires généralisés (Nelder and Wedderburn 1972) (fonction *glm* sous R).

#### Note :

Le modèle linéaire généralisé est une extension du modèle linéaire classique pour lequel le modèle d'erreur n'est plus gaussien. Comme pour les modèles linéaires classiques, les variables explicatives sont sous la forme d'une combinaison linéaire avec différentes variables explicatives et éventuellement des interactions mais la variable à expliquer peut suivre dans ce cas différentes lois de probabilité. Ainsi dans notre étude, nous avons utilisé un modèle linéaire généralisé logistique avec une loi de probabilité de Bernoulli (**Eq III-2**) :

$$\log \frac{p}{1-p} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_k X_k + \varepsilon \quad \text{Eq III-2}$$

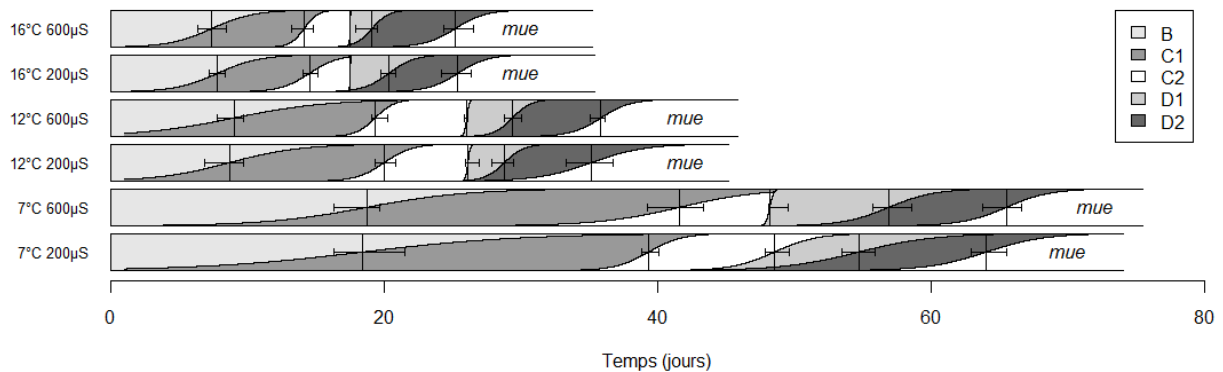
où  $p$  représente la probabilité de passer d'un état au suivant (*e.g.*, dans notre cas  $p$  correspond à la probabilité d'avoir dépasser un stade de mue donné),  $X_k$  les différentes variables explicatives (*e.g.*, dans notre cas le temps, la température et la conductivité),  $\beta_k$  les coefficients du modèle linéaire généralisé et  $\varepsilon$  le modèle d'erreur.

Avec ces modèles, nous avons pu prédire la probabilité de passage d'un stade de mue à un autre indépendamment pour chacune des six conditions testées en ajustant un modèle linéaire généralisé pour chaque stade et chaque condition (**Eq III-3 ; Figure III-2**) :

$$\log \frac{p}{1-p} = \beta_0 + \beta_1 t \quad \text{Eq III-3}$$

où  $p$  correspond à la probabilité d'avoir dépassé le stade de mue considéré,  $t$  au temps en jours,  $\beta_0$  et  $\beta_1$  aux coefficients estimés par le modèle linéaire généralisé.

Lorsque nous mettons bout à bout les différents stades de mue, nous pouvons reconstituer un cycle de mue (et donc un cycle de reproduction) complet (**Figure III-2**).



**Figure III-2 : Durée (jours) des différents stades du cycle de mue de *G. fossarum* pour les trois températures : 7,0 (0,05) °C ; 12,1 (0,01) °C et 16,4 (0,3) °C et les deux conductivités : 200 (50) µS.cm<sup>-1</sup> et 600 (50) µS.cm<sup>-1</sup> du début du cycle jusqu'à la mue, durée estimée avec un modèle par stade, par température et par conductivité.**

Nous avons estimé la durée moyenne de chaque stade (temps auquel correspond une probabilité  $p$  de 0,5, c'est-à-dire le temps pour lequel 50% des individus seront passés au stade suivant) et l'intervalle de confiance à 95 % autour de cette durée par *bootstrap* pour chacun des stades à partir de l'équation (**Eq III-4**) et la formule :

$$t_{50\%} = -\frac{\hat{\beta}_0}{\hat{\beta}_1} \quad \text{Eq III-4}$$

La durée de chacun des stades estimée par les modèles est résumée dans le **Tableau III-1**.

**Tableau III-1 : Durée moyenne de chacun des stades de mue de *G. fossarum* pour les différentes conditions estimée avec l'ajustement d'un modèle par condition expérimentale.**

Condition	Stade B	Stade C1	Stade C2	Stade D1	Stade D2
7°C ; 200 $\mu\text{S.cm}^{-1}$	<b>18.46</b> [15.26 - 21.55]	<b>20.90</b> [20.31 - 23.11]	<b>9.21</b> [7.59 - 10.34]	<b>6.16</b> [3.55 - 8.21]	<b>9.32</b> [7.62 - 11.03]
7°C ; 600 $\mu\text{S.cm}^{-1}$	<b>18.74</b> [16.25 - 20.95]	<b>22.85</b> [20.65 - 25.22]	<b>6.61</b> [6.34 - 7.93]	<b>8.70</b> [7.69 - 11.40]	<b>8.58</b> [7.10 - 9.78]
12°C ; 200 $\mu\text{S.cm}^{-1}$	<b>8.70</b> [7.37 - 10.24]	<b>11.31</b> [10.30 - 12.19]	<b>6.12</b> [5.95 - 6.98]	<b>2.67</b> [1.81 - 3.83]	<b>6.36</b> [4.38 - 8.58]
12°C ; 600 $\mu\text{S.cm}^{-1}$	<b>9.04</b> [7.63 - 10.91]	<b>10.31</b> [9.11 - 10.98]	<b>6.69</b> [6.52 - 7.64]	<b>3.34</b> [2.04 - 4.01]	<b>6.45</b> [5.24 - 8.18]
16°C ; 200 $\mu\text{S.cm}^{-1}$	<b>7.83</b> [6.71 - 8.93]	<b>6.72</b> [6.03 - 7.46]	<b>2.96</b> [2.93 - 2.98]	<b>2.84</b> [2.20 - 4.05]	<b>5.04</b> [3.66 - 6.17]
16°C ; 600 $\mu\text{S.cm}^{-1}$	<b>7.40</b> [6.21 - 8.44]	<b>6.75</b> [5.83 - 7.58]	<b>3.35</b> [3.32 - 3.37]	<b>1.63</b> [0.52 - 2.53]	<b>6.07</b> [4.39 - 7.57]

En considérant cette fois-ci l'ensemble des observations des six conditions, nous avons testé pour les cinq stades l'influence de la température et de la conductivité par des tests des modèles emboîtés (test du *Chi 2* sur les déviations) ainsi qu'avec la comparaison du critère d'information d'Akaike (AIC) de différents modèles testant les différentes hypothèses possibles pour chaque stade de mue :

- Modèle 1 : interaction temps \* température \* conductivité
- Modèle 2 : interaction temps \* température + conductivité
- Modèle 3 : interaction temps \* température
- Modèle 4 : temps + température
- Modèle 5 : temps

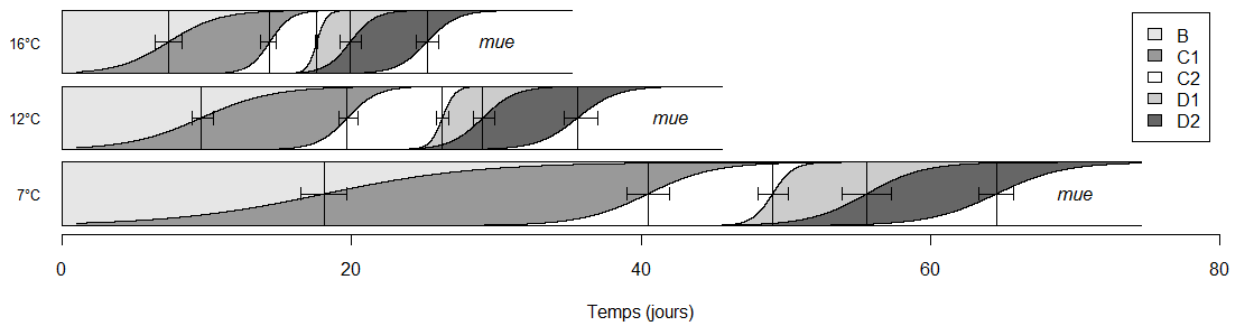
Pour chacun des stades, nous n'observons pas d'effet significatif de l'interaction entre température et conductivité (comparaison modèle 1 vs modèle 2) (pour le stade B :  $p = 0,51$  ; C1 :  $p = 0,26$  ; C2 :  $p = 0,17$  ; D1 :  $p = 0,07$  ; D2 :  $p = 0,68$ ), ni d'effet de la conductivité (comparaison modèle 3 vs modèle 2) (pour le stade B :  $p = 0,93$  ; C1 :  $p = 0,87$  ; C2 :  $p = 0,42$  ; D1 :  $p = 0,86$  ; D2 :  $p = 0,35$ ). En revanche, nous observons une influence significative de l'interaction entre le temps et la température pour chacun des stades (comparaison modèle 4 vs modèle 3) ( $p < 10^{-15}$



pour tous les stades). Le modèle 3 (interaction entre l'effet de la température et du temps, **Eq III-5**) a donc été choisi pour tous les stades de mue. Cette interaction traduit une augmentation de la durée de chacun des stades avec la diminution de la température ainsi qu'une augmentation de la variabilité du temps de passage entre les stades avec la diminution de la température. Nous avons alors pu regrouper nos observations pour les deux conductivités (**Figure III-3**).

$$\log \frac{p}{1-p} = \beta_0 + \beta_1 t + \beta_2 \Theta + \beta_3 t \Theta + \varepsilon \quad \text{Eq III-5}$$

où  $p$  correspond à la probabilité d'avoir dépassé le stade de mue considéré,  $t$  au temps en jours,  $\Theta$  à la température,  $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3$  aux coefficients du modèle linéaire généralisé à estimer pour chaque stade et  $\varepsilon$  au modèle d'erreur.

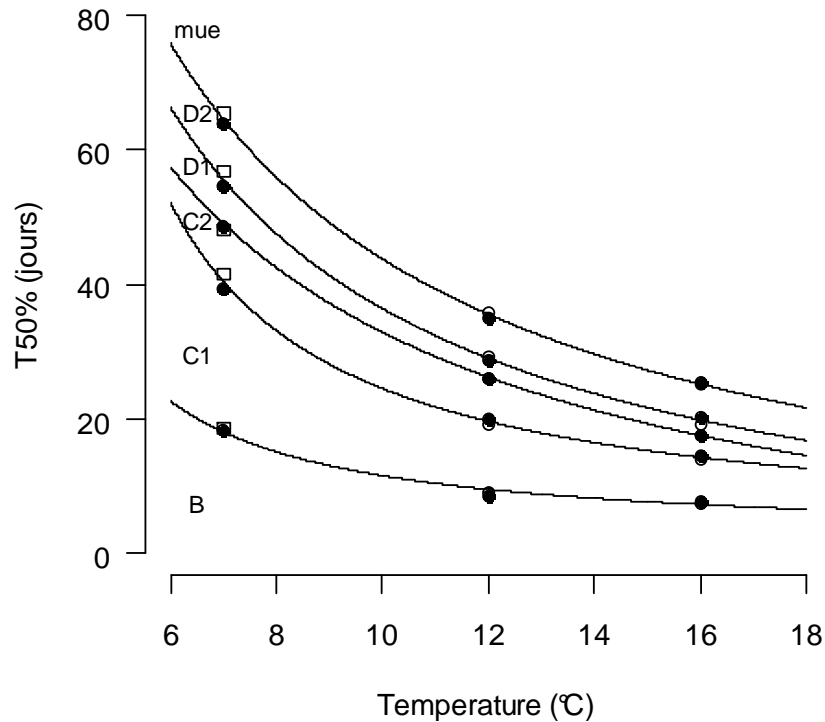


**Figure III-3 : Durée (jours) des différents stades du cycle de mue de *G. fossarum* pour les trois températures : 7,0 (0,05) °C ; 12,1 (0,01) °C et 16,4 (0,3) °C du début du cycle jusqu'à la mue estimées avec le modèle 3 (un modèle par stade et par température).**

Nous avons estimé la relation entre la température et la durée moyenne des différents stades (**Figure III-4**) à partir du modèle 3 (**Eq III-6**) avec la formule :

$$t_{50\%} = - \frac{(\hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_2 \Theta)}{(\hat{\beta}_1 + \hat{\beta}_3 \Theta)} \quad \text{Eq III-6}$$

où  $t_{50\%}$  correspond au temps (en jours) nécessaire pour le passage de 50% des individus d'un stade de mue à un autre,  $\hat{\beta}_1, \hat{\beta}_2, \hat{\beta}_3, \hat{\beta}_4$  aux coefficients des modèles linéaires généralisés pour chaque stade et  $\Theta$  à la température.



**Figure III-4 : Relation entre température (°C) et durée (jours) des différents stades du cycle de mue de *G. fossarum*.**

Les courbes correspondent à la relation entre température et durée des stades obtenue avec le modèle linéaire généralisé pour chacun des stades. Les carrés blancs correspondent aux observations pour la conductivité de 600 (50)  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  et les points noirs pour la conductivité de 200 (50)  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  pour les trois températures testées.

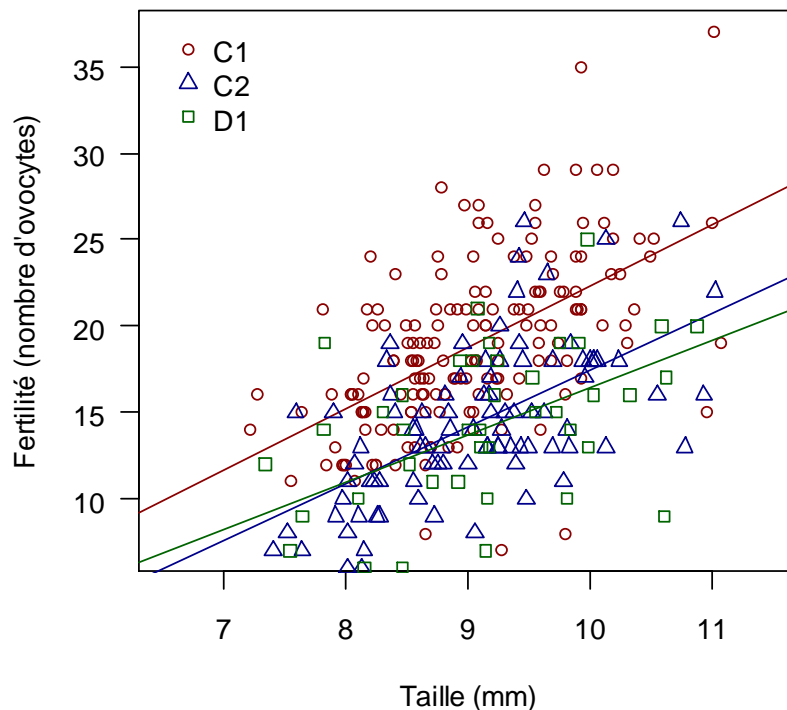
La courbe pour la fin du stade D2 (mue des femelles) peut être assimilée à une relation entre la température et la durée du cycle de reproduction (ou encore à la durée d'interponte) étant donné que les femelles se reproduisent entre chaque mue.

#### 2.1.2.2 Fertilité

Nous avons étudié l'influence du stade de mue, de la température, de la conductivité et de la taille des femelles sur le nombre d'ovocytes par femelle. Les femelles étant en couple au moment du lancement de l'expérimentation, il est en effet difficile de trier des organismes de taille homogène. Des différences de tailles relativement importantes ont ainsi été observées, les femelles mesurant entre 7 et 11 mm. Pour l'étude du cycle de mue, nous avons fait l'hypothèse que la taille n'influe pas sur la durée des différents stades. Concernant la fertilité, la taille est décrite comme ayant une influence majeure (Pöckl 1993 ; Geffard et al. 2010), nous en avons donc tenu compte dans nos analyses.

Nous n'avons pas pris en compte le nombre d'ovocytes pour les stades B (car ils sont souvent « blancs » et difficiles à compter) et D2 (car ils sont généralement très gros, en fin de vitellogenèse et donc difficiles à différencier les uns des autres pour le comptage). Seuls les stades C1, C2 et D1 ont donc été analysés.

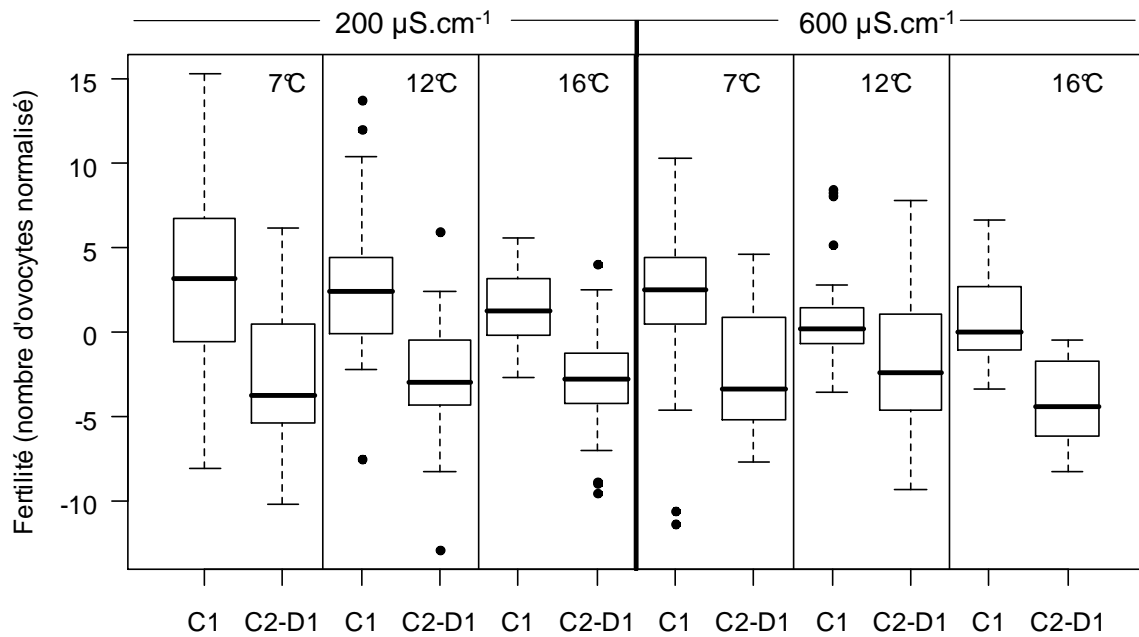
Nous observons un effet significatif de la taille et du stade mue (ANOVA, interaction :  $p = 0,55$  ; effet taille :  $p < 10^{-15}$  ; effet mue :  $p < 10^{-15}$ ) (**Figure III-5**) sur le nombre d'ovocytes. Lorsque nous réalisons la même analyse en comparant uniquement les stades C2 et D1, nous n'observons pas de différences significatives du nombre d'ovocytes entre les deux stades (ANOVA, interaction :  $p = 0,46$  ; effet taille :  $p = 3.10^{-13}$  ; effet mue :  $p = 0,45$ ). Nous avons donc regroupé les stades C2 et D1 pour la suite. Cette diminution du nombre d'ovocytes entre le stade C1 et les stades C2-D1 est cohérente avec les résultats observés par Geffard (Geffard et al. 2010). Ceci s'explique par un phénomène d'atrésie bien connu chez les *Gammaridae* qui se traduit, lors de l'entrée en vitellogenèse secondaire, par une perte d'ovocytes (*e.g.*, entre les stades C1 et C2 chez *G. fossarum*) (Schirling et al. 2006).



**Figure III-5 : Influence de la taille et du stade de mue sur le nombre d'ovocytes par femelle de *G. fossarum*.**

Les points rouges correspondent au stade de mue C1, les carrés verts au stade C2 et les triangles bleus au stade D1. Les droites de couleur correspondent à la régression linéaire entre la taille et le nombre d'ovocyte par femelle pour chacun des stades.

Afin de prendre en compte l'effet de la taille pour l'étude de l'influence de la température et de la conductivité, nous avons réalisé nos analyses sur les résidus du modèle linéaire entre le nombre d'ovocytes et la taille des femelles. Nous n'observons pas d'effet de la température ni de la conductivité que ce soit pour le stade C1 (ANOVA, interaction :  $p = 0,75$  ; effet température :  $p = 0,27$  ; effet conductivité :  $p = 0,08$ ) ou les stades C2-D1 (ANOVA, interaction :  $p = 0,42$  ; effet température :  $p = 27$  ; effet conductivité :  $p = 0,70$ ) (**Figure III-6**).



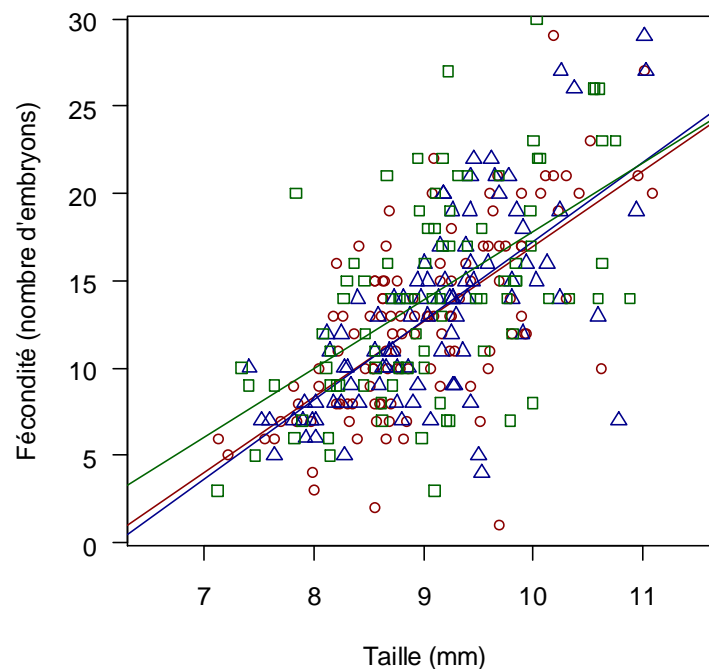
**Figure III-6 :** Influence de la température et de la conductivité sur le nombre d'ovocytes par femelle de *G. fossarum* normalisé par la taille des femelles (résidus du modèle linéaire entre le nombre d'ovocytes et la taille) pour les trois températures : 7,0 (0,05) °C ; 12,1 (0,01) °C et 16,4 (0,3) °C et les deux conductivités : 200 (50)  $\mu\text{S.cm}^{-1}$  et 600 (50)  $\mu\text{S.cm}^{-1}$ .

Les boîtes s'étendent du premier au troisième quartile de la distribution des mesures avec le trait noir qui correspond à la médiane. Les moustaches s'étendent jusqu'aux valeurs extrêmes des mesures ne dépassant pas 1,5 fois l'écart interquartile. Les points marginaux sortant de cette gamme sont représentés par des points noirs.

### 2.1.2.3 Fécondité

Cinq stades de développement embryonnaire ont été décrits chez *G. fossarum* (Geffard et al. 2010) (*cf.* **Chapitre II**). Ces stades de développement sont globalement synchronisés avec les stades de mue : le stade 1 en parallèle des stades de mue A et B, le stade 2 du stade de mue C1, le stade 3 du stade C2, le stade 4 du stade D1 et le stade 5 du stade D2. Les embryons de stade 1

étant très fragiles, leur comptage est peu précis car ils peuvent être perdus ou cassés lors de leur extraction du marsupium. Pour les embryons de stade 5, ils correspondent à des juvéniles viables et mobiles. Leur comptage est là aussi très délicat car il est fréquent que la femelle en libère une partie dans le milieu lors de sa manipulation. Nous n'avons donc pris en compte que les femelles dont les embryons étaient de stades 2, 3 ou 4. Nous avons regardé l'influence du stade embryonnaire, de la température, de la conductivité et de la taille des femelles sur le nombre d'embryons par femelle. La taille a en effet déjà été décrite comme ayant une influence importante sur le nombre d'embryons par femelle (Pöckl 1993 ; Geffard et al. 2010). Nous observons un effet significatif de la taille mais pas de différences entre les différents stades embryonnaires (ANOVA, interaction :  $p = 0,72$  ; effet taille :  $p < 10^{-15}$  ; effet stade embryonnaire :  $p = 0,11$ ) (**Figure III-7**).

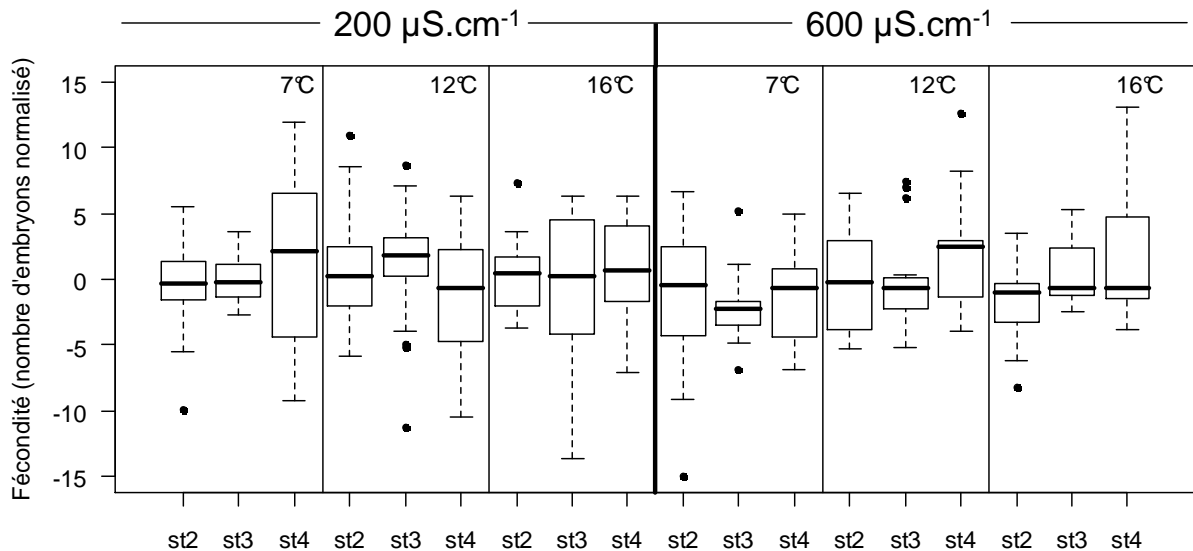


**Figure III-7 : Influence de la taille et du stade de développement sur le nombre d'embryons par femelle de *G. fossarum*.**

Les points rouges correspondent au stade embryonnaire 2, les carrés verts au stade embryonnaire 3 et les triangles bleus au stade embryonnaire 4. Les droites de couleur correspondent à la régression linéaire entre la taille et le nombre d'embryons par femelle pour chacun des stades.

Afin de prendre en compte l'influence de la taille lors de l'analyse de l'influence de la température et de la conductivité, nous avons procédé de la même façon que pour la fertilité en réalisant nos analyses sur les résidus du modèle linéaire entre le nombre d'embryons et la taille des femelles (**Figure III-8**). Nous n'observons pas d'effet de la température ni de la conductivité

sur le nombre d'embryons par femelle (ANOVA, effet température :  $p = 0,29$ ; effet conductivité :  $p = 0,18$ ; interaction :  $p = 0,30$ ).



**Figure III-8 : Influence de la température et de la conductivité sur le nombre d'embryons par femelle de *G. fossarum* normalisé par la taille des femelles (résidus du modèle linéaire entre le nombre d'ovocytes et la taille) pour les trois températures : 7,0 (0,05) °C ; 12,1 (0,01) °C et 16,4 (0,3) °C et les deux conductivités : 200 (50) µS.cm<sup>-1</sup> et 600 (50) µS.cm<sup>-1</sup>.**

Les boîtes s'étendent du premier au troisième quartile de la distribution des mesures avec le trait noir qui correspond à la médiane. Les moustaches s'étendent jusqu'aux valeurs extrêmes des mesures ne dépassant pas 1,5 fois l'écart interquartile. Les points marginaux sortant de cette gamme sont représentés par des points noirs.

### 2.1.3 Taux de croissance

L'expérimentation a été menée entre le 23 janvier et le 8 mars 2010. Nous avons considéré trois températures : 6,8 (0,03) °C ; 12,1 (0,2) °C et 16,1 (0,1) °C et deux conductivités 200 (50) et 600 (50) µS.cm<sup>-1</sup> constantes au cours du temps. Les deux classes de tailles correspondent à des organismes juvéniles n'ayant pas encore atteint la taille à la maturité sexuelle au départ de l'expérience. Elles ont été déterminées en fonction de l'abondance relative des différentes tailles d'organismes que nous avons récupéré lors du prélèvement et correspondent aux organismes classiquement utilisés pour les mesures du taux de croissance au laboratoire chez les gammares (Blockwell et al. 1996 ; Neuparth et al. 2002).

Nous n'avons pas mesuré la croissance sur des organismes adultes. En effet, la croissance des adultes étant beaucoup plus lente, surtout à faible température (Pöckl 1995), son étude ne représente donc pas un marqueur pertinent pour une utilisation sur le terrain, en particulier lors des saisons froides où il faudrait réaliser des expérimentations trop longues pour pouvoir mesurer un gain de taille suffisant des organismes. De plus, les juvéniles sont généralement décrits comme étant plus sensibles que les adultes à l'exposition aux contaminants, notamment chez les gammarus (Blockwell et al. 1996) ; la mesure du taux de croissance sur des organismes juvéniles représente ainsi un marqueur plus pertinent que la mesure sur des adultes.

Les organismes des deux classes de taille étaient mesurés après 0, 14, 32 et 46 jours d'exposition (**Figure III-9**). En raison d'un trop grand taux de mortalité, les données à 16,1 °C – 200  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  n'ont pas été prises en compte. Bien que cela ne concerne que peu d'individus, lorsque des organismes étaient devenus matures sexuellement au cours de l'expérience, ils étaient également sexés au moment de leur mesure. En effet, les mâles et les femelles présentent des taux de croissance différents chez *Gammarus fossarum* (Pöckl 1995). Ceci s'explique par le fait que, chez les femelles, la vitesse de croissance est contrainte par le temps nécessaire au développement des embryons, étant donné que la durée d'intermue est fortement corrélée au cycle de reproduction. Nous avons jugé pertinent de retirer les femelles afin d'éviter un biais lié au sexe des organismes et n'avons conservé que les mâles pour les analyses.

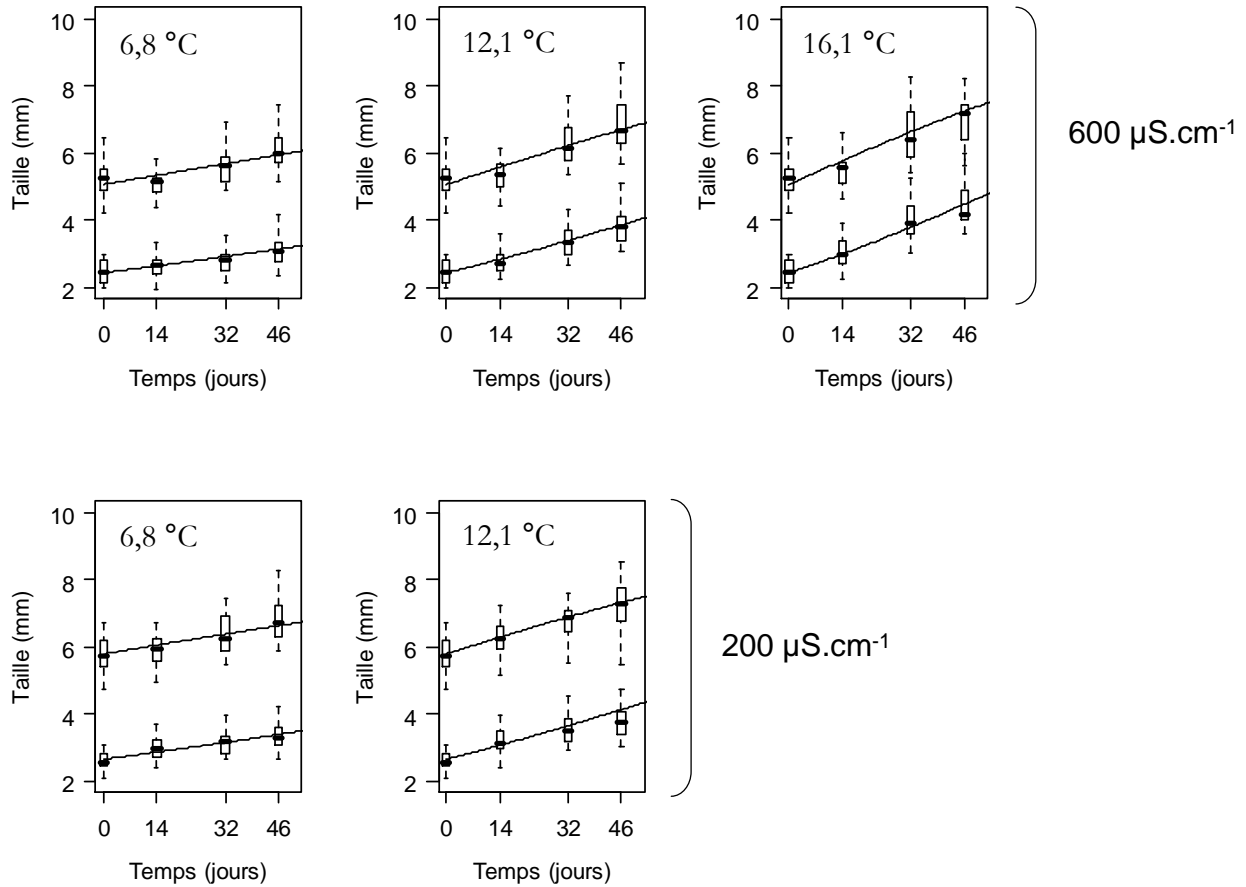
Nous avons modélisé la croissance par régression non linéaire avec un modèle logistique. En effet, Pöckl (1995) dans une étude sur la croissance de différentes espèces d'amphipodes montre que le modèle logistique (**Eq III-7**) est bien adapté pour l'étude de la croissance chez les *Gammaridae*. Ces analyses ont été réalisées dans le cadre du stage de master 1 d'Amandine Coquillat. Pour cela, nous avons utilisé la fonction *nls* de R.

$$L(t) = \frac{L_{max}}{1 + \left( \frac{L_{max}}{L_{init}} - 1 \right) e^{(-r \cdot t)}} \quad \text{Eq III-7}$$

où  $L(t)$  correspond à la taille des individus au cours du temps en mm,  $L_{max}$  à la taille maximale des individus en mm,  $L_{init}$  à la taille initiale des organismes de chaque classe en mm,  $r$  au taux de croissance individuel en  $\text{mm}\cdot\text{jour}^{-1}$  et  $t$  au temps en jours.

Concernant la taille maximale des organismes  $L_{max}$ , nous avons fait l'hypothèse qu'elle était indépendante de la température et de la conductivité et nous l'avons fixée dans le modèle à

une valeur de 10,2 mm. En effet, la population de gammares de la Bourbre, dont sont issus les organismes, est étudiée dans le cadre d'un suivi démographique et nous avons pu estimer précisément cette taille maximale qui s'est révélée constante au cours de l'année.



**Figure III-9 : Evolution de la taille (en mm) des deux classes de *G. fossarum* pour les trois températures : 6,8 (0,03) °C ; 12,1 (0,2) °C et 16,1 (0,1) °C et les deux conductivités au cours des 46 jours d'exposition.**

Les boîtes s'étendent du premier au troisième quartile de la distribution des mesures avec le trait noir qui correspond à la médiane. Les moustaches s'étendent jusqu'aux valeurs extrêmes des mesures ne dépassant pas 1,5 fois l'écart interquartile. Les courbes correspondent aux prédictions du modèle logistique (Eq III-7).

Afin de tester l'influence de la température et de la conductivité, nous avons comparé différents modèles avec des tests des modèles emboîtés et la comparaison du critère d'information d'Akaike (*AIC*) de chaque modèle.



Les différents modèles testés étaient :

- Modèle 1 : effet température + conductivité
- Modèle 2 : effet de la température uniquement
- Modèle 3 : effet de la conductivité uniquement
- Modèle 4 : aucun effet

En comparant les différents modèles, nous trouvons un effet significatif de la température (modèle 1 vs modèle 3,  $p < 10^{-15}$ ) mais pas de la conductivité (modèle 1 vs modèle 2,  $p = 0,17$ ). Le choix du modèle tenant compte uniquement de l'effet de la température est également pertinent au regard des différents *AIC*.

Pöckl (1995) observe une relation linéaire entre le taux de croissance et la température chez différentes espèces de *Gammaridae*. Nous avons alors intégré cet effet de la température dans le modèle logistique sous la forme d'une relation linéaire entre le taux de croissance individuel  $r$  et la température  $\Theta$  (**Eq III-8**)

$$L(t) = L_{max} / \left( 1 + \left( \frac{L_{max}}{L_{init}} - 1 \right) e^{-(\beta_1 \Theta + \beta_0) t} \right) \quad \text{Eq III-8}$$

où  $L(t)$  correspond à la taille des individus au cours du temps en mm,  $L_{max}$  à la taille maximale des individus en mm (fixée à 10,2 mm),  $L_{init}$  à la taille initiale des organismes de chaque classe en mm,  $t$  au temps,  $\Theta$  à la température de l'eau et  $\beta_0$  et  $\beta_1$  aux paramètres de la relation linéaire entre le taux de croissance  $r$  et la température  $\Theta$ .

Nous pouvons ainsi estimer les paramètres  $\beta_0$  et  $\beta_1$  de la relation linéaire entre le taux de croissance individuel ( $r$ , mm.jour<sup>-1</sup>.individu<sup>-1</sup>) et la température ( $\Theta$ , °C). Nous obtenons la relation (**Eq III-9**):

$$r = 0,00136 (0,0007) \Theta - 0,00210 (0,00078) \quad \text{Eq III-9}$$

Les prédictions du modèle pour les différentes températures testées en utilisant cette relation s'ajustent bien à nos mesures (**Figure III-9**) ce qui renforce l'hypothèse d'une influence significative de la température sur le taux de croissance, sans effet de la conductivité.

### Synthèse :

Influence des facteurs de confusion sur la mesure de marqueurs individuels chez *G. fossarum* issus de la Bourbre

#### Taux d'alimentation

- Influence significative de la **taille**
- Influence significative de la **température**
- Pas d'influence de la **conductivité**

$$\longrightarrow FR_{pred} = 1,85 (0,13) \Theta + 3,14 (1,75)$$

#### Reproduction

- Influence significative de la **température** sur le cycle de mue
- Pas d'influence de la **conductivité** sur le cycle de mue

$$\longrightarrow t_{50\% mue} = - \frac{(-30.61(5.23) + 0.39(0.30) \Theta)}{(0.01(0.07) + 0.05(0.01) \Theta)}$$

- Influence de la **taille** sur la fertilité et la fécondité
- Influence du **stade de mue** sur la fertilité mais pas sur la fécondité
- Pas d'influence de la **température** ni de la **conductivité** sur la fécondité et la fertilité

#### Taux de croissance

- Influence significative de la **température**
- Pas d'influence de la **conductivité**

$$\longrightarrow L(t) = L_{max} \left/ 1 + \left( \frac{L_{max}}{L_{init}} - 1 \right) \right. e^{-(0,00136(0,0007) \Theta - 0,00210(0,00078) t)}$$

## 2.2 Etape 2 : Définition de gammes de valeurs de références : transplantation d'organismes de la Bourbre dans des sites de référence

### 2.2.1 Taux d'alimentation

Nous avons réalisé des encagements sur le terrain d'organismes calibrés selon les critères présentés précédemment (*i.e.*, des mâles issus de la population de la Bourbre et acclimatés 15 jours au laboratoire, non parasités et mesurant environ 10 mm) dans 13 sites à faible risque de contamination (**Tableau III-2**) durant trois campagnes d'encagement : une en octobre 2009 (R1 à R12) et deux en juin 2010 (R13 à R24), ce qui nous a permis au final d'obtenir 24 mesures du taux d'alimentation dans 24 déploiements (**Tableau III-2**). En effet, pour des raisons climatiques (épisodes de crue ou au contraire étiage trop important), nous n'avons pas pu étudier les 13 sites durant chacune des trois campagnes.

Les différents sites ont été recensés parmi la liste des sites de référence définis par l'Agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse (RMC), et suivis pour le réseau de contrôle et de surveillance dans le cadre de la DCE, en fonction de leurs caractéristiques chimiques et écologiques. Nous avons choisi les différents sites sur l'ensemble de la région Rhône-Alpes afin de couvrir une large gamme de conditions physico-chimiques ainsi qu'une grande aire de répartition ( $\approx 20.000\text{km}^2$ ) (**Figure III-10**). Lors de ces campagnes d'encagement à différentes saisons, les températures moyennes hebdomadaires de l'eau de chaque site étaient comprises entre 9,2 et 15,1 °C et la conductivité moyenne entre 55 et 440  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Les caractéristiques physico-chimiques sont détaillées dans le **Tableau III-2**.

**Tableau III-2 : Caractéristiques des 24 déploiements lors des engagements *in situ* de *G. fossarum* dans les 13 sites de référence**

site (rivière, lieu)	Référence ONEMA	date (no. de déploiement)	température moyenne (°C)	conductivité moyenne ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )
Doux, Labatie d'Andaure (a)	6105568	10/2009 (R1)	14.8	64
		06/2010 (R13)	13.4	55
Cance, Saint Julien Vocance (b)	6101905	10/2009 (R2)	13.4	78
Gier, La Valla en Gier (c)	772226	10/2009 (R3)	13.1	78
Ain, Saint Maurice de Gourdans (d)	6092000	10/2009 (R4)	15.0	394
Albarine, Chaley (e)	6300001	10/2009 (R5)	11.9	440
Mandorne, Oncieux (f)	6069650	10/2009 (R6)	11.9	380
		06/2010 (R14, R20)	10.9, 11.9	415
Vareze, Cours et Buis (g)	6820073	10/2009 (R7)	13.9	411
		06/2010 (R15, R21)	14.0, 15.0	325
Galavayson, Saint Clair sur Galaure (h)	6104900	10/2009 (R8)	13.5	292
		06/2010 (R16, R22)	13.8, 15.1	130
Drevenne, Rovon (i)	6147220	10/2009 (R9)	13.9	323
Guiers Mort, Saint Laurent du Pont (j)	6078200	10/2009 (R10)	10.7	300
		06/2010 (R17, R23)	9.2, 10.1	290
Boussuivre, Saint Marcel l'Eclairé (k)	6580673	06/2010 (R18, R24)	12.9, 13.6	245
Ardières, Les Ardillats (l)	6051375	10/2009 (R11)	12.8	295
Ergues, Poule les Echarmeaux (m)	6053830	10/2009 (R12)	12.6	150
		06/2010 (R19)	14.2	110

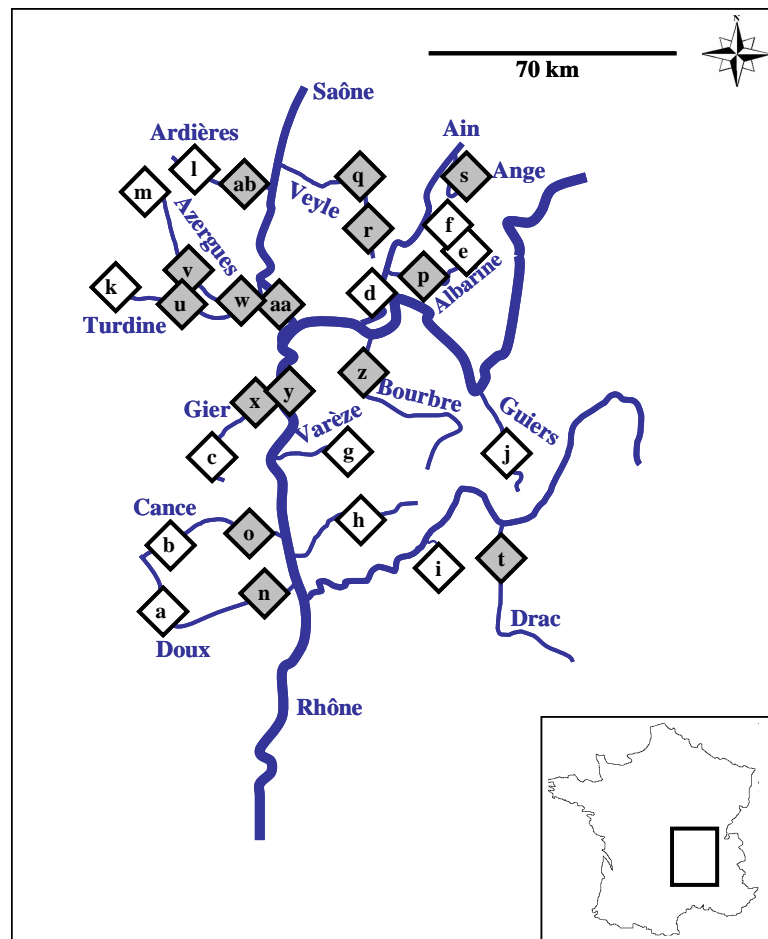
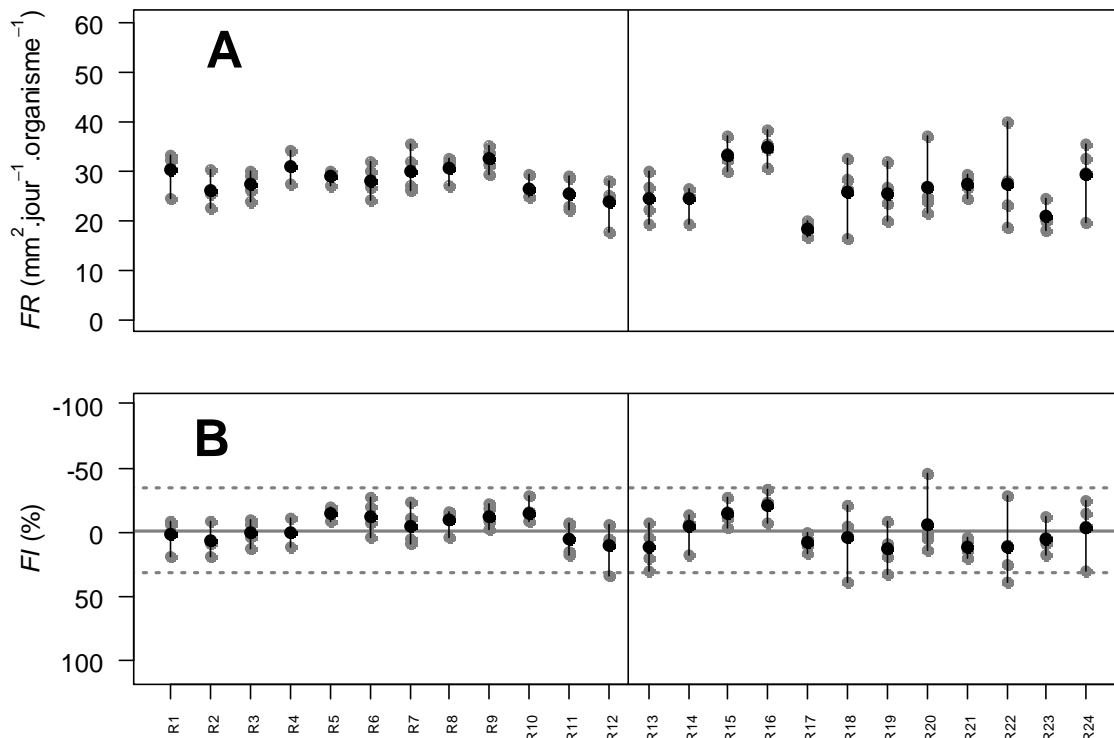


Figure III-10 : Localisation des différents sites d'encagement *in situ* de *G. fossarum*.

En blanc les sites de référence et en gris les sites contaminés

Nous observons des différences significatives du taux d'alimentation entre les 24 déploiements de référence (ANOVA,  $p = 0,04$ ) mais pas d'effet de la campagne d'encagement (ANOVA,  $p = 0,85$ ) (**Figure III-11 A**) ce qui nous indique que ces différences de taux d'alimentation ne sont pas liées à des différences de mesure entre les trois campagnes et que nous pouvons considérer ces différents déploiements comme un seul lot de mesures d'alimentation dans des conditions de référence. Afin de confirmer l'influence significative de la température observée au laboratoire, nous avons étudié l'influence de la température et de la conductivité sur les taux d'alimentation observés *in situ* sur ces déploiements dans des sites de référence. Nous retrouvons alors les conclusions de l'expérimentation au laboratoire avec une influence significative de la température mais pas de la conductivité (ANOVA, interaction :  $p = 0,66$  ; influence conductivité :  $p = 0,49$  ; influence température :  $p < 10^{-17}$ ).



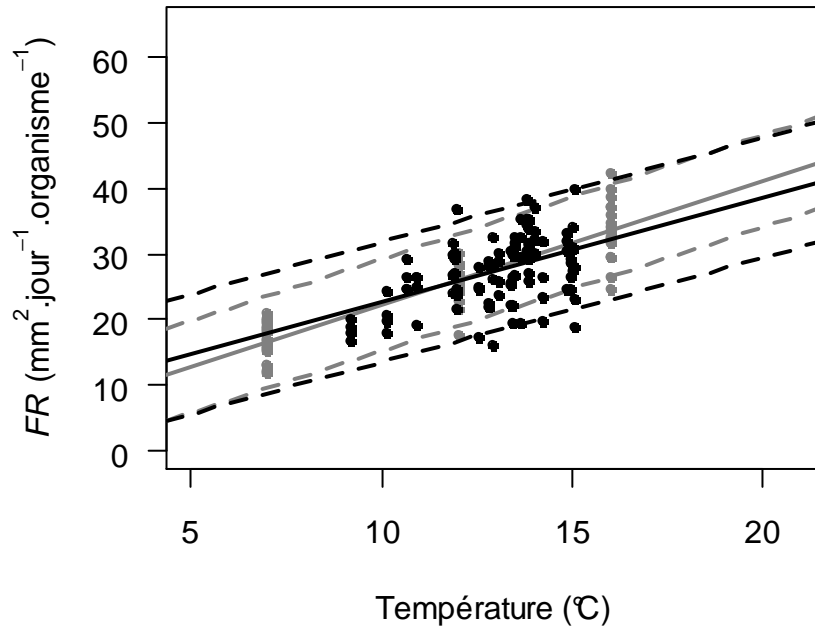
**Figure III-11 : Mesure du taux d'alimentation de *G. fossarum* *in situ* dans des sites de référence en octobre 2009 (R1-R12) et juin 2010 (R13-R24).**

(A) Taux d'alimentation observé *in situ* ( $FR$ ,  $\text{mm}^2 \cdot \text{jour}^{-1} \cdot \text{organisme}^{-1}$ ). Les points gris correspondent aux mesures du taux d'alimentation des les quatre répliquats pour chaque site, les points noirs à la moyenne du taux d'alimentation pour chaque site et les traits noirs à la variabilité des valeurs de  $FR$  entre la valeur minimale et la valeur maximale pour chaque site. (B) Correction de l'influence de la température avec le calcul d'un indice ( $FI$ , %, Eq III-11). La ligne grise pleine correspond à la moyenne et les lignes en pointillés à l'intervalle de confiance à 95% de la distribution de l'ensemble des valeurs de  $FI$  (sous l'hypothèse vérifiée d'une distribution normale de ces valeurs).

De plus, nous retrouvons une relation linéaire entre le taux d'alimentation et la température (Eq III-10) comparable avec celle observée au laboratoire que ce soit en terme de valeur des taux d'alimentation ou en terme de variabilité (Figure III-12).

$$FR_{obs} = 1,58 (0,30) \Theta + 6,93 (4,01)$$

Eq III-10



**Figure III-12 : Relation entre le taux d'alimentation ( $\text{mm}^2 \cdot \text{jour}^{-1} \cdot \text{organisme}^{-1}$ ) de *G. fossarum* et la température ( $^{\circ}\text{C}$ ) au laboratoire (points gris) et durant les encagements *in situ* dans les sites de référence (points noirs).**

Les traits continus correspondent à la relation linéaire entre le taux d'alimentation et la température et les traits pointillés à l'intervalle de confiance à 95%.

Afin de prendre en compte cette influence de la température sur le taux d'alimentation, nous avons proposé le calcul d'un indice (*FI*) (Eq III-11) :

$$FI = \frac{(FR_{\text{pred}} - FR_{\text{obs}})}{FR_{\text{pred}}} \times 100 \quad \text{Eq III-11}$$

où  $FR_{\text{obs}}$  correspond au taux d'alimentation mesuré durant l'encagement *in situ* et  $FR_{\text{pred}}$  au taux d'alimentation prédit par l'équation (Eq III-1) en considérant la température moyenne durant la semaine de l'encagement.

Avec cet indice, nous n'observons plus de différences significatives du taux d'alimentation entre les différents sites (ANOVA,  $p = 0,12$ ) (Figure III-11 B). En ajustant une distribution normale sur les différentes valeurs de *FI* observées dans les différents sites (fonction *fitdistr* du package MASS de R), nous observons une valeur moyenne de -1,11 non différente de 0 (test t de Student,  $p = 0,52$ ). Cela démontre qu'il n'y a pas d'écart entre les valeurs observées *in situ* et les

prédictions du laboratoire et confirme que la température est bien le facteur de confusion le plus important pour expliquer les différences entre sites du taux d'alimentation. Ainsi, notre indice  $FI$  peut être interprété comme un indicateur d'inhibition (lorsqu'il est positif) ou d'induction (lorsqu'il est négatif) de l'activité alimentaire puisqu'il compare une valeur du taux d'alimentation observée ( $FR_{obs}$ ) à la valeur prédite dans un contexte non contaminé pour la même température d'exposition ( $FR_{pred}$ ).

Cette distribution normale des valeurs de  $FI$  dans les déploiement dans des sites de référence nous permet de calculer  $p$ -value associée à l'observation des valeurs de  $FI$  dans un déploiement donné (Xuereb et al. 2011). Pour cela, nous avons simulé par *bootstrap*  $10^5$  groupes de quatre répliquats théoriques de  $FI$  tirés aléatoirement dans la distribution normale de référence des valeurs de  $FI$  puis nous avons calculé la log-vraisemblance associée à chacun de ses  $10^5$  groupes de quatre répliquats théoriques. Nous avons alors pu définir une distribution théorique des valeurs de log-vraisemblance ainsi obtenues. Ensuite, pour chaque déploiement, il est possible de calculer la log-vraisemblance des quatre valeurs de  $FI$  observées dans les quatre répliquats et de la comparer à la distribution théorique des log-vraisemblance définie précédemment afin de calculer une  $p$ -value.

Contrairement à des tests paramétriques classiques, cette méthode, bien que plus complexe à mettre en place, présente plusieurs avantages. Tout d'abord, elle permet de prendre en compte la perte d'un répliquat lors de l'expérimentation. En effet, il est possible de comparer la log-vraisemblance des valeurs de  $FI$  mesurées dans  $n$  répliquats sur un déploiement donné à une distribution théorique des log-vraisemblances obtenue à partir de la simulation  $10^5$  groupes de  $n$  valeurs de  $FI$  issues de la distribution normale de référence. De plus, cette méthode peut être mise en œuvre lorsque les valeurs de  $FI$  des différents répliquats présentent une importante hétéroscédasticité (*e.g.*, par exemple, inhibition forte de l'alimentation dans seulement deux répliquats sur les quatre et pas d'inhibition dans les deux autres répliquats). Enfin, par rapport à des tests non paramétriques, cette méthode permet d'augmenter la puissance statistique des tests.

Pour les 24 déploiements de référence, nous trouvons une  $p$ -value  $> 0,05$ . Ceci souligne la conformité de chacun des déploiements avec la distribution de référence et donc la bonne spécificité de notre approche (faible taux de faux positifs dans les sites de référence).



## 2.2.2 Durée du cycle de reproduction

Nous avons réalisé des encagements *in situ* par la transplantation d'organismes provenant de la Bourbre et acclimatés au laboratoire dans deux sites de référence durant quatre campagnes en novembre 2008, avril 2009, juin 2009 et octobre 2009 sur la Bourbre au niveau de la Tour du Pin et l'Ardières au niveau des Ardillats. Les caractéristiques physico-chimiques observées lors de ces différents encagements sont présentées dans le **Tableau III-3**. Nous nous situons là encore dans des contextes variés de température (de 7,2 à 18,6 °C) et de conductivité (de 110 à 535  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

**Tableau III-3 : Paramètres physico-chimique des différents encagements *in situ* de *G. fossarum*.**

Site (rivière, lieu)	Campagne	Température (°C)	Conductivité ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )
Bourbre, Tour du Pin	Novembre 2008	7,6	530
	Avril 2009	15,2	525
	Juin 2009	18,6	535
	Octobre 2009	9,0	525
Ardières, Les Ardillats	Novembre 2008	7,2	110
	Avril 2009	12,0	115
	Juin 2009	15,1	115
	Octobre 2009	8,5	120

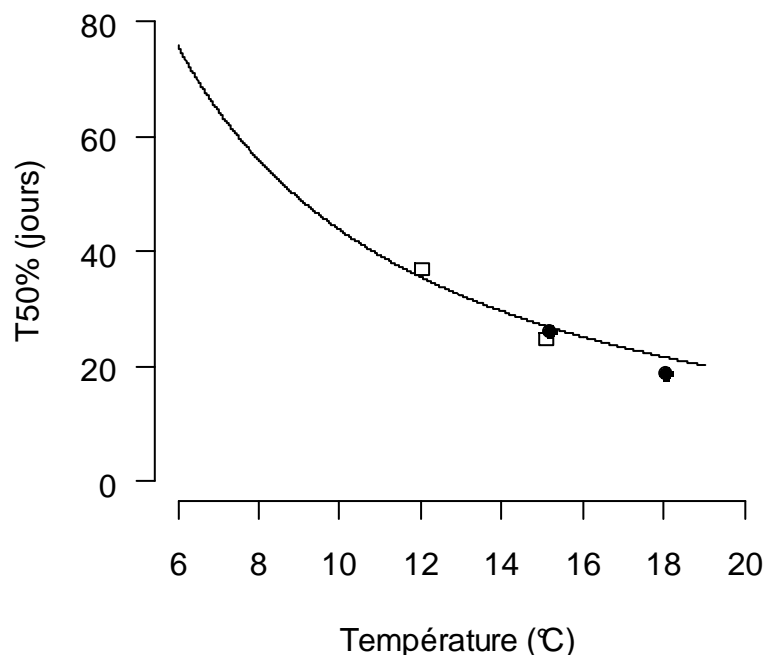
L'objectif de ces encagements était de valider *in situ* l'influence de la température observée au laboratoire sur la durée du cycle de reproduction. Nous avons ainsi sélectionné des couples de *G. fossarum* en fin de cycle de reproduction puis nous avons contrôlé visuellement l'avancement dans le cycle de mue des femelles afin de déterminer la durée complète du cycle de reproduction. Les femelles muèrent une première fois dans les premiers jours de l'exposition et leur suivi se poursuivait alors jusqu'à la mue suivante.

Pour les deux campagnes d'avril 2009 et juin 2009, nous avons pu estimer le temps nécessaire pour que les femelles réalisent leur première mue, puis le temps nécessaire pour la mue suivante (**Eq III-4**). Nous avons ainsi pu déterminer la durée d'un cycle de mue complet (**Figure III-13**).

En comparant les durées des cycles de reproduction estimées lors de ces encagements aux durées prédites par le modèle développé au laboratoire (**Eq III-6**), nous observons de bonnes concordances dans les deux cas. Cela confirme l'influence majeure de la température pour expliquer la variabilité de la durée du cycle de reproduction. De plus, le fait que nous trouvions

des durées d'intermue similaires dans les deux sites malgré leurs importantes différences de conductivité (**Tableau III-3**) va également dans le sens d'une absence d'impact de la conductivité sur la durée du cycle de reproduction lors de ces expériences de transplantation *in situ*, comme nous avons pu le voir en conditions contrôlées.

A cause de températures trop basses pour les encagements de novembre 2008 et octobre 2009, nous n'avons pas pu suivre les femelles jusqu'à la mue suivante pour des raisons techniques et logistiques (implication de nombreux déplacements sur le terrain notamment). Cependant, le stade de mue des femelles avait été contrôlé après 21 et 36 jours d'exposition pour l'encagement de novembre 2008 et après 21 jours d'exposition en octobre 2009. Les stades de mues observés lors de ces arrêts (environ 50 % de stade B et 50 % de stade C1 après 21 jours d'exposition en novembre 2008, plus de 90 % de stade C1 après 36 jours d'exposition en novembre 2008 et plus de 90 % de stade C1 après 21 jours octobre 2009) sont cohérents avec les prédictions de nos modèles au regard de la température moyenne de l'eau observée durant ces périodes, ce qui confirme également l'influence majeure de la température pour expliquer la variabilité de la durée du cycle de reproduction.



**Figure III-13 : Influence de la température sur la durée du cycle de reproduction de *G. fossarum* *in situ*.**

La courbe correspond à la prédiction du modèle établi au laboratoire pour la relation entre la température et la durée du stade de mue D2 (Figure III-5, Eq III-6). Les points noirs correspondent à la durée du cycle de mue observée *in situ* pour le site de la Tour du Pin et les carrés blancs à la durée du cycle de mue observée *in situ* pour le site des Ardillats lors des encagements d'avril 2009 et juillet 2009. La température des différents points correspond à la température moyenne de la campagne d'encagement.

## 2.2.3 Taux de croissance

Nous avons réalisé des encagements *in situ* par la transplantation de juvéniles provenant de la Bourbre et acclimatés au laboratoire dans un site de référence durant quatre campagnes en novembre 2008, avril 2009, juin 2009 et octobre 2009 sur la Bourbre au niveau de la Tour du Pin afin de valider *in situ* l'influence de la température sur le taux de croissance de *G. fossarum*. Entre les différentes campagnes, la température de l'eau était fortement variable (entre 7,6 °C et 18,6 °C de moyenne) (**Tableau III-3**). Nous avons pris pour chaque campagne des juvéniles de taille homogène (entre 2 et 2,5 mm) que nous avons mesurés au départ puis après 28 jours d'exposition.

Nous avons pu calculer pour chaque organisme le gain de croissance en taille observé aux différentes saisons (**Eq III-12**) selon la formule :

$$g_{obs} = \frac{(L_{fin} - L_{init})}{\Delta t} \quad \text{Eq III-12}$$

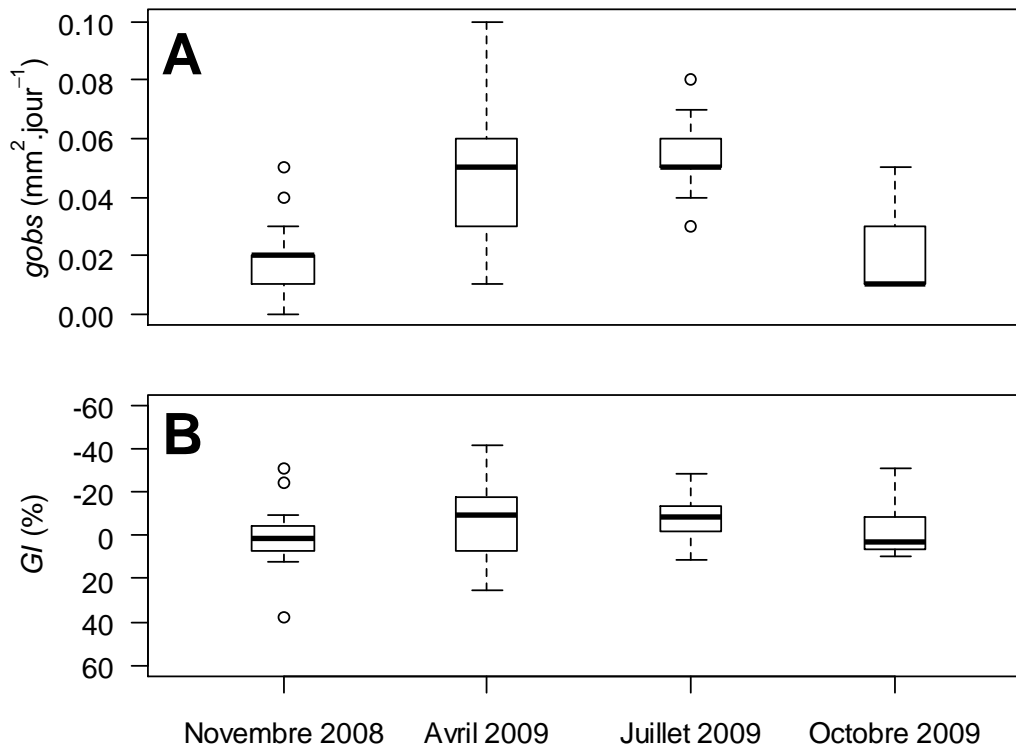
où  $g_{obs}$  correspond au gain de croissance en taille observé lors de l'encagement en mm.jours<sup>-1</sup>,  $L_{fin}$  à la taille de chaque organisme en mm à la fin de l'encagement,  $L_{init}$  à la taille moyenne en mm des organismes au début de l'encagement et  $\Delta t$  la durée de l'encagement en jours (ici 28 jours).

Nous observons des différences significatives entre les saisons (test de Kruskal et Wallis,  $p < 10^{-10}$ ) (**Figure III-14 A**). En considérant les résultats obtenus au laboratoire, nous avons fait l'hypothèse que ces différences étaient liées aux variations de température entre les saisons. Nous avons alors, comme pour le test alimentation, calculé un indice ( $GI$ , **Eq III-13**) :

$$GI = \frac{(taille_{pred} - taille_{obs})}{taille_{pred}} \times 100 \quad \text{Eq III-13}$$

où  $taille_{obs}$  correspond à la taille des organismes à la fin de l'encagement et  $taille_{pred}$  la taille prédite par le modèle logistique (**Eq III-8**) à partir de la température moyenne de la période d'encagement et de la taille initiale au début de l'expérimentation.

Avec cet indice, nous n'observons plus de différences entre les saisons (ANOVA,  $p = 0,07$ ) (**Figure III-14 B**). Les *GI* calculés pour les différents mois ne sont pas significativement différents de 0 pour les encagements de novembre, avril et octobre (test *t* de Student,  $p = 0,72$  ;  $p = 0,06$  ;  $p = 0,50$ ) ce qui confirme la bonne adéquation entre les prédictions du modèle au laboratoire et les observations *in situ*. Cependant, en juillet, nous observons *in situ* une croissance significativement plus importante que celle attendue (test *t* de Student,  $p < 10^{-4}$ ).



**Figure III-14 : Mesure du taux de croissance *in situ* de *G. fossarum* aux différentes saisons sur la Bourbre.**

(A) Taux de croissance individuel ( $\text{mm}^2 \cdot \text{jour}^{-1}$ ) (B) Correction de l'influence de la température avec le calcul de l'indice *GI* (%) (Eq III-13). Les boîtes s'étendent du premier au troisième quartile de la distribution des mesures avec le trait noir qui correspond à la médiane. Les moustaches s'étendent jusqu'aux valeurs extrêmes des mesures ne dépassant pas 1,5 fois l'écart interquartile. Les points marginaux sortant de cette gamme sont représentés par des points.

### 2.3 Etape 3 : Validation de la sensibilité des marqueurs : transplantation d'organismes de la Bourbre dans des sites de contaminés - cas de la mesure du taux d'alimentation

Nous avons réalisé des encagements *in situ* dans 15 sites potentiellement contaminés (**Tableau III-4**) durant trois campagnes : une en octobre 2009 (P1 à P15) et deux en juin 2010 (P16 à P41), ce qui nous a permis au final d'obtenir 41 mesures du taux d'alimentation dans 41 déploiements (**Tableau III-4**). En effet, pour des raisons climatiques (épisodes de crue ou au contraire étiage trop important), nous n'avons pas pu étudier les 15 sites durant chacune des trois campagnes. Ces sites ont été sélectionnés parmi les sites potentiellement contaminés définis par l'agence de l'eau RMC dans le cadre du réseau de contrôle opérationnel pour l'application de la DCE. Nous avons choisi les différents sites dans la région Rhône-Alpes afin de couvrir une large gamme de conditions physico-chimiques ainsi qu'une grande aire de répartition géographique ( $\approx 20.000\text{km}^2$ ) (**Figure III-10**). Les températures moyennes de l'eau étaient comprises entre 11,8 et 20,7 °C et la conductivité entre 80 et 868  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Les caractéristiques physico-chimiques sont détaillées dans le **Tableau III-4**.

De manière globale, nous observons des différences significatives des taux d'alimentation entre les différents déploiements (test de Kruskal et Wallis,  $p < 10^{-10}$ ) ainsi qu'une plus grande variabilité par rapport aux sites de référence (**Figure III-15 A**). Afin de discriminer les effets liés aux variations de température entre les déploiements des effets des contaminations, nous avons calculé les valeurs de *FI* (**Eq III-11**) pour chacun des déploiements (**Figure III-15 B**). Nous observons toujours des différences significatives entre les déploiements (test de Kruskal et Wallis,  $p < 10^{-5}$ ).

Afin de déterminer les déploiements présentant des inhibitions significatives de l'alimentation, nous avons testé chaque déploiement de manière indépendante à la distribution de référence défini précédemment en comparant la log-vraisemblance des valeurs de *FI* observées à la distribution théorique des log-vraisemblance obtenue par simulation à partir de la distribution normale des valeurs de *FI* dans les déploiements dans les sites de référence. Nous obtenons alors des inhibitions significatives ( $p < 0,05$ ) dans 14 déploiements sur 41 (P7, P20, P21, P24, P25, P28, P29, P30, P32, P33, P34, P37 et P41). En octobre 2009, nous trouvons 7% de déploiements présentant des inhibitions de l'alimentation contre 54% en juin 2010. Sur les 15 sites, huit sont impactés durant au moins une saison : le Drac à Fontaine, la Turdine à l'Arbresle, le Gier à Givors, le Rhône à Givors, l'Ardières à Saint Jean d'Ardières, le Doux à Saint Jean de Muzols, la Cance à Sarras et la Veyle à Servas.

Tableau III-4 : Caractéristiques des engorgements *in situ* de *G. fossarum* dans les 15 sites contaminés

site (rivière, lieu)	Référence ONEMA	date (no.)	métaux	pesticides	autres contaminants	température moyenne (°C)	conductivité moyenne ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )
Doux, Saint Jean de Muzols (n)	6106030	10/2009 (P1) 06/2010 (P16, P29)	+	+	+	17.1 18.0, 18.7	123 80
Cance, Sarras (o)	6103500	10/2009 (P2) 06/2010 (P17, P30)	+	+	+	14.8 16.9, 17.3	613 160
Albarine, Saint Rambert (p)	6300001	10/2009 (P3)			+	12.7	386
Veyle, Lent (q)	6048570	10/2009 (P4) 06/2010 (P18, P31)		++		12.6 15.6, 16.0	473 345
Veyle, Servas (r)	6049550	10/2009 (P5) 06/2010 (P19, P32)		+++		14.0 17.3, 17.9	447 330
Ange, Brion (s)	6086100	10/2009 (P6)	++		+++	12.7	602
Drac, Fontaine (t)	6146500	10/2009 (P7) 06/2010 (P20, P33)	+++	+++	+++	15.1 11.8, 12.1	317 240
Turdine, Arbresle (u)	6057200	10/2009 (P8) 06/2010 (P21, P34)	+		+	13.6 17.2, 17.2	868 465
Azergues, Legny (v)	6800009	10/2009 (P9) 06/2010 (P22, P35)	+++	+		13.2 15.3, 15.3	307 265
Azergues, Lucenay (w)	6057700	10/2009 (P10) 06/2010 (P23, P36)	+++	+++	+	15.8 18.2, 17.6	664 430
Gier, Givors (x)	6097000	10/2009 (P11) 06/2010 (P24, P37)	++	+	++	16.1 17.8, 17.0	377 240
Rhône, Givors (y)	na	10/2009 (P12) 06/2010 (P25, P38)	++	+	++	19.1 17.4, 17.9	434 390
Bourbre, Pont de Cheruy (z)	na	10/2009 (P13) 06/2010 (P26, P39)	+	+	+	15.2 16.6, 16.7	720 650
Saône, Ile Barbe (aa)	6059500	10/2009 (P14) 06/2010 (P27, P40)	++	+++	+	18.8 20.7, 20.3	702 490
Ardières, Saint Jean (ab)	6051550	10/2009 (P15) 06/2010 (P28, P41)	+++	+++	+	14.3 17.0, 16.6	270 160

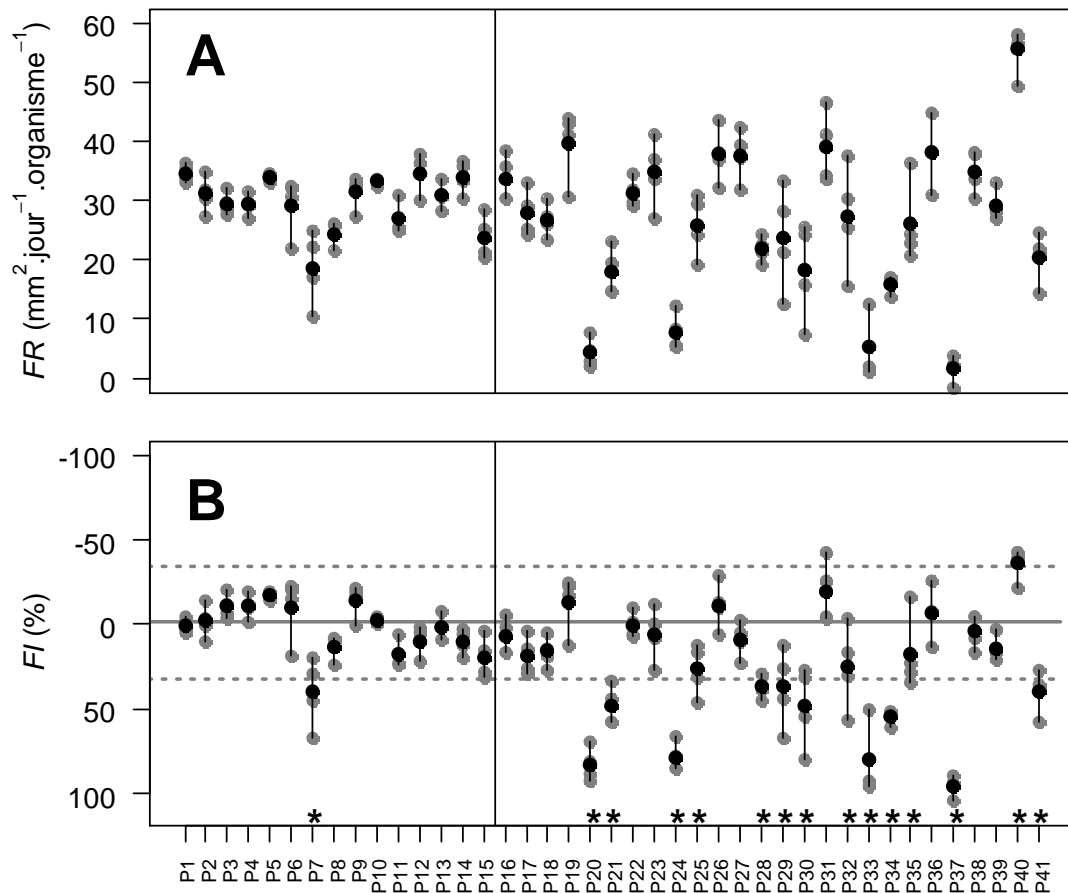


Figure III-15 : Mesure du taux d'alimentation de *G. fossarum in situ* dans des sites contaminés en octobre 2009 (P1-P15) et juin 2010 (P16-R41).

(A) Taux d'alimentation observé *in situ* ( $FR$ ,  $\text{mm}^2 \cdot \text{jour}^{-1} \cdot \text{organisme}^{-1}$ ). Les points gris correspondent aux mesures du taux d'alimentation des les quatre répliquats pour chaque site, les points noirs à la moyenne du taux d'alimentation pour chaque site et les traits noirs à la variabilité des valeurs de  $FR$  entre la valeur minimale et la valeur maximale pour chaque site.

(B) Correction de l'influence de la température avec le calcul d'un indice ( $FI$ , %, Eq III-11). La ligne grise pleine correspond à la moyenne et les lignes en pointillés à l'intervalle de confiance à 95% de la distribution de l'ensemble des valeurs de  $FI$  observées dans les sites de référence (sous l'hypothèse vérifiée d'une distribution normale de ces valeurs).

## 2.4 Cas d'étude : impacts de contaminations métalliques sur le taux d'alimentation par la transplantation de *G. fossarum* de la Bourbre sur le Lot à Decazeville et sur l'Amous (France)

### 2.4.1 Cas du Lot à Decazeville

Dans le cadre de l'ANR 08-CES-014 RESYST, quatre campagnes d'encagement *in situ* ont été réalisées aux quatre saisons entre novembre 2009 et juin 2010 sur le Lot au niveau de la ville de Decazeville (Aveyron) (**Figure III-17 A**). Cette zone a été étudiée par différents programmes scientifiques en raison d'une importante contamination métallique du Lot principalement en zinc et en cadmium ayant pour source un affluent du Lot : le Riou Mort (Gust et al. 2011b ; Lacaze et al. 2011b). Quatre sites pour lesquels des données de chimie, de survie, de génotoxicité chez *G. fossarum* sont disponibles (Lacaze et al. 2011b) ont été choisis : 1- une station (*Upstream Lot*) située en amont de la confluence entre le Lot et le Riou-Mort et considérée comme un site de référence dans différentes études en raison d'une faible contamination de l'eau ; 2- une station située en aval de la confluence entre le Lot et le Riou-Mort (*Downstream Lot*) ; 3- une station située sur le Riou Mort en amont de la contamination métallique (*Decazeville*) mais située dans une zone urbaine ; 4- une station (*Riou Viou*) située sur le Riou Viou, un affluent du Riou Mort, et présentant de fortes concentrations en métaux. Entre les différentes campagnes, la température variait entre 6,2 et 17,4 °C et la conductivité entre 135 et 1552  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Les caractéristiques physico-chimiques des différents sites sont résumées dans le **Tableau III-5**.

Nous avons, dans un premier temps, réalisé pour chaque saison des comparaisons entre les taux d'alimentation observés dans le site de référence *Upstream Lot* et les autres sites (**Figure III-16 A**). Nous observons des inhibitions significatives du taux d'alimentation pour le site de *Decazeville* en hiver, au printemps et en été ; pour le site du *Riou Viou* en automne et pour le site *Downstream Lot* au printemps (test des rangs unilatéral de Wilcoxon,  $p < 0,05$ ). Nous observons également pour le site du *Riou Viou* en hiver un taux d'alimentation plus important que dans le site de référence (test des rangs unilatéral de Wilcoxon,  $p < 0,05$ ).





**III-16 B**) confirme les inhibitions de l'alimentation observées dans les sites de *Decazeville* en hiver, au printemps et en été et *Downstream Lot* au printemps ( $p < 0,05$ ). Par contre, nous détectons, avec notre indice, des inhibitions significatives dans les sites de *Decazeville* en automne, et *Downstream Lot* en automne ( $p < 0,05$ ). Ces deux cas constituent des faux négatifs qui ne sont pas détectés avec une mesure brute du taux d'alimentation. Le calcul des *FI* révèle également des cas de faux positifs : sur le site du *Riou Vion*, l'inhibition de l'alimentation observée en automne et l'induction observée en hiver avec le calcul brut du taux d'alimentation ne sont pas liées à une contamination des sites mais sont en fait entièrement expliquées par les différences de température avec le site référence.

De plus, nous observons que les valeurs de *FI*, calculés dans le site de référence *Upstream Lot* aux différentes saisons, sont comprises dans la distribution de référence externe à cette étude et définie précédemment (**Figure III-11 B**). La variabilité saisonnière observée dans le site de référence entre les différents encagements (test de Kruskal et Wallis,  $p < 0,05$ ) est corrigée par le calcul des *FI* qui intègre l'influence de la température (test de Kruskal et Wallis,  $p = 0,68$ ).

#### 2.4.2 Bassin versant de l'Amous

Dans le cadre d'un projet ECCO, des encagements *in situ* par la transplantation de *G. fossarum* de la Bourbre ont été réalisés en mars 2008 sur le bassin versant de l'Amous (Gard) (**Figure III-17 B**), une rivière connue pour son importante contamination métallique (principalement du zinc) liée aux rejets de la mine de Carnoules (Dedourge-Geffard et al. 2009). Quatre sites ont été étudiés : trois le long de l'Amous présentant différents niveaux de contamination métallique : *Upstream - 1500 m* ; *Downstream + 1200 m* et *Downstream + 3500 m* (avec une contamination maximale sur le site *Downstream + 1200 m*) et un quatrième situé sur le Reigous, un affluent de l'Amous (*Tributary*) non impacté par la mine de Carnoules qui été sélectionné comme site de référence. Entre les différents sites la température variait entre 9,5 et 11,8 °C et la conductivité entre 520 et 600  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Les caractéristiques physico-chimiques des différents sites sont résumées dans le **Tableau III-6**.

En comparant les taux d'alimentation observés dans les différents sites impactés à celui du site de référence (*Tributary*) (**Figure III-16 A**), nous observons des inhibitions significatives dans les stations *Upstream - 1500* et *Downstream + 1200* (test des rangs unilatéral de Wilcoxon,  $p < 0,05$ ). En calculant les indices *FI* pour les différents sites (**Figure III-16 B**), nous continuons de détecter une inhibition significative de l'alimentation dans le site *Downstream + 1200*. Cependant,

le site *Upstream – 1500* ne se révèle pas impacté et constitue donc un cas de faux positif lié aux variations de températures entre sites. Ces observations sont confirmées que ce soit en comparant les différents sites au site de référence (*Tributary*) ou à notre distribution de référence présentée précédemment.

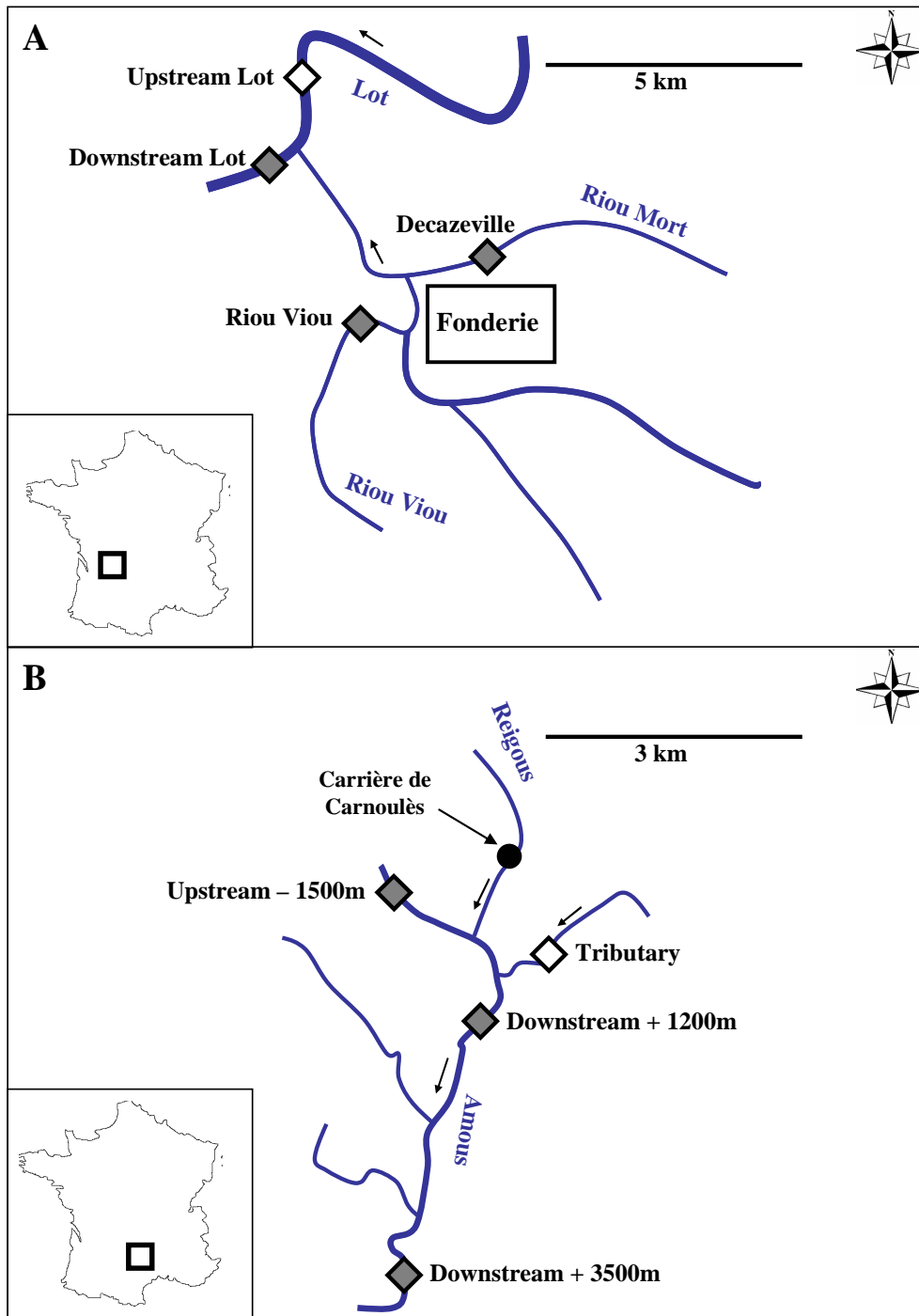


Figure III-17 : Localisation des différents sites d'encagements *in situ* de *G. fossarum*.

(A) cas du Lot au niveau de Decazeville ; (B) cas du bassin versant de l'Amous.

Tableau III-5 : Caractéristiques des encagements *in situ* de *G. fossarum* sur le Lot pour les différentes saisons.

Saison	Site	température (°C)	conductivité ( $\mu\text{S.cm}^{-1}$ )
Automne	Upstream Lot	10.7	145
	Downstream Lot	10.6	158
	Decazeville	11.1	1180
	Riou Viou	9.2	270
Hiver	Upstream Lot	6.4	162
	Downstream Lot	6.2	180
	Decazeville	8.2	717
	Riou Viou	7.7	215
Printemps	Upstream Lot	12.1	135
	Downstream Lot	12.2	177
	Decazeville	15.8	1072
	Riou Viou	12.1	255
Eté	Upstream Lot	14.9	135
	Downstream Lot	15.2	155
	Decazeville	17.4	1530
	Riou Viou	15.6	207.5

Tableau III-6 : Caractéristiques des encagements *in situ* de *G. fossarum* dans le bassin versant de l'Amous.

Site	température (°C)	conductivité ( $\mu\text{S.cm}^{-1}$ )
Tributary	9.45	520
Upstream -1500m	11.80	525
Downstream +1200	10.25	590
Downstream +3500	11.65	600

### 3 Discussion

Bien que l'importance des facteurs de confusion biotiques (*e.g.*, taille, parasitisme, différences entre populations) et abiotiques (*e.g.*, température, pH, conductivité, concentration en oxygène) soit reconnue, la quantification et la prise en compte de leur influence sur les marqueurs sub-individuels et individuels utilisés lors des expérimentations pour évaluer la toxicité *in situ* demeurent beaucoup plus rare. En effet, afin de s'affranchir de ces sources de variabilités, les études *in situ* se limitent généralement à des comparaisons entre un site en amont et un site en aval d'une source de contamination présentant des caractéristiques physico-chimiques proches. Bien que couramment utilisée, cette méthodologie reste le plus souvent critiquable, ces études faisant l'hypothèse que les conditions physico-chimiques entre les sites d'études sont identiques et que la seule différence vient du degré de contamination. Or, nous avons pu souligner à travers les deux cas d'étude, que, bien qu'étant souvent relativement faibles, les variations de conditions environnementales entre les différents sites d'études pouvaient être à l'origine d'une mauvaise interprétation des tests lors de telles approches. De plus, cette nécessité de ne choisir que des sites proches ne permet pas de réaliser des études de biomonitoring à large échelle temporelle ou spatiale. Pour cela, l'approche proposée dans ce travail, qui intègre l'influence des facteurs de confusion sur les marqueurs individuels développés chez *G. fossarum* et utilisés lors des bioessais *in situ* (*e.g.*, la mesure du taux d'alimentation, du taux de croissance ainsi que de la reproduction), offre des outils prometteurs pour l'évaluation *in situ* de la qualité des milieux aquatiques, notamment à large échelle.

#### 3.1 Identification des facteurs de confusion

##### 3.1.1 Taux d'alimentation

Les études portant sur l'influence des facteurs de confusion sur le taux d'alimentation des *Gammaridae* sont assez rares (Maltby et al. 2002). L'influence du parasitisme est l'un des facteurs biotiques les mieux décrits (McCahon et al. 1988 ; Pascoe et al. 1995 ; Fielding et al. 2003 ; Lettini and Sukhdeo 2010). Pour les autres facteurs biotiques, les données sont plus rares. Nous observons dans notre étude une augmentation significative de l'activité alimentaire avec la taille des organismes (**Figure III-1 A**) ce qui va dans le sens des observations de Nilsson (1974) chez une espèce proche : *G. pulex*. *A contrario*, Blockwell et al. (1998) n'observent pas de différences du

taux d'alimentation de *G. pulex* entre deux classes de tailles d'organismes (5,1 et 7,0 mm). Cependant, dans cette étude, le taux d'alimentation était mesuré par la consommation d'œufs d'*Artemia salina* ce qui rend la comparaison difficile avec notre étude. De plus, la gamme de taille étudiée était relativement faible au regard de l'éventail de tailles possibles, ce qui peut expliquer cette absence d'effet.

Des interactions entre les effets de la taille et les effets des facteurs environnementaux, comme la température, sur le taux d'alimentation ont été décrits dans certaines études (Nilsson 1974) mais pas dans d'autres (Lozano et al. 2003). Nous n'avons cependant pas étudié ces interactions dans ce travail. En effet, pour nous affranchir de l'influence des facteurs biotiques tels que la taille, le sexe ou le parasitisme, nous avons choisi de travailler sur des organismes calibrés acclimatés au laboratoire. Ainsi nous avons sélectionné des mâles de taille homogène, sans parasites visibles et provenant d'une population unique.

Nous nous sommes donc intéressés à l'influence des facteurs environnementaux sur une seule classe de taille ( $10,6 \pm 0,9$  mm). Nous observons une relation linéaire significative entre la température et l'activité alimentaire (**Figure III-1 B, Eq III-1**) avec une réduction de 50% de l'activité alimentaire à 7°C par rapport à 16°C. Nous avons également montré que cette relation était valable au laboratoire, mais aussi sur le terrain dans des sites peu impactés. Cette influence de la température est cohérente avec l'étude de Nilsson (1974) dans laquelle l'activité alimentaire est diminuée de 90% à 2°C par rapport à 15°C dans des conditions de laboratoire. En nous référant au modèle théorique d'Arrhenius, nous aurions pu nous attendre à une relation exponentielle non linéaire entre la température et le taux d'alimentation (Kooijman 2000). Ce type de relation aurait pu être décrit plus précisément si nous avions étudié une plus grande gamme de températures. Cependant, l'objectif de cette étude est de proposer une méthodologie pour une utilisation *in situ* de la mesure du taux d'alimentation et nous nous sommes donc concentrés sur une gamme de températures couramment rencontrées dans les cours d'eau locaux. Au regard de la variabilité observée dans la mesure des taux d'alimentation dans la gamme de température que nous avons étudiée (**Figure III-1 B**), l'utilisation d'un modèle exponentiel n'améliore pas la prédiction des effets de la température.

Concernant la conductivité, nous ne détectons pas d'influence significative sur le taux d'alimentation ni au laboratoire ni sur le terrain lors des encagements *in situ* dans les sites de références. Au laboratoire, pour des raisons méthodologiques, nous n'avons pu tester que deux conductivités, ces résultats sont donc à prendre en compte avec prudence mais sont cohérents avec ceux de Maltby (2002) qui montre dans une étude *in situ* que 76% de la variabilité du taux d'alimentation observée dans des sites de référence est expliquée par les variations de la

température et que la prise en compte de facteurs de confusion supplémentaires (conductivité, pH, oxygène dissous) ne permet pas de diminuer significativement la variabilité.

### 3.1.2 Reproduction

#### 3.1.2.1 Durée du cycle de reproduction

Concernant les facteurs biotiques, différentes études ont montré que le parasitisme (Lettini and Sukhdeo 2010), la privation alimentaire (Niehoff 2007 ; Geffard et al. 2010), ou encore l'âge (Pöckl 1992) pouvaient influencer la durée du cycle de reproduction chez les crustacés. Dans notre étude, nous observons des variations importantes de la taille des femelles (de 7 à 11 mm) en raison de la difficulté à sélectionner des femelles homogènes lorsqu'elles sont en couple. Nous avons fait l'hypothèse que la taille n'influe pas sur la durée du cycle de reproduction. Cette hypothèse semble raisonnable au regard des résultats de la littérature. En effet, Pöckl (1992), dans une étude sur l'influence de la température sur le cycle de mue chez *G. fossarum*, montre que, chez les juvéniles, les cycles de mue sont très rapprochés, puis que la durée des cycles augmente avant de se stabiliser à l'âge adulte. Étant donné que nous travaillons sur des femelles adultes, nous pouvons donc supposer que la durée des cycles de mue s'est stabilisée et que l'âge et donc la taille n'influent plus. Concernant les autres facteurs de confusion biotiques, de même que pour l'alimentation, le fait d'utiliser des organismes calibrés sans parasites visibles, provenant d'une population unique et nourris *ad libitum*, nous permet de nous en affranchir.

Nous observons une influence significative de la température sur la durée des différents stades de mue et donc sur la durée du cycle de reproduction (**Figure III-2 ; Figure III-3 ; Figure III-4**). Ainsi, à 7°C une femelle mue et se reproduit au bout de 65 jours environ contre seulement 25 jours à 16°C. Ces résultats sont cohérents avec ceux trouvés par Pöckl (1992) qui observe chez des juvéniles de *G. fossarum* une augmentation de la durée des cycles de mue avec la diminution de la température. Cette influence majeure de la température a également été rapportée chez plusieurs autres espèces d'amphipodes proches (Sutcliffe 1992, Cuzin-Roudy and Buscholz 1999, Welton and Clarke 1980, Pöckl and Humpesch 1990, Nilsson 1977, Sutcliffe and Carrick 1981). En revanche, nous n'observons pas d'influence de la conductivité sur la durée des différents stades de mues (**Figure III-2**). Ces résultats contredisent les observations de Meyran (1997) qui montrent une augmentation significative de la durée du cycle de mue de *G. fossarum* avec la diminution de la teneur en calcium de l'eau et donc de la conductivité étant donné que les deux paramètres sont fortement corrélés (Kestrup and Ricciardi 2010). Cependant, ces

observations avaient été faites chez des mâles ce qui pourrait expliquer les différences avec notre étude. En effet, chez les femelles, le cycle de mue est corrélé au cycle de reproduction, en particulier au temps de développement des embryons (Sutcliffe et al. 1981) et au temps de maturation des ovocytes (Cuzin-Roudy and Buchholz 1999). De ce fait, la durée du cycle de mue pourrait être plus contrainte chez les femelles que chez les mâles ce qui pourrait expliquer qu'ils soient moins plastiques et donc moins sensibles aux variations de la conductivité de l'eau. De plus, contrairement à l'étude de Meyran (1997) qui se déroulait sur un grand nombre de cycles de mue consécutifs, nous ne nous sommes intéressés ici qu'à un seul cycle de reproduction ce qui peut également expliquer pourquoi nous ne détectons pas d'influence de la conductivité qui pourrait intervenir seulement après une exposition prolongée sur plusieurs cycles de mue. De plus, dans l'étude de Meyran (1997), ce sont des organismes autochtones qui sont utilisés pour les expériences, ils sont donc exposés à la conductivité du site depuis leur naissance et même depuis plusieurs générations, des phénomènes d'adaptation à des conditions locales ont ainsi pu se mettre en place, ce qui n'est pas le cas dans cette étude. En effet, dans ce travail, nous ne cherchons pas à appréhender l'impact des facteurs de confusion sur les populations locales et sur le long terme mais sur la durée d'un bioessai réalisé avec des organismes calibrés acclimatés au laboratoire afin d'adapter le protocole du test de reprotoxicité mis en place au laboratoire (Geffard et al. 2010) pour des expositions *in situ* lors desquelles les facteurs environnementaux ne sont pas contrôlés.

### 3.1.2.2 Fertilité

Nous observons un effet significatif de la taille sur le nombre d'ovocytes des femelles de *G. fossarum* (**Figure III-5**). Nous nous sommes donc affranchis de cet effet de la taille pour appréhender l'impact des facteurs environnementaux en travaillant sur les résidus du modèle linéaire entre le nombre d'ovocytes et la taille des femelles. Nous avons mis en évidence une diminution du nombre d'ovocytes standardisé pendant leur maturation entre les stades de mue C1 et C2. Ces résultats confirment les observations de Geffard et al. (2010) qui observent le même type de résultats. Une hypothèse permettant d'expliquer cette diminution du nombre d'ovocytes au cours de leur maturation a été avancée par Niehoff (2007), elle serait due à des contraintes physiques. En effet, avec l'augmentation du volume des œufs au cours de la vitellogenèse, la femelle manquerait de place pour permettre la maturation de l'ensemble des ovocytes, ce qui entraînerait la résorption d'une partie de ceux-ci. En revanche, nous n'observons



pas d'influence des facteurs environnementaux sur le nombre d'ovocytes, leur nombre final étant identique quelle que soit la température ou la conductivité.

### 3.1.2.3 Fécondité

Nous observons un effet significatif de la taille sur le nombre d'embryons des femelles de *G. fossarum* (**Figure III-7**). Cet effet de la taille sur la fécondité est cohérent avec plusieurs études portant sur différentes espèces de crustacés (Pöckl 1993 ; Thatje et al. 2004 ; Pöckl 2007 ; Kevrekidis et al. 2009). En s'affranchissant de cet impact majeur de la taille sur la fécondité, nous avons alors pu nous intéresser à l'influence des autres facteurs de confusion. Nous n'observons pas d'effet du stade de développement des embryons ce qui est cohérent avec l'étude de Geffard et al. (2010). Cependant, ces résultats vont à l'encontre des observations Pöckl (1993) qui montraient chez *G. fossarum* une diminution du nombre d'embryons au cours du développement embryonnaire. Mais, dans cette étude, la diminution du nombre d'embryons est basée sur la comparaison des deux stades de développement les plus extrêmes correspondant aux stades 2 et 5 de notre étude alors que dans notre cas, nous n'avons pas pris en compte le stade 5 car il s'agit alors d'organismes mobiles qui peuvent sortir du marsupium.

Dans deux études sur d'autres espèces de crustacés amphipodes, *Echinogammarus marinus* et *Crangonyx pseudogracilis* (Dick et al. 1998 ; Ford et al. 2003), une diminution du nombre d'embryons au cours du développement embryonnaire est également observée. Dick (1998) montre que cette diminution du nombre d'embryons est liée à l'éjection par la femelle des embryons non viables et non à une perte accidentelle d'embryons au cours du cycle de développement. Ceci est confirmé par Sutcliffe (1992) qui rapporte que les pertes d'embryons sont des processus volontaires de la femelle et non des pertes aléatoires. Cependant, nous pouvons penser que le fait que nous n'observons pas de diminution du nombre d'embryons dans notre étude est lié à des différences de stratégie de reproduction. En effet, nous observons dans notre étude une fécondité moyenne de 13,2 ( $\pm 5$ ) embryons par femelle ce qui est bien plus faible que celle observée chez *C. pseudogracilis* (environ 23 embryons par femelles) malgré le fait que les organismes soient de taille similaire dans les deux cas. Nous pouvons donc penser que dans notre cas, la plus faible quantité d'embryons par femelle est compensée par une survie embryonnaire forte tandis que chez d'autres espèces ou dans d'autres populations, les stratégies de reproduction seraient en faveur d'un plus grand nombre d'embryons au dépend de leur survie. Ces compromis entre le nombre d'embryons et la survie embryonnaire ont déjà été évoqué chez les gammarés (Pöckl 1993 ; 2007) et sont couramment observés chez diverses espèces.

Concernant les facteurs environnementaux, nous n'observons pas d'influence ni de la température ni de la conductivité sur la fécondité de *G. fossarum*. Ces facteurs ne semblent donc pas affecter la survie embryonnaire et la fécondité. Nos résultats vont à l'encontre des observations de Pöckl (1993) qui trouve une influence de la température sur la fécondité après avoir corrigé l'influence de la taille, avec une température optimale de 12,1 °C. Cependant, les expérimentations de Pöckl (1993) étant réalisées sur une très longue période puisque les individus exposés avaient au départ moins d'une semaine et étaient maintenus jusqu'à l'âge adulte, nous ne pouvons donc pas comparer nos résultats.

Il est intéressant de noter que nous observons un nombre d'ovocytes en fin de cycle égal au nombre d'embryons. Ce résultat est particulièrement pertinent dans un contexte écotoxicologique car la mesure de fertilité (à partir du stade de mue C2) représente ainsi un marqueur directement traduisible en terme de fitness étant donné qu'elle est égale à la fécondité qui sera réalisée au cycle de reproduction suivant.

### 3.1.3 Taux de croissance

Nous avons montré une influence significative de la température sur le taux de croissance de *G. fossarum*. Ces résultats sont en accord avec différents travaux qui trouvaient également un impact significatif de la température sur le taux de croissance des gammares (Pöckl 1995 ; Neuparth et al. 2002 ; Pöckl et al. 2003 ; Duran 2004). Nous trouvons une relation linéaire entre le taux de croissance et la température qui est cohérente avec les observations de Pöckl (1995).

Concernant la conductivité, nous n'observons pas de différences significatives entre les deux conductivités testées. Ces résultats sont contradictoires avec ceux de Kestrup et Ricciardi (2010) qui observent un ralentissement de la croissance lors d'une exposition à une faible conductivité (107,7  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Cet impact de la conductivité sur le taux de croissance lorsque celle-ci est faible peut s'expliquer par la faible disponibilité en calcium pour les organismes qui pourrait alors ralentir la fréquence de leurs mues. Dans notre étude, nous n'avons pu tester pour des raisons techniques (disponibilité du matériel, difficulté de production d'une eau à faible conductivité) que deux conductivités qui ne sont probablement pas assez contrastées pour observer un ralentissement de la croissance. En effet, dans l'étude de Kestrup et Ricciardi (2010), la diminution de la vitesse de la croissance est observée à partir d'une conductivité de 100  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  alors que la conductivité basse dans notre cas est de 200  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Il pourrait ainsi être utile de tester une plus grande gamme de valeurs de conductivité afin de pouvoir démontrer avec plus de certitude son absence d'impact ou au contraire modifier nos conclusions. En effet, contrairement

à l'étude du taux d'alimentation par exemple, pour laquelle l'absence d'impact de la conductivité était assez prévisible au regard de la littérature (Maltby et al. 2002), pour le taux de croissance les observations sont plus rares. De plus, lors des encagements *in situ* réalisés à large échelle pour la mesure du taux d'alimentation, nous constatons, en particulier dans les sites de référence, que de faibles conductivités, comparables à celle de l'étude de Kestrup et Ricciardi, sont assez fréquemment rencontrées.

### 3.2 Définition de gammes de valeurs de référence robustes aux facteurs environnementaux

Dans le but de limiter les cas de faux positifs et de faux négatifs liés à l'influence des facteurs de confusion lors de l'évaluation de la qualité d'un site, une approche possible consiste à définir des gammes de valeurs de référence incluant la variabilité saisonnière et spatiale observées dans des stations de référence (Hagger et al. 2008 ; Hanson et al. 2010). Cette approche a déjà été mise en place pour certains biomarqueurs (Xuereb et al. 2009a ; Hanson et al. 2010 ; Lacaze et al. 2011a) mais apparaît problématique pour les bioessais individuels. En effet, la variabilité naturelle, induite principalement par la température, est souvent très importante et la définition d'une gamme de référence pose un certain nombre de problèmes.

En effet, la gamme de réponses ainsi définie est très variable ce qui conduit à une perte importante de puissance statistique et donc à des difficultés pour détecter les effets des contaminations, les valeurs observées dans des sites potentiellement impactés étant la plupart du temps comprises dans la gamme de référence. Ainsi, dans notre étude, nous observons par exemple une variation de 60 % du taux d'alimentation (**Figure III-11 A**), de 50 % de la durée du cycle de reproduction (**Figure III-13**) ou encore de 60 % des taux de croissance (**Figure III-14**) dans les sites de référence. L'utilisation des traits de vie est alors généralement limitée à des comparaisons sur des zones géographiques de taille limitée (*e.g.*, approche amont – aval) et sur une courte période de temps afin de limiter la variabilité entre les sites liée aux caractéristiques physico-chimiques.

Cependant, même dans ces conditions, les facteurs de confusion peuvent être à l'origine de faux positifs comme le souligne notre cas d'étude avec la mesure du taux d'alimentation dans le Lot et l'Amous. Par exemple, dans le cas d'étude du Lot, les variations du taux d'alimentation observées entre le site de référence *Upstream Lot* et le site du *Riou Vion* sont entièrement expliquées par les différences locales de température. Nous observons le même profil dans le cas

du bassin versant de l'Amous pour les différences observées entre le site de référence *Tributary* et le site *Upstream – 1500 m*.

De plus, dans cette démarche où les comparaisons sont faites entre un site de référence unique et chacun des sites potentiellement impactés, la puissance statistique des tests est là encore généralement très limitée étant donné que le nombre d'observations sur le site de référence local est souvent faible (Hanson et al. 2010, Osenberg 1994, Hoeven 1998). Par exemple, dans le cas d'étude du Lot, les valeurs de *FI* - qui tiennent donc compte de l'influence de la température sur le taux d'alimentation - mesurées dans les sites de *Decazeville* en automne et de *Downsteam Lot* en hiver nous permettent de conclure à des inhibitions significatives de l'alimentation dans ces sites lorsque nous les comparons à notre distribution de référence réalisée sur un grand nombre de sites mais pas lorsque nous les comparons seulement au site de référence choisi pour cette étude en raison d'un manque de puissance du test utilisé (*Upstream Lot*) (**Figure III-16**).

Une alternative possible pour pouvoir analyser la réponse des traits de vie lors de conditions variables d'exposition est de modéliser l'influence des facteurs de confusion sur ces traits afin de corriger les réponses obtenues pour les rendre indépendantes des conditions d'exposition (Maltby et al. 2002 ; Moreira et al. 2006 ; Krell et al. 2011). Pour cela, nous avons utilisé la même approche que celle proposée par Moreira et al. (2006) chez le crustacé décapode *Carcinus maenas* ou par Krell et al. (2011) chez le mollusque gastéropode *Hydrobia ulvae* pour la mesure du taux d'alimentation : nous avons corrigé nos observations *in situ* à partir des relations entre la température et la réponse de nos traits déterminée au laboratoire.

### 3.2.1 Taux d'alimentation

Pour le taux d'alimentation, nous avons ainsi pu proposer un indice (*FI*, **Eq III-11**) qui tient compte de l'influence de la température. *Via* des encagements *in situ* dans un grand nombre de sites de référence, nous avons alors pu définir une gamme de valeurs de référence de ces *FI* beaucoup moins variable qu'avec l'utilisation des mesures directes de l'alimentation et qui de plus ne présente pas de différence significative entre sites (**Figure III-11**). Cette validation dans un grand nombre de sites de référence est indispensable pour avoir une puissance statistique suffisante lors de la comparaison avec des sites potentiellement impactés (Hanson et al. 2010). Une autre possibilité aurait été de modéliser directement à partir d'observations *in situ* dans des sites de référence l'influence des facteurs de confusion (Maltby et al. 2002). Dans notre cas, nous observons des résultats proches pour les deux méthodes (**Figure III-12**). Cependant, lorsque la

mesure des réponses individuelles est comparable entre des conditions de laboratoire et des expositions sur le terrain, la première approche peut être préférable. En effet, au laboratoire, les facteurs de confusion étudiés sont bien caractérisés alors que, sur le terrain, il est difficile de discriminer les effets des différents facteurs de confusion en raison des corrélations entre eux qui peuvent être nombreuses.

Lors du diagnostic de l'impact d'une source de contamination ponctuelle, la comparaison à une gamme de référence externe tenant compte de la variabilité environnementale permet également de valider la pertinence des sites choisis comme référence pour l'étude d'impact. En effet, il est ainsi possible de comparer les sites amont à la gamme de référence et de vérifier si le milieu n'est pas déjà impacté avant la source de contamination étudiée. Par exemple, dans le cas d'étude du Lot sur la mesure du taux d'alimentation, il est intéressant de noter que les valeurs de *FI* observées dans le site de référence *Upstream Lot* aux différentes saisons sont bien comprises dans la gamme de référence externe. En revanche, pour le site de *Decazeville*, considéré comme site de référence dans des études précédentes (Morin et al. 2008 ; Gust et al. 2011b), nous voyons que les valeurs de *FI* sortent significativement de la gamme de référence pour chaque saison malgré l'absence de contamination métallique. Ces observations sont cohérentes avec celles de Lacaze et al. (2011b) qui concluent également à une forte induction de biomarqueurs de génotoxicité sur ce site liée probablement au fait qu'il se trouve en zone urbaine. Or, si nous avons utilisé ce site comme référence en raison de sa faible contamination métallique, notre diagnostic aurait été complètement différent et nous n'aurions détecté aucune inhibition significative de l'alimentation dans les autres sites. Ce cas de figure souligne bien la difficulté de choisir des sites de référence pour ce type d'approches comparatives (*e.g.*, comparaison entre un site amont et un site aval) et l'intérêt d'utiliser des références externes indépendantes pour évaluer de manière pertinente la qualité chimique de l'eau (Barata et al. 2007 ; Hanson et al. 2010).

### 3.2.2 Taux de croissance

Nous avons initié une approche similaire pour la mesure du taux de croissance avec le calcul d'un indice (*GI*, **Eq III-13**) qui nous permet d'intégrer l'influence de la température sur nos observations *in situ*. Des encagements dans un site de référence ont été réalisés à différentes saisons et nous constatons que notre indice nous permet bien de corriger les différences saisonnières observées sur le taux de croissance des individus (**Figure III-14 B**). Cependant, nous n'avons pas encore pu réaliser d'encagements *in situ* sur une large échelle spatiale avec une grande gamme de conditions environnementales afin de proposer la définition d'une gamme de

référence sur la croissance. Cette étape est indispensable avant de pouvoir proposer ce bioessai sur la croissance pour des études de biomonitoring à large échelle spatiale et temporelle (Hanson et al. 2010). Il pourrait également être pertinent d'étudier plus en détail l'influence de la conductivité afin de pouvoir définir une gamme de valeurs de référence du taux de croissance en absence de facteur de stress toxique la plus robuste possible.

### 3.2.3 Test de reprotoxicité

Geffard et al. (2010) ont proposé un test de reprotoxicité utilisant différents marqueurs relatifs aux différents processus de reproduction chez *G. fossarum* (vitellogénèse et embryogénèse). Nous avons vu que la fertilité et la fécondité n'étaient pas influencées par la température, ces marqueurs pourraient donc être utilisés quelles que soient les conditions environnementales et le test proposé par Geffard et al. (2010) ainsi appliqué sur le terrain. Mais, une telle approche ne serait pas pertinente pour des démarches de biomonitoring à large échelle. En effet, Geffard et al. (2010) propose une exposition de 21 jours de femelles en fin de cycle de reproduction (stade de mue D2) avec une mesure des différents paramètres à la fin de l'exposition. Cependant, les facteurs de confusion, en particulier la température, jouent un rôle clé sur la durée des différents stades de mue (**Figure III-4**). Au laboratoire, une exposition de 21 jours à 12°C permet d'obtenir à la fin du bioessai des femelles présentant des niveaux d'avancement comparables dans leur cycle de reproduction, les femelles étant en grande majorité au stade C2. Il est alors possible de comparer les marqueurs entre les différentes conditions. Lors d'une exposition *in situ* à large échelle, après 21 jours d'encagements, les femelles seraient, en fonction de la température observée dans les différents sites, dans des niveaux d'avancement différents. Or, nous avons vu au laboratoire qu'à partir du stade C2 (**Figure III-6**), le nombre d'ovocytes par femelle diminuait significativement et dans un cas de figure où en fonction des sites les femelles seraient dans des stades de mues différents, les comparaisons ne seraient plus possibles. Ceci est d'autant plus problématique que lors de la comparaison à large échelle spatiale de sites de référence et de sites potentiellement impactés, les sites de référence sont la plupart du temps situés en amont des cours d'eau et présentent généralement des températures plus froides. C'est ce que nous observons par exemple durant l'étude à large échelle du taux d'alimentation (**Tableau III-2 ; Tableau III-4**).

Concernant la fécondité, nous n'avons pas observé d'influence de la température ni du stade de développement sur le nombre d'embryons par femelle (**Figure III-8**). Toutefois, Ford et al. (2003) montrent chez le crustacé amphipode *Echinogammarus marinus*, des différences

importantes de sensibilité des embryons en fonction des stades de développement embryonnaire. Il est donc, là aussi, important de comparer des femelles ayant des embryons présentant le même degré de développement. De plus, le test de reprotoxicité développé par Geffard et al. (2010) propose également l'étude de biomarqueurs sub-individuels en lien avec la reproduction tels que les anomalies embryonnaires ou la mesure des surfaces ovocytaires. Pour ces biomarqueurs, le degré d'avancement dans le cycle de mue a aussi une influence significative, en particulier en ce qui concerne la surface ovocytaire. Il en est de même pour la mesure de vitellogénine (Jubeaux et al., submitted.). En effet, selon le stade de mue, la croissance ovocytaire et la production de vtg, qui sont étroitement liées, sont variables puisque le processus de vitellogénèse sera plus ou moins avancé (Geffard et al. 2010 ; Jubeaux et al. submitted).

Pour proposer un test de reprotoxicité *in situ* robuste aux variations des facteurs environnementaux, la modélisation de l'influence des facteurs de confusion sur la durée du cycle de reproduction nous permet, en fonction de la température observée dans chacun des sites, d'adapter la durée de l'exposition dans le but de disposer, à la fin de l'encagement, de femelles dans des stades de mue homogènes et de pouvoir comparer les sites entre eux. Il est alors possible de définir, comme pour le taux d'alimentation, des gammes de valeurs de référence sur un nombre important de sites de référence pour chacun de nos marqueurs (fertilité, vtg, surface ovocytaires, fécondité, anomalies embryonnaires). Pour le test au laboratoire à 12°C, la durée d'exposition de 21 jours avait été choisie car le stade C2 dans lequel se trouvent les femelles à la fin de l'exposition est le plus pertinent pour la lecture du test. En effet, d'un point de vue pratique, le fait de se trouver ainsi en milieu de cycle de reproduction permet de manipuler des organismes pour lesquels les marqueurs sont plus facilement et précisément mesurables. De plus, à partir du stade C2, le nombre d'ovocytes est constant jusqu'à la fécondation, le comptage de ceux-ci à ce stade est donc représentatif de la fécondité qu'aura la femelle lors de son cycle de reproduction suivant. Ceci est confirmé par nos expérimentations au laboratoire puisque nous observons un nombre comparable d'embryons et d'ovocytes à partir du stade C2.

A partir d'encagements sur le terrain dans deux sites de référence à différentes saisons, nous constatons que les durées du cycle de reproduction sont très proches des prédictions du modèle au laboratoire (**Figure III-13**). Même s'ils ont été réalisés uniquement sur deux sites lors de deux saisons seulement, ces résultats confirment le bon potentiel de notre modèle pour prédire le temps nécessaire pour obtenir des femelles dans un stade de mue donné mais ils doivent encore être confirmés pour une plus grande gamme de conditions physico-chimiques et à sur une plus grande échelle spatiale. Ainsi, des encagements à large échelle, en adaptant la durée d'exposition à la température de chaque site, ont été menés récemment dans les mêmes sites que

ceux utilisés pour la mesure du taux d'alimentation avec comme objectif d'obtenir dans chaque site une majorité de femelles en stade C2. Nous avons alors pu récupérer des femelles présentant un degré d'avancement homogène dans leur cycle de reproduction pour chacun des sites et la définition de gamme de valeurs de référence sur les différents marqueurs est ainsi actuellement en cours au sein du laboratoire d'écotoxicologie de l'IRSTEA (Jubeaux et al. in prep).

Toutefois, le développement de ce test de reprotoxicité soulève également la question de l'importance de la durée d'exposition des organismes. En effet, la mise en œuvre de ce test implique des différences de temps d'exposition des organismes qui peuvent être importantes si les différences de température entre les sites sont fortes. Or, il est souvent avancé comme un principe de base en écotoxicologie que pour pouvoir comparer les réponses entre différentes concentrations d'exposition au laboratoire ou différents sites d'étude, il est nécessaire de respecter des temps d'exposition communs des organismes afin d'obtenir des niveaux d'imprégnation chimique équivalents. Cependant, ce principe, bien que logique pour des expositions au laboratoire où le degré d'exposition est généralement constant, peut être plus remis en question lors d'étude sur le terrain. En effet, dans les milieux aquatiques, le degré de contamination chimique est rarement constant (*e.g.*, pics ponctuels de pesticides, concentration des contaminants durant les périodes d'étiage). Lors de l'encagement d'organismes sur le terrain, il est alors possible de ne pas observer d'impacts significatifs lors d'une exposition des organismes à une période donnée puis d'en observer quelques semaines ou moins plus tard si un pic de contamination se produit durant la campagne, ceci indépendamment de la durée d'exposition et ne signifiant pas forcément que le site n'était pas contaminé puis l'est devenu soudainement. Il peut ainsi s'avérer pertinent d'utiliser des temps d'expositions variables qui permettent d'obtenir des organismes comparables en ce qui concerne le processus physiologique étudié plutôt que de vouloir comparer des organismes dans des stades de développement différents ce qui occasionne souvent une grande variabilité de la gamme de valeurs de référence du marqueur et donc une perte importante de puissance statistique lors des tests statistiques (augmentation des risques de faux-positif et de faux-négatifs) ; tout en gardant à l'esprit que, bien que déjà beaucoup plus intégrateur de la toxicité potentielle d'un site qu'un dosage chimique ponctuel par exemple, un bioessai demeure une mesure dont la portée se limite à la période d'exposition et qu'il est nécessaire de reproduire ces expositions à différentes périodes de l'année afin d'évaluer de manière robuste la qualité d'un site. Cette variabilité du degré de contamination d'un même site se retrouve dans notre étude à large échelle temporelle sur le taux d'alimentation. En effet, bien que réalisés sur les mêmes sites, nous observons des impacts beaucoup plus importants dans les déploiements en été durant les campagnes de juin 2010 qu'à l'automne en octobre 2009.



### 3.3 Sensibilité des marqueurs dans des sites potentiellement impactés

Dans le but d'intégrer la complexité des conditions d'expositions rencontrées sur le terrain dans les démarches d'évaluation de la qualité des milieux aquatiques, les bioessais *in situ* avec des gammares apparaissent comme des outils très prometteurs. Dans cette optique, nous avons réalisé des encagements *in situ* dans un grand nombre de sites potentiellement impactés. Dans ce manuscrit, seul le taux d'alimentation a été mesuré dans des sites contaminés, mais le même type d'approche est également en cours de réalisation pour les deux autres bioessais présentés dans ce chapitre au laboratoire d'écotoxicologie de l'IRSTEA.

L'étude du taux d'alimentation chez les gammares est particulièrement intéressante car la mesure de la consommation de feuilles est possible directement sur le terrain contrairement aux protocoles développés chez d'autres invertébrés aquatiques tels que des bivalves (Hagger et al. 2008), des gastéropodes (Krell et al. 2011), des daphnies (Barata et al. 2007 ; Damásio et al. 2008), des décapodes (Moreira et al. 2006) ou encore des chironomes (Soares et al. 2005) pour lesquels la mesure de l'alimentation est réalisée lors de post-expositions au laboratoire et qui sont malgré tout sujet à l'influence des facteurs de confusion lors de la période d'exposition. Le test d'alimentation chez *G. fossarum* apparaît sensible à de multiples contextes de contamination. En effet, nous observons des inhibitions significatives de l'alimentation lors de déploiements dans des sites présentant des contaminations d'origine agricole, industrielle, minière ou encore urbaine (**Figure III-15** ; **Figure III-16**). Ainsi, 37 % des déploiements réalisés dans des sites potentiellement impactés présentent une inhibition significative de l'alimentation lors de l'étude à large échelle (**Figure III-15**). Ces résultats sont cohérents avec les observations de diverses études au laboratoire ou sur le terrain (*cf.* **Tableau II-2**) qui démontrent des altérations de l'alimentation lors de l'exposition à une grande variété de contaminants.

Le calcul de l'indice *FI* nous permet de comparer l'impact des contaminations dans le temps et l'espace. Nous observons une variabilité saisonnière importante des impacts sur l'alimentation. En effet, seulement 7% des déploiements sont impactés lors de notre campagne d'encagement en automne alors que 54% des déploiements sont impactés lors de celle réalisée en été alors qu'il s'agit dans les deux cas des mêmes sites d'étude. De telles variations saisonnières sont également observées par Maltby et al. (2002) qui expliquent ces différences par les fluctuations du débit des cours d'eau selon les saisons qui peuvent être à l'origine d'une dilution ou au contraire d'une concentration de la contamination. Il est également possible d'interpréter ces variations de l'impact par les variations temporelles de la contamination chimique des sites, en particulier dans les cas de contaminations liées à l'agriculture qui sont généralement regroupées à

certaines saisons (*e.g.*, pics de pesticides). Etant donné que nous utilisons des organismes calibrés provenant tous de la même population et acclimatés au laboratoire qui sont ensuite transplantés (biomonitoring actif), nous mesurons uniquement les impacts toxiques de la contamination et nous pouvons écarter l'hypothèse que ces variations soient expliquées par des modifications de la sensibilité des organismes au cours du temps comme cela peut être le cas lors de bioessais réalisés sur des organismes autochtones (biomonitoring passif) (Hagger et al. 2008).

## 4 Conclusion

L'utilisation de bioessais *in situ* via la transplantation d'organismes calibrés offre des outils très intéressants pour l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques (Baird et al. 2007a). Nous avons mis en place une méthodologie innovante basée sur une double approche comprenant des expérimentations au laboratoire et sur le terrain ainsi qu'une démarche de modélisation pour améliorer l'interprétation des bioessais, notamment lorsque des études sont réalisées dans le temps et sur une large aire géographique. En corrigeant l'influence de la température, qui apparaît pour chacun de nos marqueurs comme étant le principal facteur de confusion, nous sommes parvenu à définir des gammes de valeurs de référence en absence de pression toxique en tenant compte de l'influence des facteurs environnementaux. Il est alors possible de comparer les effets observés dans des sites à risque à ces distributions de référence. Cette démarche augmente ainsi la spécificité (faux positifs) et la sensibilité (faux négatifs) des tests réalisés dans des études sur le long terme et à large échelle grâce d'une part à la prise en compte des facteurs de confusion mais aussi d'autre part grâce à un gain important de puissance statistique (*e.g.*, définition de gammes de valeurs de référence externes à partir d'un large panel de sites).

Les bioessais basés sur la mesure de marqueurs individuels sont reconnus comme des outils pertinents d'un point de vue écologique car les effets observés peuvent être intégrés dans des modèles de dynamique de population qui permettent de proposer une interprétation à un niveau d'intégration supérieur. Etant donné que les gammares sont des espèces clés dans les écosystèmes aquatiques, les perturbations de la dynamique des populations de ces espèces peuvent également être corrélées à des impacts sur le fonctionnement de l'écosystème (*e.g.*, processus de décomposition de la matière organique, perturbation des chaînes trophiques). D'un autre côté, les impacts au niveau des marqueurs individuels peuvent également être corrélés avec les impacts observés au niveau de biomarqueurs sub-individuels plus spécifiques. Par exemple, chez *G. fossarum*, l'inhibition du taux d'alimentation a pu être corrélée avec des perturbations de l'activité nerveuse (*e.g.*, diminution de l'activité de l'acétylcholinestérase) (Xuereb et al. 2009b) ou

la perturbation de la reproduction avec des impacts génotoxiques (Lacaze et al. 2011c). Cette position centrale des marqueurs individuels entre les biomarqueurs et la dynamique des populations et des écosystèmes nous offre l'opportunité de nous inscrire dans un schéma d'évaluation multi-échelle selon la même philosophie que celui proposé par la théorie des *adverse outcome pathways* pour les approches prédictives (Ankley et al. 2010 ; Kramer et al. 2011).

L'utilisation d'organismes calibrés par encagement permet un meilleur diagnostic de la toxicité des milieux qu'avec l'étude des organismes autochtones mais en perdant en contrepartie des informations sur l'impact de la contamination sur les organismes de communautés en place. En effet, il est illusoire de croire que toutes les sources d'incertitudes (*e.g.*, organismes calibrés *vs* autochtones, variabilité entre individus, entre populations ou entre espèces, interactions entre organismes...) peuvent être modélisées dans de telles approches basées sur l'observation d'organismes calibrés transplantés dans des contextes spécifiques de contamination. Cependant, Forrow and Maltby (2000) ont montré, lors d'une étude comparative entre un site amont et un site aval d'une source de contamination (le passage d'une autoroute), que des perturbations observées chez des *Gammarus* transplantés lors de bioessais *in situ* (*e.g.*, réduction de l'activité alimentaire, de la survie) pouvaient être corrélées à des impacts sur les *Gammarus* autochtones (*e.g.*, diminution des densités) et à des impacts au niveau de l'écosystème (*e.g.*, diminution de 60 % des processus de décomposition) même dans des écosystèmes pourtant dépourvus de gammare autochtones. Cette étude illustre bien le fort potentiel des bioessais *in situ* avec des organismes transplantés chez les *Gammaridae* en tant qu'indicateurs pertinents de la qualité écologique des milieux aquatiques. Notre démarche n'a pu être pour le moment validée dans son ensemble que pour l'étude du taux d'alimentation (Coulaud et al. 2011 , **Annexe 1**) mais l'ensemble des trois marqueurs que nous avons étudié représentent des outils très prometteurs pour les démarches de biomonitoring à large échelle de temps et d'espace.





## CHAPITRE IV

# Des effets individuels aux effets populationnels : développement et utilisation des modèles de dynamique de population chez *G. fossarum* et *P. antipodarum*

Le **Chapitre IV** regroupe l'ensemble des travaux relatifs au développement des modèles de dynamique de population pour les deux espèces utilisées dans ce travail : le crustacé amphipode *Gammarus fossarum* et le mollusque gastéropode *Potamopyrgus antipodarum*. Les objectifs de ce chapitre sont 1- de démontrer **l'importance de la prise en compte des différences d'histoire de vie** entre les espèces pour l'extrapolation des effets individuels au niveau de la population et 2- de souligner **la variabilité saisonnière de la sensibilité des populations**.

Après une courte introduction, ce chapitre présente dans une première partie la construction des modèles de dynamique de population pour les deux espèces avec :

1- **la présentation des résultats des différentes expérimentations nécessaires à la paramétrisation des modèles** : les **suivis démographiques** mensuels (*e.g.*, estimation des densités, de la distribution en taille des organismes...) et **l'estimation des différents traits de vie** et de leur **variabilité saisonnière** (*e.g.*, reproduction, croissance).

2- **la calibration et l'analyse des modèles de dynamique de population hors contamination** (estimation des paramètres, calcul de différentes caractéristiques démographiques, analyses d'élasticités) pour chacune des espèces.

Dans une deuxième partie, nous avons voulu illustrer comment ces modèles peuvent être utilisés pour le diagnostic de la qualité des milieux aquatiques. Pour cela, nous nous sommes intéressés à un cas d'étude : l'impact d'une station d'épuration sur la dynamique de population de *G. fossarum* avec dans un premier temps la présentation des effets observés au niveau individuel sur la survie et la reproduction puis dans un deuxième temps leur **extrapolation en terme d'impact au niveau populationnel**, l'accent étant mis sur la variabilité saisonnière de l'impact populationnel.



## 1 Introduction

L'évaluation de l'impact des contaminants sur des niveaux d'organisation biologique pertinents d'un point de vue écologique tels que les populations constitue actuellement une priorité pour la communauté des écotoxicologues, en particulier en raison des demandes réglementaires de plus en plus importantes (*e.g.*, DCE, REACH) qui ont pour objectif affiché de protéger les populations naturelles et les écosystèmes. Cependant, l'étude directe de ces niveaux d'organisation biologique est généralement très complexe étant donné les nombreux facteurs biotiques et abiotiques qui sont à prendre en compte (*e.g.*, facteurs environnementaux, habitat, compétition, prédation, délimitation spatiale des populations). Certaines méthodes expérimentales ont été proposées (*e.g.*, études des populations en mésocosmes ou microcosmes) mais elles demandent généralement des moyens techniques et financiers importants et leurs analyses sont généralement délicates (*e.g.*, faible nombre de réplicats, variabilité importante des réponses biologiques, nombre de scénarios de contamination testable limité).

A partir de ce constat, au début des années 1990, les modèles de dynamique de population ont commencé à être proposés comme étant de bons outils pour appréhender l'impact des contaminants sur les populations *via* l'extrapolation des effets observés au niveau individuel sur les traits de vie (*e.g.*, reproduction, croissance, survie) (Barthouse et al. 1987 ; Caswell 1996 ; Levin et al. 1996 ; Grimm 1999). Issus à l'origine du champ de l'écologie traditionnelle, ils sont ainsi de plus en plus couramment utilisés en écotoxicologie (Klok and De Roos 1996 ; Miller et al. 2007 ; Charles et al. 2009 ; Pedersen et al. 2009 ; Hanson 2011a) et commencent à être acceptés dans les démarches réglementaires (*e.g.*, réglementations sur les pesticides : (Forbes et al. 2009 ; Thorbek et al. 2009 ; Wang and Grimm 2010).

Cependant, comme nous l'avons souligné dans le premier chapitre de ce manuscrit, les modèles développés jusqu'à présent présentent encore un certain nombre de limites, notamment en terme de pertinence environnementale, ce qui ralentit leur application, en particulier pour les démarches de diagnostic de la qualité des milieux aquatiques. Ainsi, leur utilisation s'est jusqu'à présent généralement limitée à des approches prédictives des effets d'une ou plusieurs substances au laboratoire sur des espèces modèles (*e.g.*, le crustacé *Daphnia magna*, le poisson *Danio rerio*).

Nous avons eu pour objectif dans ce travail de développer des modèles de dynamique de population qui nous permettent de proposer des informations et des solutions pour deux de ces limites : l'importance des différences d'histoire de vie entre les espèces et de leur variabilité saisonnière dans la sensibilité des populations, dans le but notamment de proposer des modèles



utilisables aussi bien pour des démarches prédictives que de diagnostic. Pour répondre au premier objectif, nous nous sommes intéressés à deux espèces couramment rencontrées dans les cours d'eau français et européens et présentant des cycles de vie très contrastés (*cf.* **Chapitre II**) : le crustacé amphipode *Gammarus fossarum* et le mollusque gastéropode *Potamopyrgus antipodarum*. Pour répondre au second, nous avons suivi ces populations mensuellement tout au long d'une année afin d'estimer la variabilité saisonnière des traits de vie et paramétrer ainsi un modèle de dynamique de population qui tienne compte de ces variations.

## 2 Construction du modèle chez *Gammarus fossarum*

### 2.1 Structure du modèle mathématique

La population modélisée est une population de *G. fossarum* située la rivière Ardières au niveau de la commune des Ardillats (longitude : 04°31' 15.9" E, latitude : 46°11' 11.8" N, Rhône, France, *cf.* **Chapitre II**).

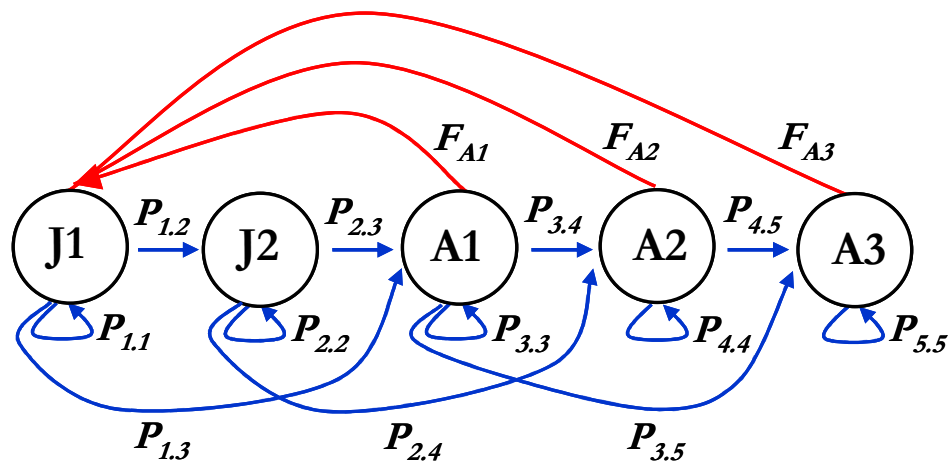
Le cycle de vie des gammars n'est pas rythmé par des stades de développement successifs comme cela est observé fréquemment chez de nombreuses espèces d'insectes par exemple (*i.e.*, larve, puppe, nymphe). De plus, l'estimation de l'âge des individus est impossible chez cet organisme étant donné que son développement est étroitement lié aux conditions physico-chimiques du milieu (*e.g.*, température de l'eau) et qu'il n'existe pas d'indicateur précis de l'âge d'un individu (comme peut l'être l'analyse des otolithes chez les poissons par exemple). Nous avons donc opté pour un modèle de dynamique de population de type Leslie structuré en classes de taille (Leslie 1948 ; Lefkovitch 1965 ; Caswell 1996 ; Caswell 2001) afin de décrire le fonctionnement de cette population. Le choix d'un modèle discret en classes de taille nous a semblé bien adapté pour l'étude d'une population de gammars étant donné que, comme nous l'avons notamment vu dans le **Chapitre III**, les traits de vie (*e.g.*, reproduction, croissance) et les processus métaboliques sont généralement fortement corrélés à la taille de l'organisme chez cette espèce (Rinke and Vijverberg 2005). De plus, d'un point de vue écotoxicologique, la sensibilité aux contaminants est souvent différente entre les classes d'individus (*e.g.*, juvéniles *vs* adultes) et les réponses au niveau de la population vont donc dépendre des effets sur chacune des classes (Caswell 2001 ; Chaumot et al. 2003b ; Emlen and Springman 2007). Par exemple, une diminution de la survie de 30% n'aura pas forcément les mêmes conséquences au niveau populationnel si elle intervient sur des femelles en reproduction ou sur des juvéniles. Ainsi, ces

modèles nous ont semblé particulièrement pertinents pour cette étude, que ce soit pour rester le plus fidèle possible à l'écologie et au cycle de vie des gammares que pour l'extrapolation des effets observés lors des bioessais individuels au niveau populationnel.

Les suivis démographiques ainsi que les différentes expérimentations menées sur cette population (dont les résultats sont détaillés dans la suite de cette partie) nous ont guidé dans la définition des différentes classes de taille. Un compromis a ainsi été fait pour d'une part décrire au mieux les processus physiologiques et le fonctionnement de la population en définissant plusieurs classes de juvéniles et d'adultes, et d'autre part conserver un nombre suffisant d'organismes, au moins à certaines saisons, dans chacune des classes pour une estimation suffisamment précise des caractéristiques démographiques relatives à chaque classe. Ainsi, nous avons structuré la population en cinq classes de tailles : deux classes de juvéniles et trois classes d'adultes. La première classe (**J1**) correspond à des juvéniles ayant une taille supérieure ou égale à la taille à la naissance et strictement inférieure à 3,5 mm ; la deuxième classe (**J2**) correspond à des juvéniles ayant une taille supérieure ou égale à 3,5 et strictement inférieure à 5,2 mm. Cette taille de 5,2 mm correspond à la taille à la maturité sexuelle des femelles que nous avons estimée pour cette population de gammares lors des suivis démographiques (dont les résultats seront présentés par la suite) ; la troisième classe (**A1**) correspond aux petites femelles ayant une taille supérieure ou égale à 5,2 mm et strictement inférieure à 6 mm ; la quatrième classe (**A2**) correspond à des femelles ayant une taille supérieure ou égale à 6 et strictement inférieure à 7 mm et enfin la cinquième classe (**A3**) correspond à des femelles ayant une taille supérieure ou égale à 7 mm.

Nous avons opté pour trois classes d'adultes afin de prendre en compte dans notre modèle l'influence de la taille sur la fécondité des femelles de *G. fossarum*. En effet, plusieurs études ont souligné une augmentation de la fécondité des femelles avec l'augmentation de la taille des organismes (*cf.* **Chapitre III**). De plus, nous avons opté pour cinq classes de taille afin de pouvoir prendre en compte l'influence de la température sur les taux de croissance ce qui n'aurait pas été possible avec l'utilisation d'un modèle présentant seulement une classe de juvéniles et une classe d'adultes. Ainsi, lors des mois chauds, la probabilité que des organismes grandissent de plusieurs classes de taille entre deux mois successifs seront élevées et beaucoup plus faibles lors des mois d'hiver. Enfin, nous avons voulu être cohérents au regard de la taille des organismes utilisés lors des bioessais individuels afin de pouvoir intégrer facilement les effets observés dans le modèle. Ainsi, les organismes de la classe **J1** correspondent à ceux utilisés pour les bioessais sur la croissance et les femelles de la classe **A3** aux femelles utilisées pour les bioessais de reprotoxicité.

A partir de ces différentes classes, nous avons pu définir le cycle de vie des gammares de cette population (**Figure IV-1**) :



**Figure IV-1** : Graphe du cycle de vie de *G. fossarum* avec une discrétisation en cinq classes de taille.

Les  $F_i$  correspondent à la fécondité de chacune des classes d'adultes, les  $P_{ij}$  aux taux de passage de la classe  $i$  à la classe  $j$  pour chaque individu (lorsque  $i = j$ , il s'agit donc du taux d'individus qui restent dans la même classe) entre deux mois successifs

Nous avons opté pour un pas de temps mensuel. Nous avons ainsi paramétré un modèle pour chacun des mois de notre année de suivi ce qui nous a permis de tenir compte de la variabilité saisonnière sur la dynamique de la population étudiée. Seules les femelles ont été prises en compte dans le modèle, ce qui est généralement le cas dans les modèles de dynamique de population.

## 2.2 Données biologiques

### 2.2.1 Suivi de terrain mensuel

Un suivi sur le terrain de la population comprenant un suivi démographique ainsi qu'un suivi de l'état reproducteur des femelles a été réalisé mensuellement entre novembre 2008 et novembre 2009 suivant les protocoles décrits dans le **Chapitre II** avec pour objectifs de :

- suivre l'évolution des densités et des structures en taille des organismes au cours de l'année.
- suivre l'évolution de l'activité de reproduction des femelles au cours de l'année (*e.g.*, fécondité, pourcentage de femelle en reproduction...).

### 2.2.1.1 Conditions environnementales

Durant le suivi de population, la température de l'eau était mesurée en continu tout au long de l'année. Le **Tableau IV-1** récapitule les dates des différents relevés mensuels, ainsi que la température moyenne de l'eau mesurée entre la date du relevé et le relevé suivant. Le nombre de jours entre deux suivis est également indiqué. En effet, pour des raisons pratiques d'organisation lors de sorties de terrain, les suivis n'ont pas toujours été réalisés à intervalles fixes et nous avons, lors de l'analyse de nos modèles, dû prendre en compte ces différences pour pouvoir comparer les mois ou les saisons entre eux.

### 2.2.1.2 Suivi démographique

Le suivi démographique mensuel nous a permis :

- d'estimer les densités et la distribution en taille des individus
- de déterminer la taille à la naissance, la taille à la maturité sexuelle et la taille maximale des femelles
- d'estimer le pourcentage de femelles en reproduction dans la population

L'évolution des densités ainsi que de la répartition des individus dans chacune des classes de taille du modèle est représenté sur la **Figure IV-2**. Pour les classes **J1** et **J2**, les densités correspondent à la moitié du nombre de juvéniles (hypothèse d'une sex-ratio équilibré avec autant de mâles que de femelles) et pour les classes **A1**, **A2** et **A3** au nombre total de femelles. Nous observons de fortes variations saisonnières avec des pics d'abondance à la sortie de l'été et durant l'automne et de très faibles densités en fin d'hiver et au printemps. Lors de ces périodes de faibles densités, la proportion de juvéniles est fortement diminuée et la population se retrouve composée en grande partie d'adultes contrairement à l'été et à l'automne où le nombre de juvéniles est beaucoup plus important.

A partir de ces suivis, nous avons pu estimer une taille à la naissance de 1,83 (0,34) mm ; une taille à la maturité sexuelle de 5,19 (0,43) mm et une taille maximale de 8,19 (0,41) mm pour cette population. Ces trois mesures se sont révélées relativement constantes tout au long de

l'année de suivi et sont cohérentes avec les observations de Roux (1970) sur une autre population de *G. fossarum*.

**Tableau IV-1 : Récapitulatif des dates des différents suivis mensuels de *G. fossarum* ainsi que de la température moyenne de l'eau mesurée pour chacun des mois.**

Code mois	Période du suivi	Durée (jours)	Température moyenne (°C)
<b>Novembre 2008</b>	19/11/2008 au 16/12/2008	28	6,45
<b>Décembre 2008</b>	16/12/2008 au 20/01/2009	35	5,28
<b>Janvier 2009</b>	20/01/2009 au 18/02/2009	29	6,21
<b>Février 2009</b>	18/02/2009 au 18/03/2009	28	7,41
<b>Mars 2009</b>	18/03/2009 au 14/04/2009	27	10,13
<b>Avril 2009</b>	14/04/2009 au 12/05/2009	28	11,93
<b>Mai 2009</b>	12/05/2009 au 23/06/2009	42	15,91
<b>Juin 2009</b>	23/06/2009 au 21/07/2009	28	15,21
<b>Juillet 2009</b>	21/07/2009 au 12/08/2009	22	15,62
<b>Août 2009</b>	12/08/2009 au 22/09/2009	41	14,64
<b>Septembre 2009</b>	22/09/2009 au 14/10/2009	22	12,56
<b>Octobre 2009</b>	14/10/2009 au 18/11/2009	35	8,45
<b>Novembre 2009</b>	18/11/2009 au 18/12/2009	30	8,31

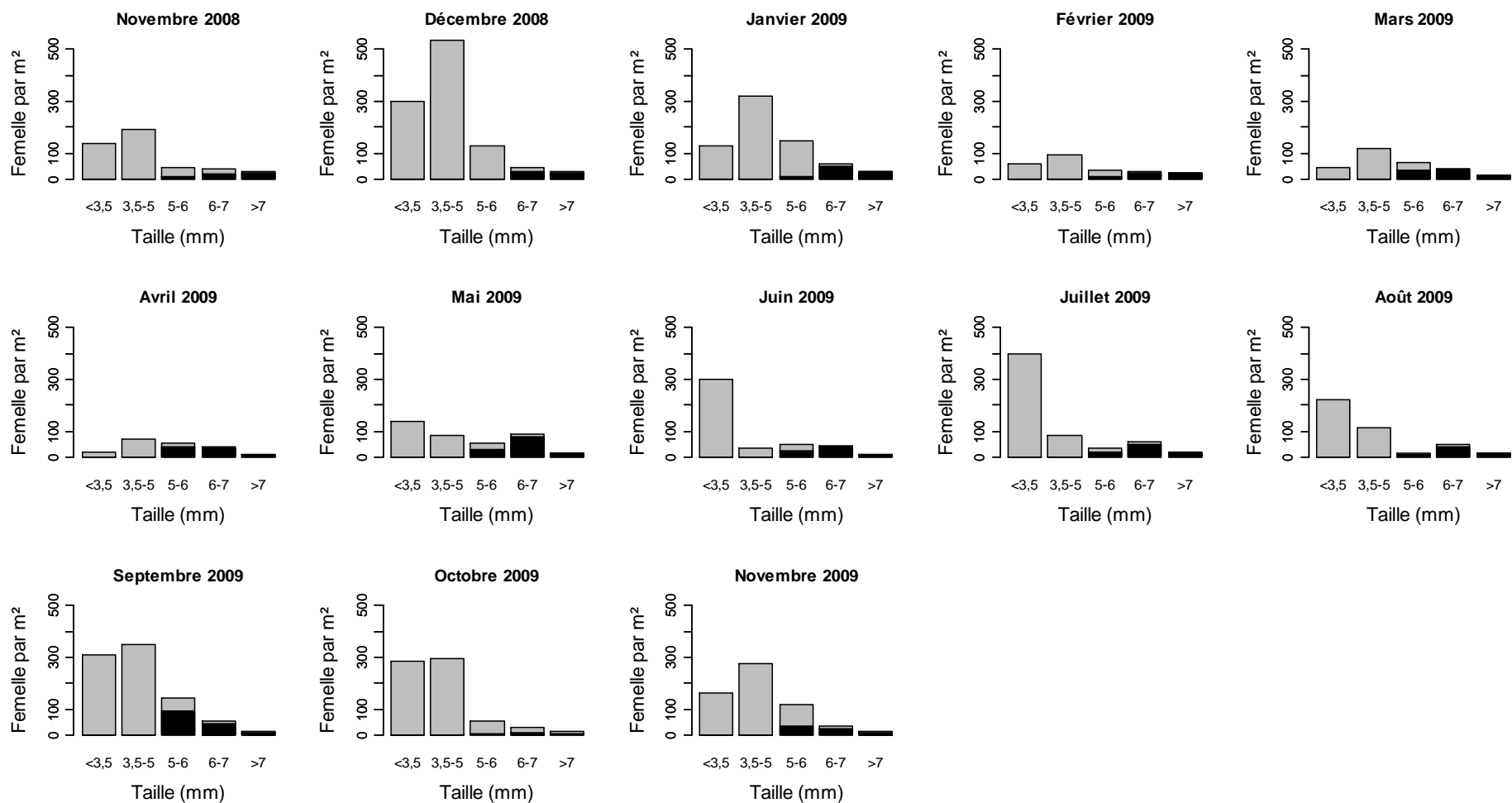


Figure IV-2 : Suivi démographique mensuel de la population de *G. fossarum* entre novembre 2008 et novembre 2009.

Les histogrammes en gris représentent les densités de femelles observées dans chacune des cinq classes de taille. Les histogrammes noirs, pour les trois classes d'adultes, représentent le nombre de femelles en reproduction.

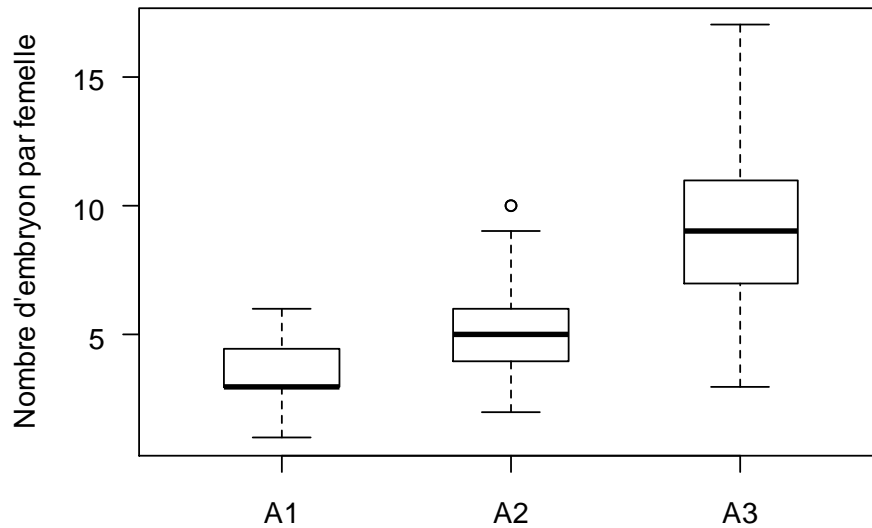
Nous avons également pu estimer le pourcentage de femelles en reproduction pour chacune des classes d'adultes (**Figure IV-2**). Nous observons de fortes variations selon les classes et les mois. Ainsi, les taux de reproduction se révèlent particulièrement variables pour la classe **A1** avec une très faible proportion de femelles en reproduction durant les mois d'hiver. Pour les classes **A2** et **A3**, les taux de reproduction sont en revanche beaucoup plus importants quelle que soit la saison. Cette diminution des taux de femelles en reproduction durant l'hiver est cohérente avec différentes études sur *G. fossarum* ou sur des espèces proches (Welton 1979 ; Costa and Costa 1999 ; Pöckl et al. 2003 ; Devin et al. 2004).

### 2.2.1.3 Suivi de l'état reproducteur

Nous avons évalué la fécondité en analysant chaque mois 60 femelles en reproduction prélevées aléatoirement sur le site de suivi de la population. Pour les analyses, nous avons retiré, de la même façon que dans le **Chapitre III**, les femelles ayant des embryons en stade 1 et 5. Nous n'observons pas d'effet du stade de développement sur le nombre d'embryons (test de Kruskal et Wallis,  $p = 0,13$ ) ce qui est cohérent avec les observations faites au laboratoire sur les organismes acclimatés et les résultats d'autres études sur *G. fossarum* (Geffard et al. 2010).

Nous avons tenté d'estimer les variations mensuelles du nombre d'embryons. Cependant, en raison de la très faible quantité de femelles gravides lors de certains mois du suivi, nous n'avons pu analyser la fécondité pour tous les mois et caractériser précisément ces variations saisonnières. Nous avons donc décidé de faire l'hypothèse d'une fécondité constante tout au long de l'année pour une classe de taille donnée. Un prélèvement plus conséquent aurait cependant peut-être pu nous permettre de caractériser plus finement d'éventuelles variations saisonnières.

Nous observons une augmentation significative du nombre d'embryons par femelle entre les trois classes d'adultes (test des rangs de Wilcoxon,  $p < 0,001$ ) (**Figure IV-3**). Ainsi, les femelles ont en moyenne 3,6 (1,3) embryons pour la classe **A1** ; 5,1 (1,6) embryons pour la classe **A2** et 9,2 (2,9) embryons pour la classe **A3**.



**Figure IV-3 : Fécondité moyenne des femelles de *G. fossarum* (en nombre d'embryons par femelle) pour chacune des trois classes d'adultes.**

Les boîtes s'étendent du premier au troisième quartile de la distribution des mesures avec le trait noir qui correspond à la médiane. Les moustaches s'étendent jusqu'aux valeurs extrêmes des mesures ne dépassant pas 1,5 fois l'écart interquartile. Les points marginaux sortant de cette gamme sont représentés par des points.

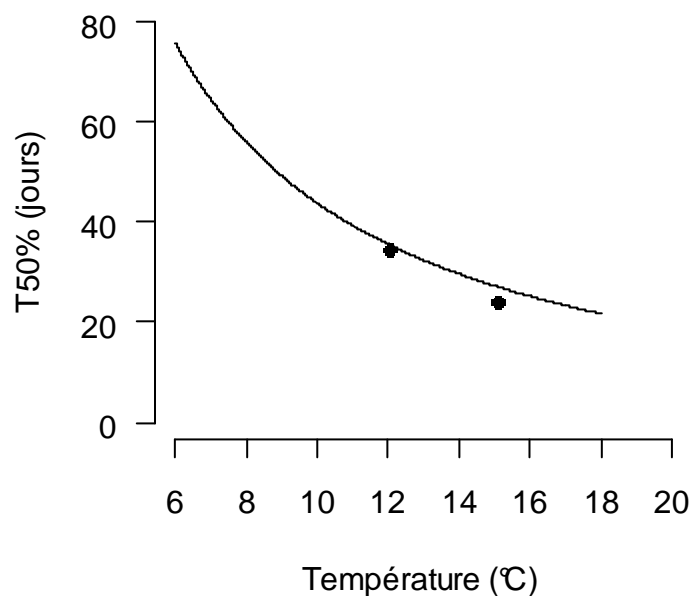
### 2.2.2 Durée du cycle de reproduction

Afin d'estimer la durée du cycle de reproduction (correspondant à la durée d'interponte) pour les différents mois du suivi de population, nous nous sommes servis de l'expérimentation réalisée au laboratoire sur les organismes calibrés issus de la Bourbre puis acclimatés dont les résultats sont présentés dans le **Chapitre III**. En effet, nous n'avons pas pu, à cause du temps et des moyens techniques qu'une telle expérimentation requiert, étudier directement la durée du cycle de reproduction au laboratoire ou sur le terrain lors de chacun des mois du suivi sur des organismes autochtones de l'Ardières. Nous avons donc fait l'hypothèse que la durée du cycle pour les organismes de cette population était comparable à celle observée sur les gammares acclimatés ; et que par conséquent nous pouvions l'estimer pour les différents mois à partir de la relation entre la durée du cycle et la température mise en évidence dans le **Chapitre III (Eq III-6)**.

Afin de valider cette hypothèse, nous avons réalisé des encagements *in situ* sur des gammares autochtones de l'Ardières à différentes saisons et comparé la durée du cycle observée avec celle prédite par le modèle. Nous avons pu suivre la durée du cycle de reproduction dans



son intégralité lors de deux campagnes d'encagement au printemps et en été. Nous observons une bonne concordance entre les prédictions du modèle paramétré sur les organismes de la Bourbre et nos observations sur les organismes autochtones de l'Ardières (**Figure IV-4**), ce qui conforte nos hypothèses à la fois concernant le fait que la température constitue le facteur principal responsable de la variation de la durée de l'interponte et sur la possibilité de nous servir du modèle que nous avons développé précédemment sur des organismes du laboratoire pour l'étude de cette population. Nous avons également suivi la durée du cycle de reproduction lors d'encagement en hiver et en automne. Nous n'avons pas pu suivre les femelles jusqu'à la fin de leur cycle de reproduction en raison des faibles températures.



**Figure IV-4 : Effet de la température sur la durée du cycle de reproduction *in situ* de *G. fossarum*.**

La courbe correspond à la prédiction du modèle établi au laboratoire pour la relation entre la température (°C) et la durée du stade de mue D2 (jours) sur des gammares de la Bourbre transplantés après acclimatation au laboratoire (Figure III-4, Eq III-6). Les points noirs correspondent à la durée du cycle de mue observée *in situ* chez des gammares autochtones issus de la population suivie lors d'encagements en avril 2009 et en juillet 2009. La température des différents points correspond à la température moyenne de la campagne d'encagement.

Cependant, de la même manière que dans le **Chapitre III**, nous avons tout de même pu relever les stades de mues après 21 jours d'exposition et nous observons également une bonne concordance avec les prédictions de notre modèle au laboratoire. Nous avons ainsi pu prédire la durée de l'interponte pour chacun des mois de notre suivi de population à partir de la température mensuelle moyenne (**Tableau IV-2**).

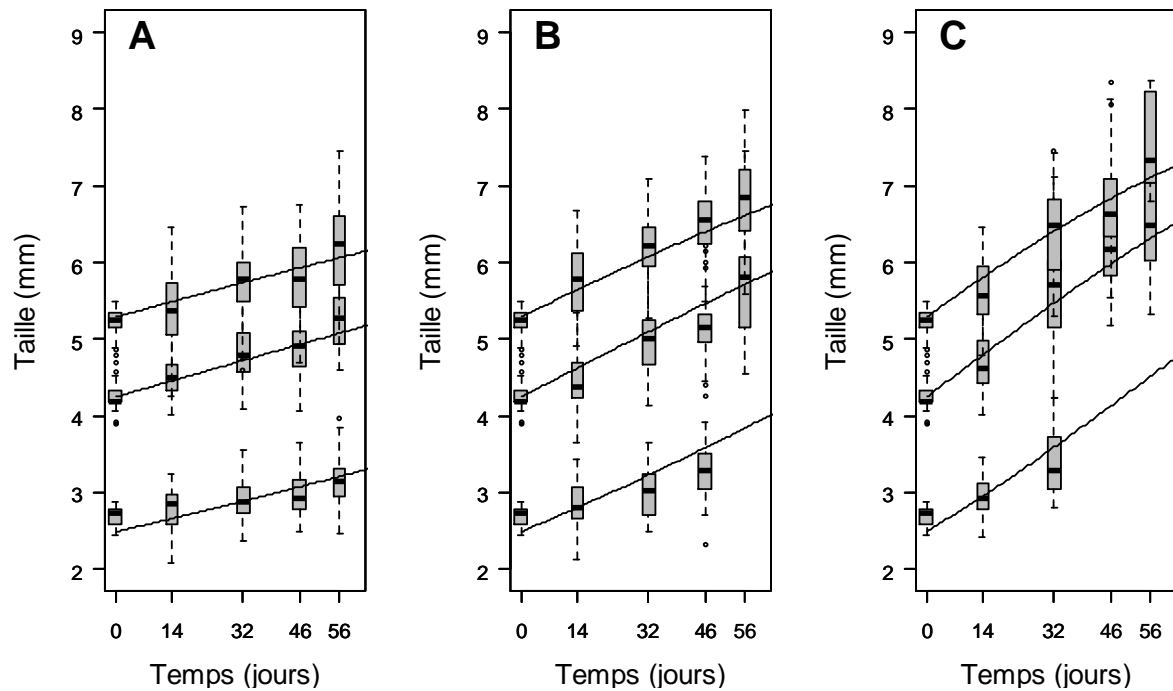
Tableau IV-2 : Durée du cycle de reproduction des femelles de *G. fossarum* pour chacun des mois du suivi de population estimée à partir de la relation entre température et durée du cycle de reproduction (Eq III-6).

Code mois	Durée du cycle de reproduction (jours)
Novembre 2008	70,3
Décembre 2008	86,4
Janvier 2009	90,8
Février 2009	85,1
Mars 2009	54,5
Avril 2009	37,3
Mai 2009	25,4
Juin 2009	26,8
Juillet 2009	26,6
Août 2009	28,1
Septembre 2009	33,7
Octobre 2009	52,7
Novembre 2009	53,2

### 2.2.3 Etude des taux de croissance

Pour estimer les taux de croissance lors de chacun des mois, nous avons fait l'hypothèse que la température était le principal facteur influent et nous avons mis en place une approche similaire à celle utilisée dans le **Chapitre III** afin d'étudier l'influence de la température sur le taux de croissance des gammares de cette population.

Nous avons dans un premier temps réalisé une expérimentation en conditions contrôlées au laboratoire avec trois températures d'exposition :  $6,8 \pm 0,03$  °C ;  $12,1 \pm 0,2$  °C et  $16,1 \pm 0,1$  °C afin de couvrir la gamme de températures rencontrée sur le site. Afin de limiter au maximum les biais liés au passage au laboratoire, nous n'avons pas acclimatés les organismes, l'expérience ayant été lancée juste après leur prélèvement. L'expérimentation a été menée entre le 23 janvier et le 8 mars 2010. Nous nous sommes intéressés à trois classes de tailles d'organismes : 2,5 (0,34) ; 4,5 (0,79) et 5,8 (0,70) mm afin d'avoir une bonne estimation de la croissance aussi bien sur des juvéniles que sur des adultes. Les organismes des différentes classes étaient mesurés après 0, 14, 32, 46 et 56 jours d'exposition (**Figure IV-5**).



**Figure IV-5 : Evolution de la taille des trois classes de *G. fossarum* de l'Ardières pour les trois températures au cours des 56 jours d'exposition**

(A) 6,8 (0,03) °C ; (B) 12,1 (0,2) °C et (C) 16,1 (0,1) °C. Les boîtes s'étendent du premier au troisième quartile de la distribution des mesures avec le trait noir qui correspond à la médiane. Les moustaches s'étendent jusqu'aux valeurs extrêmes des mesures ne dépassant pas 1,5 fois l'écart interquartile. Les courbes correspondent aux prédictions du modèle logistique (Eq IV-2) en utilisant l'équation IV-3 pour prédire le taux de croissance pour chaque température. Les différentes courbes d'un même graphique correspondent au même modèle logistique ajusté sur chacune des classes de taille.

Comme pour les gammares de la Bourbre, nous avons ajusté différents modèles logistiques en considérant ou non un impact de la température. Nous observons que le modèle intégrant l'effet de la température est celui qui s'ajuste le mieux à nos observations, que ce soit en réalisant des tests des modèles emboîtés ou en comparant les AIC des différents modèles. Nous concluons donc à une influence significative de la température sur le taux de croissance. De la même façon que dans le **Chapitre III**, nous observons une relation linéaire entre le taux de croissance et la température. Nous l'avons alors estimée en l'intégrant dans le modèle logistique (**Eq IV-1**) :

$$L(t) = L_{max} / \left( 1 + \left( \frac{L_{max}}{L_{init}} - 1 \right) e^{-(\beta_1 \Theta + \beta_0)t} \right) \quad \text{Eq IV-1}$$

où  $L(t)$  correspond à la taille en mm des individus au cours du temps,  $L_{max}$  à la taille maximale en mm des individus,  $L_{init}$  à la taille initiale en mm des individus,  $t$  au temps en jours,  $\Theta$  à la température de l'eau en °C et  $\beta_0$  et  $\beta_1$  aux paramètres de la relations linéaire entre le taux de croissance et la température. Concernant la taille maximale des organismes  $L_{max}$ , nous l'avons fixée à 8,19 mm, qui correspond à la taille maximale moyenne que nous avons observée durant le suivi démographique.

Nous obtenons entre la température et le taux de croissance la relation suivante :

$$r = 0,00139 (0,00006) \Theta - 0,00244 (0,00069) \quad \text{Eq IV-2}$$

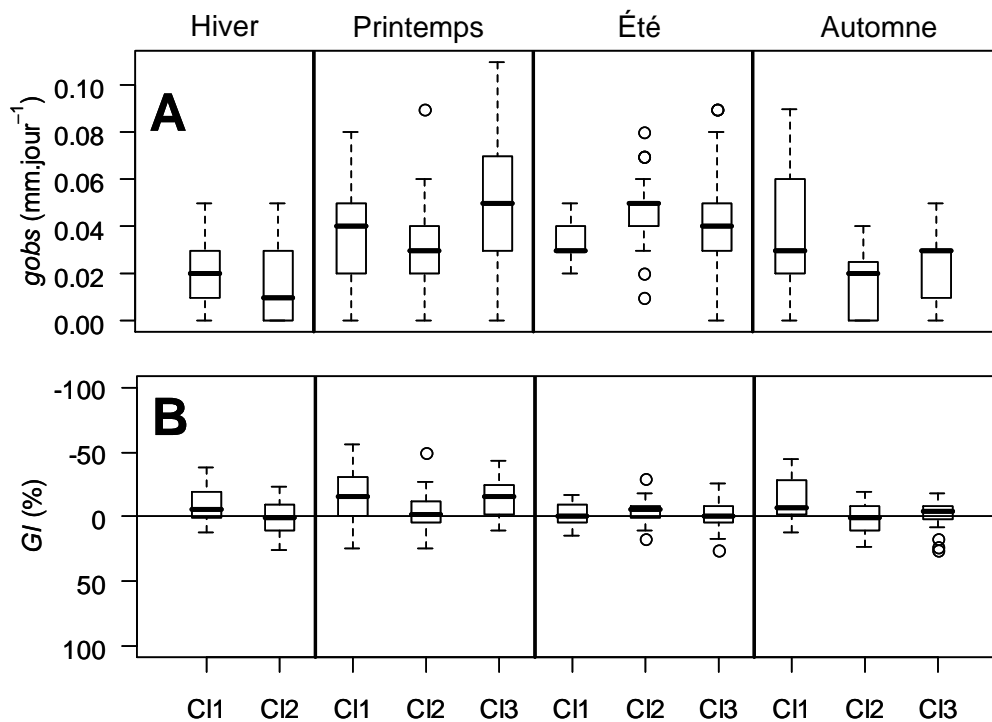
où  $r$  correspond au taux de croissance individuel en  $\text{mm}\cdot\text{jour}^{-1}\cdot\text{individu}^{-1}$  et  $\Theta$  à la température en °C.

Afin de valider le rôle prépondérant de la température dans les variations saisonnières des taux de croissance, nous avons réalisé quatre encagements *in situ* avec des gammars autochtones de l'Ardières de différentes classes de taille et à différentes saisons avec des températures contrastées entre le 5 novembre 2008 et le 20 novembre 2009 (**Figure IV-6 A**). Les tailles de départ des différentes classes de taille ainsi que les températures moyennes durant l'encagement sont récapitulées dans le **Tableau IV-3**.

**Tableau IV-3 : Paramètres physico-chimiques des différents encagements *in situ* de *G. fossarum* de l'Ardières et taille de départ (mm) des différentes classes d'organismes.**

Encagement	Température (°C)	Classe de taille	Taille initiale (mm)
Hiver	7,79	Cl1	2,48 (0,37)
		Cl2	3,62 (0,29)
Printemps	11,11	Cl1	2,14 (0,18)
		Cl2	3,12 (0,28)
		Cl3	4,93 (0,55)
Eté	15,10	Cl1	2,20 (0,25)
		Cl2	3,45 (0,31)
		Cl3	4,96 (0,42)
Automne	8,46	Cl1	2,91 (0,34)
		Cl2	3,91 (0,30)
		Cl3	5,19 (0,37)

Nous avons alors pu calculer l'indice  $GI$  (Eq III-13) que nous avons proposé dans le **Chapitre III** afin de comparer les prédictions des gains de croissance de notre modèle laboratoire et nos observations *in situ* (**Figure IV-6 B**). Malgré des différences significatives (ANOVA,  $p < 0,05$ ), nous observons tout de même une bonne concordance entre nos prédictions et nos observations puisque les valeurs de  $GI$  pour les différentes classes et les différentes saisons sont globalement proches de 0. Nous avons donc utilisé l'équation IV-3 pour estimer les taux de croissance mensuels du modèle de dynamique de population en utilisant la température moyenne mensuelle. Nous voyons toutefois que notre modèle au laboratoire a tendance à sous-estimer la croissance des individus par rapport au observations *in situ* (les valeurs de  $GI$  sont en général négatives). Des conditions d'exposition meilleures sur le terrain qu'au laboratoire (*e.g.*, alimentation, oxygénation de l'eau) peuvent expliquer ces différences.



**Figure IV-6 : Mesure du taux de croissance *in situ* de *G. fossarum* de l'Ardières aux différentes saisons pour deux à trois classes de tailles.**

(A) Gain de taille (mm.jour<sup>-1</sup>) (B) Correction de l'influence de la température avec le calcul de l'index  $GI$  (%) (Eq III-11). Les boîtes s'étendent du premier au troisième quartile de la distribution des mesures avec le trait noir qui correspond à la médiane. Les moustaches s'étendent jusqu'aux valeurs extrêmes des mesures ne dépassant pas 1,5 fois l'écart interquartile. Les points marginaux sortant de cette gamme sont représentés par des points.

## 2.3 Paramétrisation du modèle de dynamique de population

Soit  $n_{(i)}(k)$  le nombre de gammares de la classe de taille  $i$  (cinq classes possibles :  $i = 1$  pour les **J1**,  $i = 2$  pour les **J2**,  $i = 3$  pour les **A1**,  $i = 4$  pour les **A2** et  $i = 5$  pour les **J3**) au mois  $k$  (12 mois possibles :  $k = 1, \dots, k = 12$  avec  $k = 1$  pour le mois de novembre 2008 et  $k = 12$  pour le mois d'octobre 2009). Il est alors possible de définir 12 matrices mensuelles  $\mathbf{M}_k$  (pour chaque mois  $k$ ) qui nous permettent de lier le vecteur population de l'année  $t + 1$  à celui de l'année  $t$  :

$$\mathbf{n}(t+1) = \prod_{k=1}^{12} \mathbf{M}_k \mathbf{n}(t) = \mathbf{L} \mathbf{n}(t) \quad \text{Eq IV-3}$$

A partir des expérimentations présentées précédemment, nous avons pu estimer pour chaque matrice  $\mathbf{M}_k$  les 17 paramètres du modèle (**Eq IV-5**).

### 2.3.1 Estimation de la fécondité $f_{i,k}$

Nous avons estimé les taux de fécondité  $f_{i,k}$  des femelles des  $i$  classes d'adultes ( $i = 3, 4$  et  $5$ ) pour chacun des  $k$  mois ( $k = 1, \dots, 12$ ) de l'année selon la formule :

$$f_{i,k} = sr_k \text{ nemb}_{i,k} \text{ percrepro}_{i,k} \Delta t_k / \text{dcycle}_k \quad \text{Eq IV-4}$$

où  $f_{i,k}$  correspond à la fécondité par femelle de la classe  $i$  au mois  $k$  en nombre de juvéniles produits par femelle et par mois ;  $sr_k$  au sex-ratio au mois  $k$  ;  $\text{nemb}_{i,k}$  au nombre d'embryons par femelle de la classe  $i$  au mois  $k$  ;  $\text{percrepro}_{i,k}$  au pourcentage de femelles en reproduction de la classe  $i$  au mois  $k$  en % ;  $\Delta t_k$  à la durée en jours de la période de suivi au mois  $k$  et  $\text{dcycle}_k$  à la durée en jours du cycle de reproduction au mois  $k$ .

$$\mathbf{M}_k = \begin{pmatrix}
 P_{11,k} = s_{1,k} \left( 1 - \sum_{j>1} g_{1j,k} \right) & 0 & F_{3,k} = f_{3,k} \sqrt{s_{1,k}} \sqrt{s_{3,k}} & F_{4,k} = f_{4,k} \sqrt{s_{1,k}} \sqrt{s_{4,k}} & F_{5,k} = f_{5,k} \sqrt{s_{1,k}} \sqrt{s_{5,k}} \\
 P_{12,k} = s_{1,k} g_{12,k} & P_{22,k} = s_{2,k} \left( 1 - \sum_{j>2} g_{2j,k} \right) & 0 & 0 & 0 \\
 P_{13,k} = s_{1,k} g_{13,k} & P_{23,k} = s_{2,k} g_{23,k} & P_{33,k} = s_{3,k} \left( 1 - \sum_{j>3} g_{3j,k} \right) & 0 & 0 \\
 P_{14,k} = s_{1,k} g_{14,k} & P_{24,k} = s_{2,k} g_{24,k} & P_{34,k} = s_{3,k} g_{34,k} & P_{44,k} = s_{4,k} (1 - g_{45,k}) & 0 \\
 P_{15,k} = s_{1,k} g_{15,k} & P_{25,k} = s_{2,k} g_{25,k} & P_{35,k} = s_{3,k} g_{35,k} & P_{45,k} = s_{4,k} g_{45,k} & P_{55,k} = s_{55,k}
 \end{pmatrix}$$

**Eq IV-5**

où  $\mathbf{M}_k$  correspond à la matrice de Leslie du mois  $k$  pour la population de *G. fossarum* ;  $P_{ij,k}$  au taux de passage de la classe  $i$  à la classe  $j$  au mois  $k$  ;  $s_{i,k}$  aux taux de survie de la classe  $i$  au mois  $k$  ;  $g_{ij,k}$  au taux de passage de la classe  $i$  à la classe  $j$  au mois  $k$  ;  $F_{i,k}$  aux taux de reproduction de la classe  $i$  au mois  $k$  ;  $f_{i,k}$  aux taux de fécondité de la classe  $i$  au mois  $k$ .

Dans ce calcul des taux de fécondité, nous avons fait différentes hypothèses simplificatrices :

- nous avons supposé la sex-ratio équilibré (autant de mâles que de femelles dans les juvéniles produits par chaque femelle) :  $sr = 0,5$ . Cette hypothèse nous a semblé réaliste au regard de la proportion de mâles et de femelles que nous avons observée durant le suivi démographique.
- nous avons considéré que le nombre d'embryons  $nbemb_{i,k}$  par femelle était identique entre les mois pour nos différentes classes (*cf.* paragraphe 2.2.1.3)

Nous obtenons ainsi les taux de fécondité pour chacune des  $i$  classes d'adulte et chacun des  $k$  mois de l'année. Ils sont résumés dans le **Tableau IV-4**. Nous voyons qu'ils sont très faibles voire nuls à la fin de l'automne et durant l'hiver puis qu'ils augmentent progressivement jusqu'à être maximaux au printemps et en été. Etant donné que la fécondité a été considérée comme constante tout au long de l'année, ces variations des taux de reproduction sont liées 1- aux variations saisonnières du pourcentage de femelles en reproduction et 2- à la variabilité saisonnière de la durée d'interponcte. En effet, lors des mois les plus chauds, les femelles se reproduisent entre une et deux fois durant le mois alors qu'en hiver la durée du cycle peut atteindre plusieurs mois.

**Tableau IV-4 : Estimation des taux de fécondité  $f_{i,k}$  pour les trois classes d'adultes ( $i = 3$  à  $5$ ) de *G. fossarum* lors des  $k$  mois du suivi de population (production de juvéniles par mois et par femelle).**

Mois	Classe		
	$f_3$	$f_4$	$f_5$
Novembre 2008 ( $k = 1$ )	0,03	0,02	0,04
Décembre 2008 ( $k = 2$ )	0,05	0,05	0,08
Janvier 2009 ( $k = 3$ )	0,01	0,22	0,49
Février 2009 ( $k = 4$ )	0,11	0,45	0,99
Mars 2009 ( $k = 5$ )	0,31	0,70	1,36
Avril 2009 ( $k = 6$ )	0,39	0,72	1,39
Mai 2009 ( $k = 7$ )	1,45	3,45	7,07
Juin 2009 ( $k = 8$ )	0,93	2,02	4,26
Juillet 2009 ( $k = 9$ )	0,75	1,67	2,66
Août 2009 ( $k = 10$ )	1,30	2,61	5,83
Septembre 2009 ( $k = 11$ )	0,74	1,25	2,41
Octobre 2009 ( $k = 12$ )	0,11	0,55	1,22



### 2.3.2 Estimation des taux de transition $P_{j,i,k}$

Les taux de transition  $P_{j,i,k}$  correspondent à la proportion d'individus d'une classe de taille  $i$  au mois  $k$  qui vont se retrouver dans une classe de taille  $j$  au mois  $k + 1$ . Ils sont une combinaison de la proportion d'individus de la classe  $i$  qui survivent entre le mois  $k$  et le mois  $k + 1$  notée  $s_{i,k}$  et de la proportion d'individus qui passeront de la classe  $i$  à la classe  $j$  via la croissance notée  $g_{j,i,k}$  (ou resterons dans la même classe de taille lorsque  $i = j$ ).

#### 2.3.2.1 Calcul des taux de passage $g_{j,i,k}$ de la classe $i$ à la classe $j$ pour chacun des $k$ mois de l'année

A partir de nos prédictions sur le taux de croissance des individus, nous avons pu estimer les taux de passage d'une classe de taille à une autre pour chacune des classes et chacun des mois. Pour cela, nous avons dans un premier temps calculé, en prenant la température mensuelle moyenne de chaque mois  $k$ , l'évolution de chacune des classes de taille  $i$  entre le mois  $k$  et le mois  $k + 1$  selon la formule :

$$L_{i,k+1} = L_{max} \left/ 1 + \left( \frac{L_{max}}{L_{i,k}} - 1 \right) e^{\left( - \left( 0,0014 \Theta_k - 0,0032 \right) \Delta k \right)} \right. \quad \text{Eq IV-6}$$

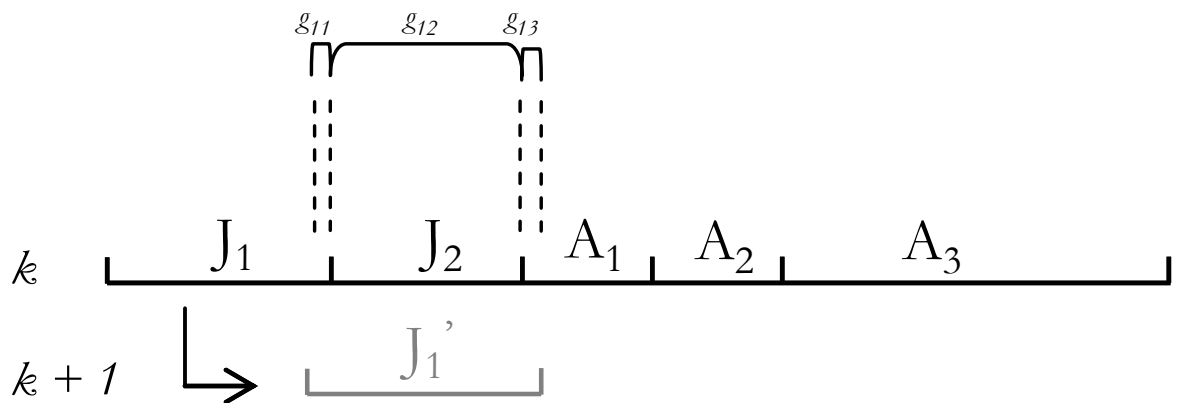
où  $L_{i,k+1}$  correspond à la taille en mm des individus de la classe  $i$  au mois  $k + 1$ ,  $L_{i,k}$  correspond à la taille en mm des individus de la classe  $i$  au mois  $k$ ,  $L_{max}$  correspond à la taille maximale en mm des femelles,  $\Delta k$  à la durée en jours du mois  $k$  et  $\Theta_k$  à la température moyenne du mois  $k$  en °C.

Nous avons ainsi pu déterminer dans un second temps les taux de transition de la classe  $i$  vers la classe  $j$  pour chacune des classes de taille lors de chacun des mois  $k$ . Pour cela, nous avons estimé la proportion pour chaque classe de taille des individus passant d'une classe à une autre (ou restant dans la même classe) (**Figure IV-7 ; Tableau IV-5**).

Tableau IV-5 : Estimation des taux de passage mensuels d'une classe à une autre lors des différents mois du suivi de population de *G. fossarum*

Mois	$G_{11}$	$G_{12}$	$G_{13}$	$G_{22}$	$G_{23}$	$G_{24}$	$G_{33}$	$G_{34}$	$G_{35}$	$G_{44}$	$G_{45}$	$G_{55}$
Novembre 2008	0,68	0,32	0	0,75	0,25	0	0,61	0,39	0	0,78	0,22	1
Décembre 2008	0,71	0,29	0	0,8	0,2	0	0,68	0,32	0	0,82	0,18	1
Janvier 2009	0,63	0,37	0	0,74	0,26	0	0,59	0,41	0	0,77	0,23	1
Février 2009	0,57	0,43	0	0,70	0,30	0	0,52	0,48	0	0,73	0,27	1
Mars 2009	0,45	0,55	0	0,61	0,39	0	0,37	0,63	0	0,64	0,36	1
Avril 2009	0,33	0,67	0	0,51	0,49	0	0,21	0,79	0	0,55	0,45	1
Mai 2009	0	0,91	0,09	0	0,58	0,42	0	0,84	0,16	0	1	1
Juin 2009	0,09	0,91	0	0,32	0,64	0,04	0	1	0	0,34	0,66	1
Juillet 2009	0,27	0,73	0	0,46	0,54	0	0,12	0,88	0	0,49	0,51	1
Août 2009	0	1	0	0,05	0,66	0,29	0	1	0	0,01	0,99	1
Septembre 2009	0,41	0,59	0	0,58	0,42	0	0,32	0,68	0	0,61	0,39	1
Octobre 2009	0,43	0,57	0	0,59	0,41	0	0,34	0,66	0	0,63	0,37	1

Nous avons fait l'hypothèse que les individus sont distribués de manière uniforme au sein de chacune des classes de taille. Selon les mois et les classes, nous observons des variations importantes de ces taux de transition, les individus pouvant grandir de plusieurs classes de tailles lors des mois les plus chauds ou au contraire rester majoritairement dans leur classe de taille initiale lors des mois d'hiver. Pour la dernière classe de taille, il n'y a logiquement qu'un seul taux de transition égale 1 étant donné que tous les individus restent dans cette classe.



**Figure IV-7 : Illustration théorique du calcul des taux de transition pour la classe J1.**

$g_{11}$  correspond à la proportion d'organismes restant dans la classe J1,  $g_{12}$  à la proportion passant dans la classe J2 et  $g_{13}$  à la proportion passant dans la classe A1 après un mois de croissance des organismes.

### 2.3.2.2 Estimation des taux de survie $s_i$ des $i$ classes pour chacun des $k$ mois de l'année

Nous n'avons pas pu étudier directement les taux de survie mensuels des différentes classes de taille de manière expérimentale. En effet, lors de l'exposition *in situ* d'organismes, notamment *via* des méthodologies d'encagement, les survies observées ne prennent pas en compte les interactions biotiques telles que la prédation ou la compétition ni l'influence de l'habitat et ne sont donc pas représentatives des survies réellement observées dans la population. Les méthodologies de capture – marquage – recapture sont parfois utilisées, notamment chez les poissons (Hanson et al. 2005). Cependant, ces méthodes sont bien adaptées pour des organismes de grande taille mais n'étaient pas envisageables dans notre cas avec des invertébrés de petite taille tels que les gammarès. En effet, il aurait été d'une part très complexe de marquer des individus de manière durable et d'autre part très difficile de les recapturer le mois suivant.

Nous avons donc dû estimer les taux de survie autrement. Pour cela, nous avons comparé pour un mois  $k$  donné les densités d'individus observées au mois  $k + 1$  sur le terrain lors du suivi démographique aux densités théoriques calculées à partir des taux de fécondité et des taux de transition de chaque classe calculées précédemment. Nous avons alors fait l'hypothèse que la différence entre les densités observées et les densités théoriques dans chacune des classes correspondaient aux taux de survie des individus. Nous avons ainsi pu calculer des taux de survie pour chacun des mois (**Tableau IV-6**).

Nous obtenons, pour certains mois, des taux de survie supérieurs à 1, en particulier en novembre 2008, avril 2009 et août 2009. Ces résultats signifient que pour certains mois, nous observons un excédent d'organismes par rapport à nos prédictions. Deux hypothèses sont alors possibles : 1- cet excédent correspond à des apports d'organismes provenant de l'amont de la station, en particulier de juvéniles puisque nous observons ce type de survie principalement pour les classes **J1** et **J2** à certaines périodes de l'année. 2- notre méthode d'échantillonnage n'est pas assez précise et conduit à des estimations pas assez répétables des densités entre les différents mois. Nous avons donc décidé de paramétrer trois modèles de dynamique de population : un premier en conservant les taux de survies estimés précédemment (**mod1**) (**Tableau IV-6**), un deuxième où nous avons pondéré les taux de survie en calculant la moyenne géométrique des taux observés lors des mois  $k - 1$ ,  $t$  et  $k + 1$  dans le but d'atténuer l'influence d'observations aberrantes de certains mois (**Tableau IV-7**) (**mod2**) et un troisième où nous avons fixé les taux de survie supérieurs à 1 à une valeur maximale de 1 (**mod3**).

**Tableau IV-6 : Estimation des taux de survie de apparents *G. fossarum* pour les cinq classes de taille lors des différents mois du suivi de population**

Mois	$s_1$	$s_2$	$s_3$	$s_4$	$s_5$
Novembre 2008	3,19	2,82	1,78	0,91	0,73
Décembre 2008	0,60	0,61	0,75	0,77	0,79
Janvier 2009	0,54	0,33	0,21	0,26	0,53
Février 2009	0,47	1,31	1,32	1,10	0,42
Mars 2009	0,22	0,75	0,79	0,58	0,29
Avril 2009	2,01	1,65	1,21	1,38	0,52
Mai 2009	0,56	0,29	0,79	0,56	0,08
Juin 2009	1,83	0,29	1,54	0,90	0,51
Juillet 2009	0,68	0,33	0,34	0,82	0,24
Août 2009	1,12	1,56	1,94	1,06	0,20
Septembre 2009	0,92	0,77	0,27	0,21	0,40
Octobre 2009	0,94	0,82	0,84	0,71	0,54

**Tableau IV-7 : Estimation des taux de survie corrigés de *G. fossarum* par « lissage » sur une fenêtre de trois mois pour les cinq classes de taille lors des différents mois du suivi de population**

Mois	$s_1$	$s_2$	$s_3$	$s_4$	$s_5$
Novembre 2008	1,01	0,83	0,66	0,57	0,68
Décembre 2008	1,01	0,83	0,66	0,57	0,68
Janvier 2009	0,57	0,65	0,60	0,61	0,56
Février 2009	0,43	0,69	0,61	0,55	0,40
Mars 2009	0,67	1,17	1,08	0,96	0,40
Avril 2009	0,69	0,71	0,91	0,77	0,23
Mai 2009	1,37	0,52	1,14	0,89	0,28
Juin 2009	1,00	0,31	0,75	0,75	0,22
Juillet 2009	1,30	0,54	1,00	0,92	0,29
Août 2009	0,99	0,74	0,56	0,57	0,27
Septembre 2009	1,08	1,00	0,76	0,55	0,35
Octobre 2009	1,08	1,00	0,76	0,55	0,35

## 2.4 Caractérisation de la dynamique de la population annuelle

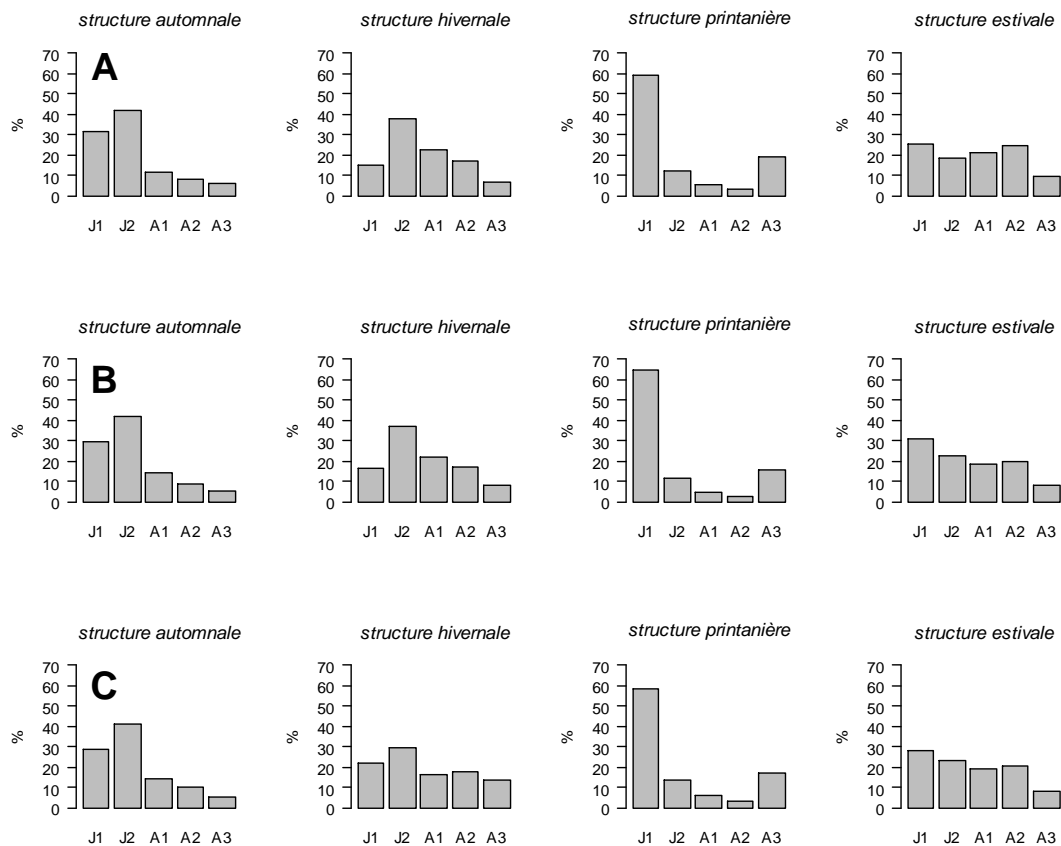
Le produit des matrices de Leslie mensuelles  $\mathbf{M}_k$  nous permet d'obtenir une matrice de Leslie annuelle  $\mathbf{L}$  de dimension 5. L'étude analytique de cette matrice nous fournit alors différents indicateurs démographiques de la dynamique de la population. La matrice  $\mathbf{L}$  est une matrice primitive. Aussi, en appliquant le théorème de Perron-Frobenius, nous pouvons dire que  $\mathbf{L}$  présente une première valeur propre dominante  $\lambda$  qui correspond au taux d'accroissement asymptotique de la population (Caswell 2001). Cet indicateur de fitness populationnel correspond au taux de croissance qui serait atteint par la population au bout d'un certain nombre d'années si l'ensemble des paramètres biologiques et donc des conditions environnementales restaient les mêmes au cours du temps. Le vecteur propre à droite  $\mathbf{w}$  permet aussi de déterminer la structure asymptotique en taille de la population, c'est-à-dire la répartition à l'équilibre des cinq classes de taille. Par ailleurs, le vecteur propre à gauche  $\mathbf{v}$  associé à  $\lambda$  permet d'obtenir les valeurs reproductives des différentes classes de taille (valeurs pouvant être définies comme la proportion que représente chaque classe d'individus dans « l'ascendance des générations futures » (Caswell 2001 ; Chaumot 2002).

Le taux d'accroissement asymptotique annuel de la population  $\lambda$  est de 3,78 avec le modèle calibré avec les taux de survie apparents (**mod1**), de 1,53 avec le modèle paramétré avec les taux de survie lissés (**mod2**) et de 1,26 avec le modèle avec les taux de survie plafonnés à 1 (**mod3**). Ceci correspond dans les trois cas à une croissance potentielle de la population ( $\lambda > 1$ ).

Nous avons également caractérisé les structures en taille stables aux différentes saisons pour nos trois modèles. Pour cela, il suffit de modifier l'ordre de départ dans la succession des matrices mensuelles  $\mathbf{M}_k$  lors du calcul de  $\mathbf{L}$ . Ainsi, les structures en taille, correspondant aux pourcentages des différentes classes de taille à l'équilibre, sont représentées sur la **Figure IV-8**. La structure automnale correspond à la structure à la fin du mois de novembre, la structure hivernale à celle à la fin du mois de février, la structure printanière à celle à la fin du mois de juin et la structure estivale à celle à la fin du mois de septembre.

En comparant les distributions en taille stables de chaque classe de taille avec les proportions d'individus de chaque classe obtenues lors du suivi démographique, nous voyons que les trois modèles prédisent des structures saisonnières cohérentes avec les observations *in situ* même si en été, les modèles ont tendance à sous-estimer légèrement la proportion de **J2**. Les flux démographiques relatifs (c'est-à-dire la « mécanique saisonnière » de la population) entre les différentes classes d'individus sont donc bien modélisés. Les trois modèles, malgré des prédictions très différentes au niveau du taux de croissance asymptotique, présentent des structures stables proches qui constituent une description vraisemblable de la dynamique d'une population de gammares.

La valeur absolue des différents paramètres démographiques présentés dans cette partie n'ont en fait que peu d'intérêt par rapport aux objectifs de ce travail. Le véritable intérêt réside en réalité dans l'analyse des modifications qui affectent ces indicateurs populationnels lors de l'impact de contaminations observé au niveau individuel sur les traits de vie *via* des bioessais au laboratoire (*e.g.*, dans le cadre d'approche *a priori* de l'effet d'une substance chimique) ou *in situ* (*e.g.*, dans le cadre de démarches de biomonitoring).



**Figure IV-8 : Evolution saisonnière de la structure en taille stable de la population de *G. fossarum***  
 (A) Structure en taille stable pour le modèle mod1 ; (B) Structure en taille stable pour le modèle mod2 et  
 (C) Structure en taille stable pour le modèle mod3

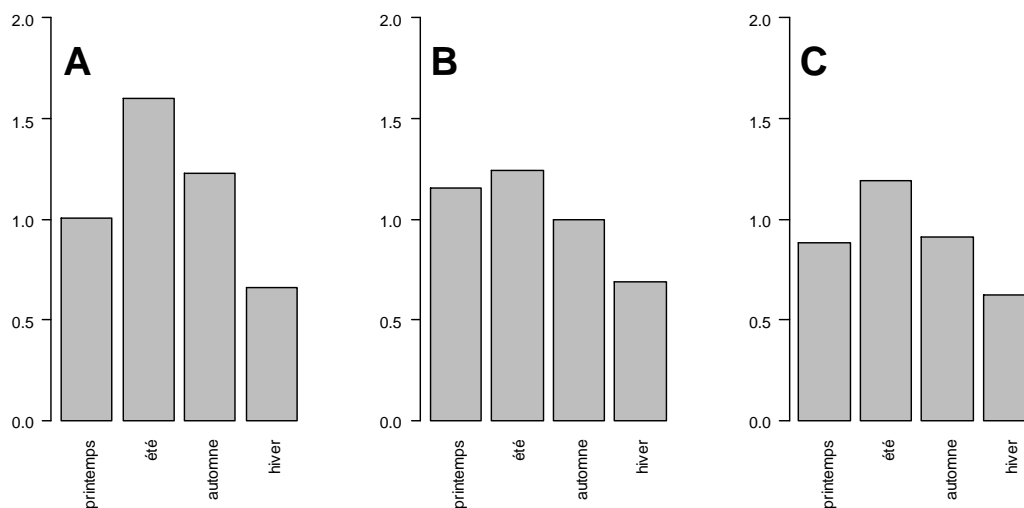
## 2.5 Variabilité saisonnière de la dynamique

Nous avons caractérisé les variabilités saisonnières de la dynamique de notre population. Pour cela, nous avons calculé quatre matrices saisonnières résultant du produit des trois matrices  $\mathbf{M}_k$  des mois de chaque saison (mars – avril – mai pour la matrice printanière  $\mathbf{L}_p$ , juin – juillet – août pour la matrice estivale  $\mathbf{L}_e$ , septembre – octobre – novembre pour la matrice automnale  $\mathbf{L}_a$  et décembre – janvier – février pour la matrice hivernale  $\mathbf{L}_h$ ). Nous obtenons ainsi quatre matrices de dimension 5 qui nous permettent de simuler la dynamique de notre population sous des scénarios de « saisons éternelles ». De la même façon que pour la matrice annuelle, nous avons considéré trois scénarios différents : un avec les survies apparentes estimées à partir du suivi démographique, un avec les survies corrigées et un avec les survies limitées à 1. Bien que n’ayant pas de grande signification d’un point de vue biologique (étant donné que ces scénarios sont impossibles), les indicateurs de fitness populationnelle calculés à partir de ces matrices saisonnières nous permettent de déterminer quelles sont les saisons clefs pour la dynamique de cette population.

Ces matrices sont toutes primitives. Nous pouvons déterminer de la même manière que pour la matrice annuelle les différents indicateurs populationnels. Nous avons choisi de ne présenter que les résultats concernant le **taux d'accroissement asymptotique  $\lambda$**  (Figure IV-10). Etant donné que les matrices saisonnières ne correspondaient pas à des durées strictement similaires en raison des différences dans les dates des suivis de population (Tableau IV-1), nous avons corrigé les valeurs de  $\lambda$  obtenues en les ramenant à un  $\lambda$  sur une période de 30 jours :

$$\lambda_{\text{corrigé}} = (\text{nombre de jours de la saison}) \sqrt[30]{\lambda} \quad \text{Eq IV-7}$$

Les différents taux de croissance asymptotique obtenus sont reportés sur la Figure IV-9. Nous observons le même profil pour les trois modèles avec des taux de croissance forts en été et en automne et plus faibles au printemps et en hiver. Cependant, les variations de  $\lambda$  sont plus marquées pour le modèle avec les survies apparentes (Figure IV-9 A) en raison d'une plus grande variabilité saisonnière des taux de survie. Cette variation saisonnière du taux de croissance asymptotique de la population est cohérente avec les observations de Smit (2006) sur une population du crustacé amphipode *C. volutator* qui rapporte des variations importantes de  $\lambda$  avec la variation de la température de l'eau.



**Figure IV-9 : Variations saisonnières du taux de croissance asymptotique  $\lambda$  de la population de *G. fossarum*.**

(A) Taux de croissance asymptotique pour le modèle mod1 ; (B) Taux de croissance asymptotique pour le modèle mod2 et (C) Taux de croissance asymptotique pour le modèle mod3. Chaque  $\lambda$  est calculé à partir des matrices saisonnières (simulation de saisons éternelles) et ramené à une durée de un mois afin de les rendre comparables entre eux.

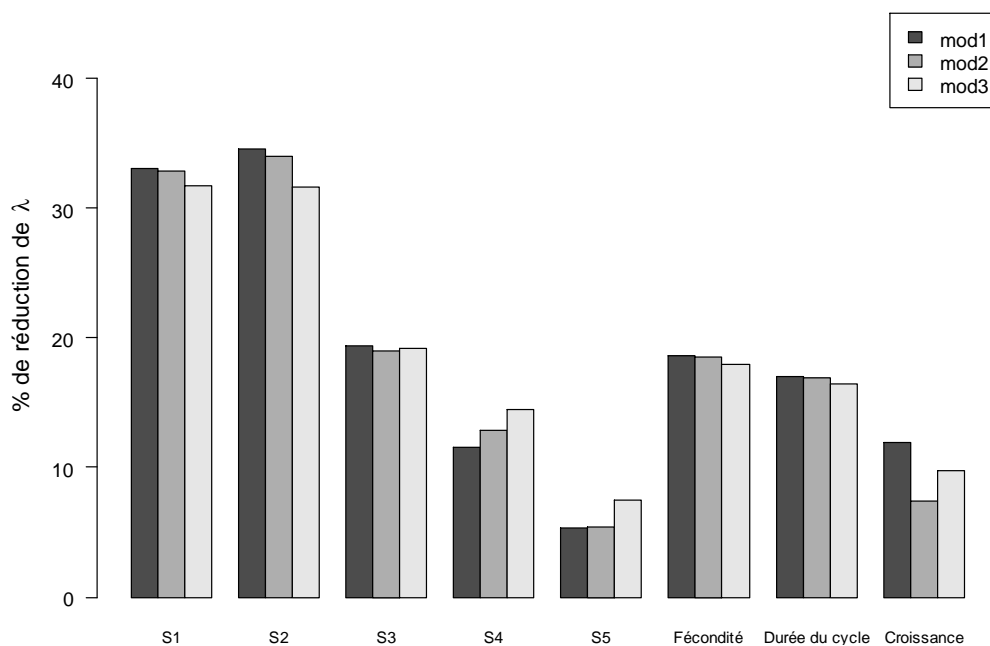


## 2.6 Sensibilité aux paramètres démographiques

Nous avons étudié l'effet sur le taux d'accroissement asymptotique de la population  $\lambda$  des variations des valeurs choisies pour les différents paramètres. Pour cela, nous avons appliqué successivement une diminution de 10 % des valeurs de survie ( $s_1, s_2, s_3, s_4$  et  $s_5$ ), une diminution de 10% du taux de croissance individuel ( $r$ , **Eq IV-2**), une diminution de 10% de la fécondité ( $nbemb$  ; **Eq IV-4**) et enfin une augmentation de 10% de la durée du cycle de reproduction ( $d_{cycle}$  ; **Eq IV-4**).

### 2.6.1 Sensibilité annuelle

La **Figure IV-10** rend compte des variations de  $\lambda$  pour nos trois modèles **mod1**, **mod2** et **mod3**. Nous voyons que pour les trois modèles,  $\lambda$  est particulièrement sensible aux variations des taux de survie des deux classes de juvéniles ( $s_1$  et  $s_2$ ). Ainsi, une diminution de 10% des taux de survie sur ces classes de taille conduit à une diminution de plus de 30% du taux de croissance de la population. Concernant les marqueurs de reproduction, que ce soit la fécondité ou la durée du cycle de reproduction, le taux de croissance asymptotique de la population se révèle également assez sensible avec une diminution de 20 % de  $\lambda$  dans les deux cas. En revanche, la dynamique de la population apparaît moins sensible aux survies adultes à la modification du taux de croissance individuel.



**Figure IV-10 : Sensibilité du taux d'accroissement asymptotique annuel  $\lambda$  de la population de *G. fossarum* aux paramètres de survie, de fécondité et de croissance (réduction de 10 %).**

## 2.6.2 Sensibilité saisonnière

Il nous a semblé particulièrement pertinent de nous intéresser aux différences saisonnières de la sensibilité de notre population dans le contexte de ce travail. En effet, bien que certaines contaminations des milieux aquatiques puissent être considérées comme relativement continues tout au long de l'année (*e.g.*, contaminations métalliques, urbaines), d'autres sont au contraire très ponctuelles (*e.g.*, utilisation de pesticides, by-pass de STEP). Dans ce second cas de figure, si la sensibilité démographique de la population est variable en fonction des saisons, les effets populationnels pourront être très différents selon la date de l'épisode de contamination. Afin de caractériser les variations saisonnières de la sensibilité de notre population, nous avons regardé l'influence d'une modification de 10% des différents paramètres démographiques sur le taux d'accroissement asymptotique annuel de la population  $\lambda$  en utilisant les matrices saisonnières définies précédemment. La **Figure IV-11** rend compte des variations de  $\lambda$  observées lors des différentes saisons et pour les trois types de modèles. Les différentes valeurs de  $\lambda$  estimées sont toutes ramenées à une durée de 30 jours afin de pouvoir comparer les différentes saisons entre elles.

Encore une fois, les réponses observées pour les trois types de modèles sont très proches. Le taux d'accroissement de la population se révèle, de la même façon que pour la sensibilité annuelle, particulièrement sensible aux survies juvéniles ( $s_1$  et  $s_2$ ) au printemps, en été et en automne. En revanche, en hiver, la sensibilité liée aux survies juvéniles diminue et la dynamique de la population se révèle alors beaucoup plus sensible à la survie des adultes. Concernant les paramètres en lien avec la reproduction, nous observons une sensibilité importante au printemps et en été, et très faible en hiver et en automne. Ceci s'explique par les très faibles taux de reproduction observés lors de ces deux saisons. Enfin, concernant la croissance, nous observons un profil surprenant. En effet, le taux d'accroissement de la population se révèle particulièrement sensible à une diminution du taux de croissance en été mais très peu pour les autres saisons. Dans certains cas, en particulier en automne pour le modèle **mod1**, nous observons même une augmentation du taux d'accroissement de la population lorsque le taux de croissance individuel diminue. Cette modification « contre intuitive » du  $\lambda$  s'explique par le fait que pour certains mois, la survie des adultes de la classe 5 est très basse. Lorsque les taux de croissance individuels  $r$  sont diminués, un individu aura alors un taux de survie plus grand et pourra avoir plus d'épisodes de reproduction en restant plus longtemps dans les classes de taille plus petites. Ceci est accentué avec le modèle utilisant les survies apparentes non corrigées en raison des forts taux de survie des

premières classes. Nous voyons que lorsque nous limitons les taux de survie à 1, nous n'observons plus ce type de profil.

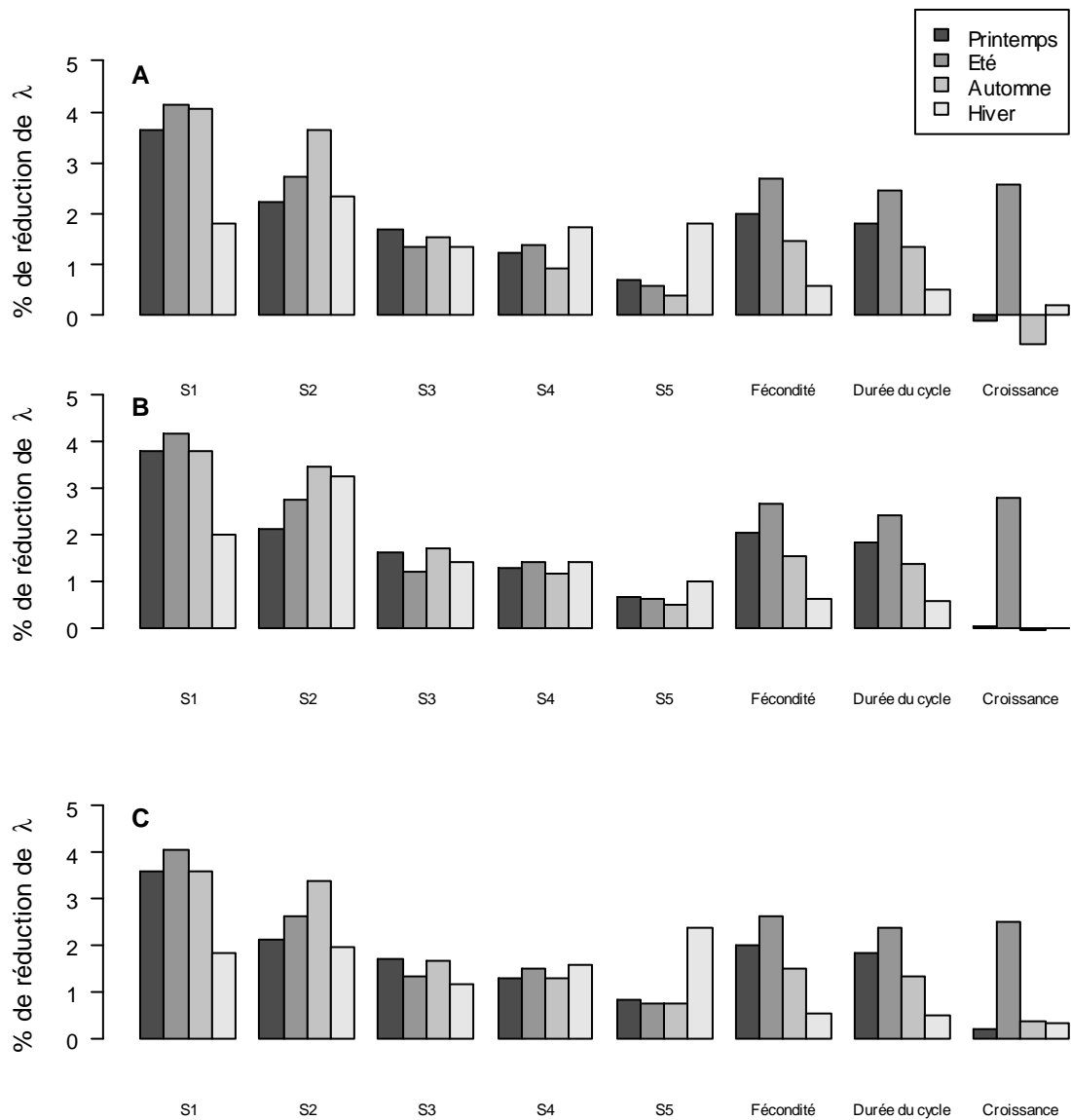


Figure IV-11 : Sensibilité saisonnière du taux d'accroissement asymptotique mensuel  $\lambda$  de *G. fossarum* aux paramètres de survie, fécondité et croissance.

(A) Sensibilité du taux d'accroissement asymptotique pour le modèle mod1 ; (B) Sensibilité du taux d'accroissement asymptotique pour le modèle mod2 et (C) Sensibilité du taux d'accroissement asymptotique pour le modèle mod3.

### 3 Construction du modèle chez *Potamopyrgus antipodarum*

#### 3.1 Structure du modèle mathématique

La population modélisée est une population de *P. antipodarum* sur le Rhône au niveau de la commune de Creys-Malville (longitude : 05°27' 55.3" E, latitude : 45°46' 30.7" N, Rhône, France, cf. **Chapitre II**).

Comme pour *G. fossarum*, nous avons opté pour un modèle de Leslie en classes de taille afin de décrire la dynamique de cette population. Le choix de tels modèles nous a semblé bien adapté étant donné que les traits de vie et les processus métaboliques sont également corrélés à la taille chez cette espèce plutôt qu'à l'âge de l'individu (qui n'est de toute façon pas estimable) et que le cycle de vie ne se décompose pas en une succession de stades de développement. Les suivis démographiques ainsi que les différentes expérimentations menées sur cette population (dont les résultats seront détaillés dans la suite de cette partie) nous ont, selon les mêmes critères que pour la population de gammarès, guidés dans la définition de ces différentes classes.

Ainsi, nous avons structuré la population en cinq classes de tailles : deux classes de juvéniles et trois classes d'adultes. La première classe (**J1**) correspond à des juvéniles ayant une taille supérieure ou égale à la taille à la naissance et strictement inférieure à 2 mm ; la deuxième classe (**J2**) correspond à des juvéniles ayant une taille supérieure ou égale à 2 mm et strictement inférieure à 3,5 mm (Cette taille de 3,5 mm correspond à la taille à la maturité sexuelle que nous avons mise en évidence lors du suivi démographique et qui est cohérente avec les observations d'études précédentes (Gust 2010) ; la troisième classe (**A1**) correspond aux petites femelles ayant une taille supérieure ou égale à 3,5 mm et strictement inférieure à 4,2 mm ; la quatrième classe (**A2**) correspond à des femelles ayant une taille supérieure ou égale à 4,2 mm et strictement inférieure à 4,8 mm et enfin la cinquième classe (**A3**) correspond à des femelles ayant une taille supérieure ou égale à 4,8 mm. A partir de ces différentes classes, nous avons pu définir le cycle de vie de cette population de *P. antipodarum* (**Figure IV-12**) :

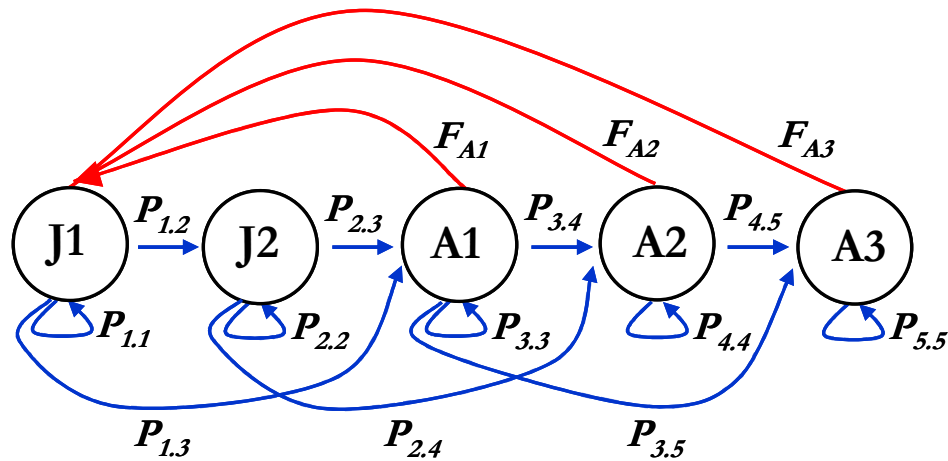


Figure IV-12 : Graphe du cycle de vie de *P. antipodarum* avec une discrétisation en cinq classes de taille.

Les  $F_i$  correspondent à la fécondité de chacune des classes d'adultes, les  $P_{i,k}$  correspondent aux taux de passage individuel de la classe  $i$  à la classe  $j$  (lorsque  $i = j$ , il s'agit donc du taux d'individus qui restent dans la même classe) entre deux mois successifs.

Comme pour le gammare, nous avons opté pour un pas de temps mensuel. Nous avons ainsi paramétré un modèle pour chacun des mois de notre année de suivi afin de pouvoir tenir compte de la variabilité saisonnière de la dynamique de la population étudiée. Nous avons considéré que la population était constituée uniquement de femelles, étant donné que nous n'avons observé aucun mâle lors du suivi mensuel. Cette composition de la population uniquement de femelles est cohérente avec les observations d'autres études qui soulignent le fait que seul les lignées parthénogénétiques sont présentes en Europe (Ponder 1988 ; Schreiber et al. 1998 ; Gerard and Dussart 2003). Ainsi toute la population est prise en compte dans le modèle.

## 3.2 Données biologiques

### 3.2.1 Stratégie d'acquisition des données biologiques

Afin d'estimer les différents paramètres du modèle de dynamique de population (*e.g.*, fécondité, pourcentage de femelles en reproduction, taille à la maturité sexuelle, taux de croissance...), nous avons mis en place une approche expérimentale comprenant : 1- un suivi démographique mensuel de la population et 2- des encagements *in situ* d'organismes issus de la population.

Contrairement au gammare, pour *P. antipodarum* nous avons estimé les différents traits de vie (reproduction, croissance) uniquement à partir des résultats des expérimentations *in situ*. Au départ, nous avons envisagé de procéder selon la même démarche pour les deux espèces en caractérisant au laboratoire la variabilité saisonnière des traits de vie (sous l'hypothèse d'une influence principale de la température) puis en validant ces observations par des encagements *in situ* aux différentes saisons. Cependant, chez *P. antipodarum*, la mise en place d'expérimentations au laboratoire s'est révélée beaucoup plus compliquée que pour *G. fossarum*. En effet, nous avons réalisé des expérimentations selon des protocoles décrits dans la littérature (Gust et al. 2009 ; Gust et al. 2011a) mais nous avons observé des taux de croissance et de reproduction très faibles, même à des températures décrites comme optimales pour cette espèce. Ces résultats s'expliquent probablement par de mauvaises conditions d'exposition (sans sédiment) et d'alimentation (à base de nourriture pour poisson de type Tetramin®) des organismes. Nous avons donc décidé de ne pas utiliser les résultats de ces expérimentations et de nous appuyer uniquement sur des données collectées sur le terrain.

#### 3.2.1.1 Suivi de terrain annuel

Un suivi sur le terrain de la population a été réalisé mensuellement entre octobre 2009 et octobre 2010 (*cf.* protocole décrit dans le **Chapitre II**) avec pour objectifs :

- de mesurer l'évolution des densités et de la structure en taille de la population au cours de l'année.
- de suivre l'activité de reproduction des femelles au cours de l'année (*e.g.*, nombre d'embryons dans la poche embryonnaire, pourcentage de femelles en reproduction...).

Durant le suivi de population, la température de l'eau était suivie en continu tout au long de l'année. Le **Tableau IV-8** récapitule les dates des différents suivis mensuels, ainsi que la température moyenne de l'eau mesurée entre deux dates du suivi. Le nombre de jours entre deux suivis est également indiqué.

Tableau IV-8 : Récapitulatif des dates des différents suivis mensuels de *P. antipodarum* ainsi que de la température moyenne de l'eau mesurée pour chacun des mois.

Code mois	Période du suivi	Durée ( jours)	Température moyenne (°C)
<b>Octobre 2009</b>	19/10/09 au 19/11/09	31	11,3
<b>Novembre 2009</b>	19/11/09 au 18/12/10	29	8,5
<b>Décembre 2009</b>	18/12/09 au 18/01/10	31	5,2
<b>Janvier 2010</b>	18/01/10 au 18/02/10	31	4,5
<b>Février 2010</b>	18/02/10 au 19/03/10	29	5,9
<b>Mars 2010</b>	19/03/10 au 20/04/10	32	9,1
<b>Avril 2010</b>	20/04/10 au 17/05/10	27	12,6
<b>Mai 2010</b>	17/05/10 au 22/06/10	36	15,8
<b>Juin 2010</b>	22/06/10 au 19/07/10	27	21,5
<b>Juillet 2010</b>	19/07/10 au 19/08/10	31	20,8
<b>Août 2010</b>	19/08/10 au 20/09/10	32	18,6
<b>Septembre 2010</b>	20/09/10 au 22/10/10	32	15,3
<b>Octobre 2010</b>	22/10/10 au 18/11/10	27	10,6

### 3.2.1.2 Encagement *in situ*

Nous avons réalisé 10 campagnes d'encagements *in situ* de 21 jours (*cf.* protocole décrit dans le **Chapitre II**) en continu durant une année, à l'exception des périodes où les densités d'individus étaient trop faibles pour pouvoir collecter suffisamment d'organismes pour les expériences (entre février et mai). Nous avons pour objectif d'estimer la variabilité saisonnière :

- de la fécondité des femelles en terme de nombre de juvéniles pondus.
- des taux de croissance individuels des organismes.

Lors des différents encagements, nous avons parfois pu étudier uniquement la croissance ou uniquement la reproduction en fonction de l'abondance des différentes catégories d'individus lors des prélèvements. Pour les encagements où seule la reproduction a pu être mesurée, nous aurions pu essayer d'estimer la croissance à partir des adultes étant donné que nous avons des mesures des individus au début et à la fin de l'exposition. Cependant, la prise de taille sur des adultes n'était pas suffisante pour ajuster un modèle de croissance pertinent. Ainsi au final, nous

avons pu étudier la croissance durant sept campagnes d'encagements et la reproduction durant huit campagnes (**Tableau IV-9**). Les conditions expérimentales des différentes campagnes d'encagements ainsi que les marqueurs qui ont pu être étudiés sont également résumés dans le **Tableau IV-9**.

**Tableau IV-9 : Récapitulatif des dates des différents encagements *in situ* de *P. antipodarum* ainsi que de la température moyenne de l'eau mesurée et des marqueurs qui ont pu être mesurés.**

Code	Date	Température moyenne (°C)	Trait de vie mesuré	
			Croissance	Reproduction
Caging 1	20/10/09 au 09/11/09	11,7	OUI	OUI
Caging 2	18/01/10 au 08/02/10	4,8	OUI	OUI
Caging 3	18/05/10 au 10/06/10	15,7	OUI	NON
Caging 4	10/06/10 au 28/06/10	16,9	OUI	OUI
Caging 5	28/06/10 au 20/07/10	22,7	OUI	OUI
Caging 6	20/07/10 au 11/08/10	20,9	OUI	OUI
Caging 7	11/08/10 au 06/09/10	19,1	NON	OUI
Caging 8	06/09/10 au 02/10/10	17,5	NON	OUI
Caging 9	02/10/10 au 22/10/10	14,7	NON	OUI
Caging 10	22/10/10 au 15/11/10	10,8	OUI	NON

### 3.2.2 Evolution des densités et des structures en taille

Le suivi démographique nous a permis d'estimer les densités ainsi que la répartition des individus dans chacune des classes de taille du modèle (**Figure IV-13**). Nous observons de fortes variations saisonnières avec des pics d'abondance à la sortie de l'été et durant l'automne puis une très forte diminution en fin d'hiver et au printemps. Contrairement à la population de gammares qui persistait durant la période froide à partir d'une majorité d'adultes, chez *P. antipodarum* la population est constituée pendant le passage de la mauvaise saison par une majorité de juvéniles, les adultes étant très rares entre février et juin.

Nous avons également pu estimer une taille à la naissance de 0,5 (0,1) mm environ et une taille maximale de 5,2 (0,3) mm. Ces deux mesures se sont révélées constantes tout au long de notre suivi démographique et sont cohérentes avec les observations d'autres études (Michaut 1968 ; Ponder 1988 ; Sternberg et al. 2010).



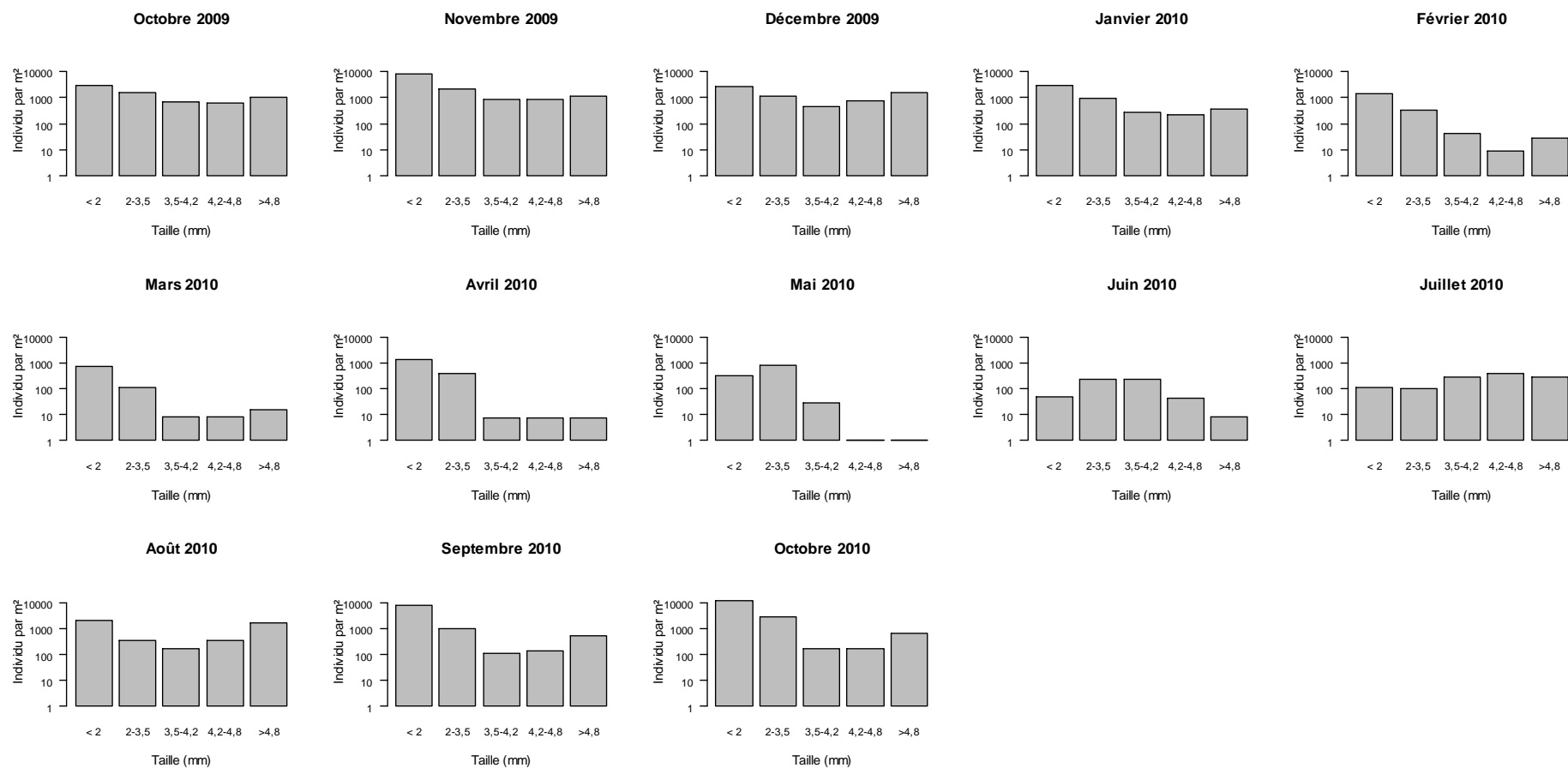


Figure IV-13 : Suivi démographique mensuel de la population de *P. antipodarum* entre octobre 2009 et octobre 2010.

Les histogrammes représentent les densités de femelles observées dans chacune des cinq classes de taille.

### 3.2.3 Estimation des taux de reproduction

#### 3.2.3.1 Evolution de l'état reproducteur des femelles

Lors du suivi démographique, nous avons évalué l'état reproducteur des individus en disséquant et en analysant chaque mois 60 organismes. Ces individus étaient sélectionnés pour couvrir une large gamme de taille dans le but :

- d'estimer la taille à la maturité sexuelle
- d'estimer le pourcentage de femelles en reproduction (*i.e.*, femelles gravides) pour chacune des classes de taille du modèle.
- de déterminer l'influence de la taille sur la fécondité (*i.e.*, nombre d'embryons dans la poche embryonnaire)
- d'étudier la variabilité saisonnière de la fécondité

Nous observons une taille à la maturité sexuelle de 3,5 (0,2) mm cohérente avec les estimations d'autres études sur *P. antipodarum* (Zaranko et al. 1997 ; Schreiber et al. 1998 ; Gust 2010). Nous avons pu vérifier que la population était bien constituée uniquement de femelles puisque nous n'avons observé aucun mâle lors de la dissection des individus (soit plus de 700 organismes au total).

Concernant les taux de reproduction (c'est-à-dire la proportion d'organismes possédant des embryons dans leur poche embryonnaire), ils sont globalement très élevés pour les organismes ayant une taille supérieure à 4,2 mm (correspondant donc aux classes **A2** et **A3** du cycle de vie) (**Tableau IV-10**). Ainsi, nous observons pour ces deux classes des taux supérieurs à 90 % pour tous les mois du suivi. Pour les organismes ayant une taille comprise entre la taille à la maturité sexuelle et 4,2 mm (correspondant aux adultes de la de la classe **A1**), nous observons des taux de reproduction plus faibles avec environ 50 % entre novembre et mai et 80% entre juin et octobre.

Tableau IV-10 : Evolution du pourcentage de femelles de *P. antipodarum* en reproduction au cours de l'année de suivi.

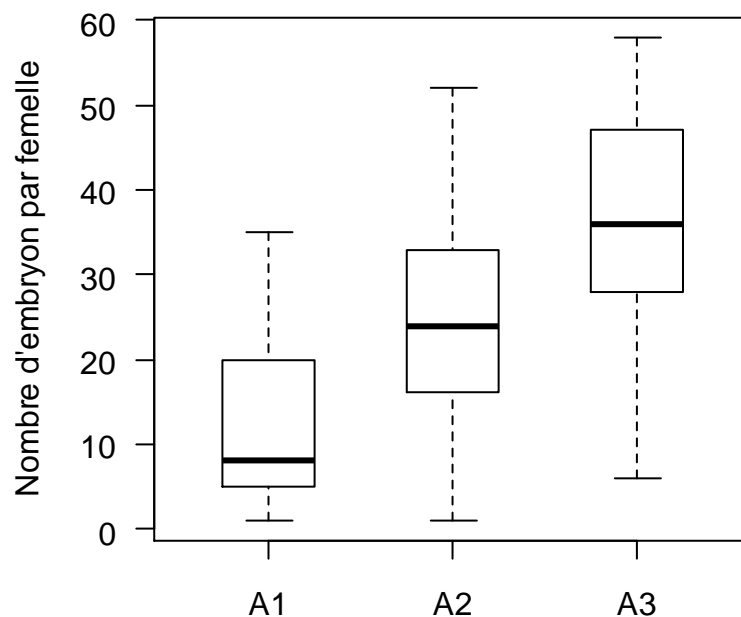
Code mois	% classe A1	% classe A2	% classe A3
Octobre 2009	0,73	1	1
Novembre 2009	0,61	1	1
Décembre 2009	0,41	1	1
Janvier 2010	0,50	1	1
Février 2010	0,40	0,94	0,97
Mars 2010	0,42	1	1
Avril 2010	0,66	1	1
Mai 2010	0,52	1	1
Juin 2010	0,86	1	1
Juillet 2010	0,77	1	1
Août 2010	0,80	0,92	1
Septembre 2010	0,83	0,95	1
Octobre 2010	0,76	0,96	1

Nous avons estimé la fécondité potentielle de chaque organisme en comptant le nombre d'embryons dans la poche embryonnaire. Nous observons une augmentation significative du nombre d'embryons dans la poche embryonnaire avec la taille des organismes pour les trois classes de tailles (test de Kruskal et Wallis,  $p < 10^{-11}$ ).

Lorsque nous considérons l'ensemble des mois de l'année, nous observons des variations mensuelles significatives du nombre d'embryons à l'intérieur de chacune des classes de taille (test de Kruskal et Wallis,  $p = 0,03$  ;  $p < 10^{-11}$  ;  $p < 10^{-4}$  pour les classes **A1**, **A2** et **A3** respectivement). Cependant, ces valeurs de fécondité ne permettent pas d'avoir accès à la fécondité réelle des individus par unité de temps comme cela est nécessaire pour calibrer les modèles de dynamique de population mais à une fécondité potentielle des femelles. En effet, contrairement au gammare chez qui le nombre d'embryons par femelle pouvait être assimilé au nombre de juvéniles produits à la fin du de chaque cycle de mue ; chez *P. antipodarum*, le nombre d'embryons dans la poche n'est pas représentatif du nombre de juvéniles qui seront pondus par un individu pendant une période donnée étant donné que la ponte est continue et que le stock d'embryons est continuellement renouvelé. C'est pour cette raison que nous avons réalisé des encagements *in situ* afin de quantifier le nombre de juvéniles produit par un individu pendant une période donnée.

Nous observons que les femelles ne pondent (et donc ne se reproduisent) que lorsque la température est supérieure à 10,8 °C (**Figure IV-15**). Lorsque nous considérons uniquement les mois où la température est supérieure à ce seuil, nous n'observons plus de différences mensuelles du nombre d'embryons dans la poche embryonnaire pour les trois classes de tailles (test de Kruskal et Wallis,  $p = 0,16$  ;  $p = 0,18$  ;  $p = 0,39$  pour les classes **A1**, **A2** et **A3** respectivement). Ainsi, lors des mois de reproduction, les femelles de la classe **A1** ont en moyenne 12,2 embryons dans leur poche embryonnaire, celles de la classe **A2** 24,3 et celles de la classe **A3** 37,6 (**Figure IV-14**).

Lors des mois froids, les femelles ne se reproduisent pas mais conservent quand même un stock d'embryons dans leur poche, en plus faible quantité que lors des mois de ponte. Ce stock permet probablement aux femelles de pouvoir recommencer à pondre dès que des conditions favorables se présentent de nouveau.



**Figure IV-14 : Fécondité potentielle moyenne des femelles de *P. antipodarum* (en nombre d'embryons par femelle dans la poche embryonnaire) pour chacune des trois classes d'adultes.**

Les boîtes s'étendent du premier au troisième quartile de la distribution des mesures avec le trait noir qui correspond à la médiane. Les moustaches s'étendent jusqu'aux valeurs extrêmes des mesures ne dépassant pas 1,5 fois l'écart interquartile.

## 3.2.3.2 Estimation de la fécondité des femelles

Pour les huit campagnes d'encagements, nous avons utilisé des organismes de taille homogène : 4,5 (0,2) mm correspondant à des adultes de la classe **A2**. Nous avons étudié la fécondité en récupérant et en comptant les juvéniles produits à la fin de l'exposition. Nous avons ainsi estimé la fécondité, exprimée en néonates (*i.e.*, nouveaux-nés) produits par individu et par jour, selon la formule :

$$fec = \frac{(nbnéonates)}{((ninit + nfin) / 2) \Delta t} \quad \text{Eq IV-8}$$

où *fec* correspond à la fécondité, *nbnéonates* au nombre de juvéniles produits, *ninit* au nombre d'organismes au début de l'exposition, *nfin* au nombre d'organismes à la fin de l'exposition et  $\Delta t$  à la durée en jour de l'exposition.

Nous observons une forte variabilité saisonnière de la fécondité (**Figure IV-15**). Nous avons fait l'hypothèse que les variations de température étaient le principal facteur expliquant cette variabilité. En effet, lors de l'encagement réalisé en hiver (*Caging 2*), nous avons observé une reproduction nulle pour une température moyenne de 4,8 °C puis lors des autres encagements, nous voyons que la quantité de néonates produits suit une distribution en cloche en lien avec la température de l'eau.

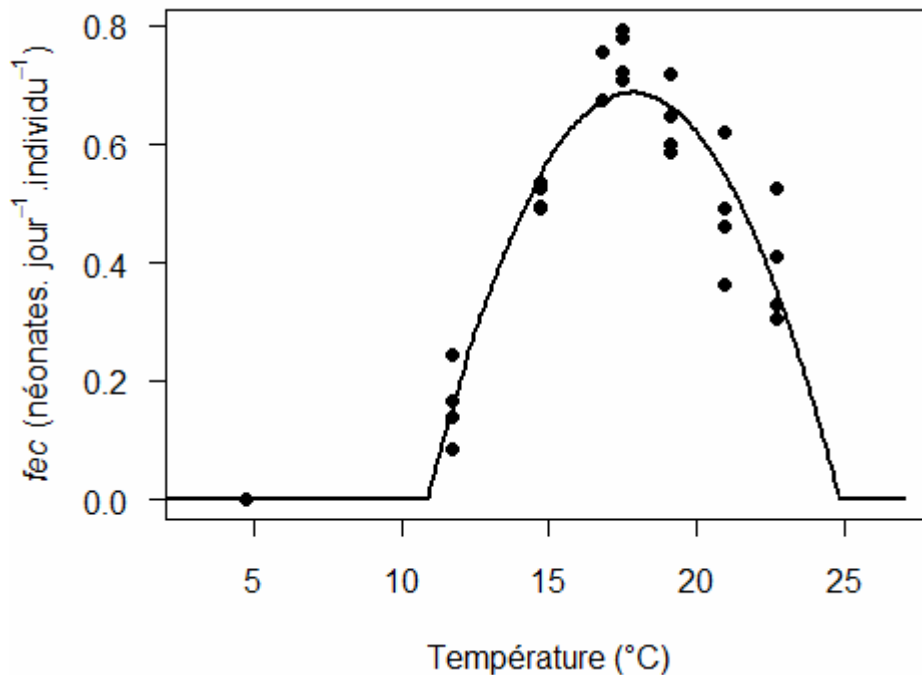
Nous avons alors ajusté, par régression non linéaire, un modèle à seuils avec : 1- une reproduction nulle entre 0 °C et une température seuil à partir de laquelle les femelles commencent à se reproduire ; 2- une relation polynomiale entre la fécondité et la température à partir de cette température seuil et jusqu'à une température maximale à partir de laquelle la reproduction devient nulle et enfin 3- une reproduction à nouveau nulle après cette température maximale de reproduction.

Pour la fonction polynomiale, nous obtenons la relation suivante en fécondité et température :

$$fec = -0,01 \Theta^2 + 0,50 \Theta - 3,79 \quad \text{Eq IV-9}$$

où *fec* correspond à la fécondité des individus (juvéniles par jour et par individu) et  $\Theta$  à la température de l'eau (°C).

Ainsi, nous prédisons une reproduction nulle jusqu'à 10,8 °C puis, le nombre de juvéniles pondus suit une courbe en cloche avec une reproduction maximale pour une température de 17,8°C pour laquelle une femelle pond en moyenne 0,7 juvénile par jour. Et enfin, à partir de 24,9 °C, la reproduction est de nouveau nulle. Nous voyons que ce modèle à seuil s'ajuste bien à nos observations sur le terrain (**Figure IV-15**).



**Figure IV-15 :** Effet de la température (°C) sur la fécondité réalisée (néonates.jour<sup>-1</sup>.individu<sup>-1</sup>) des femelles de *P. antipodarum*.

Les points correspondent aux taux de fécondité observés durant les encagements *in situ* réalisés entre octobre 2009 et novembre 2010 et la courbe au modèle à seuil que nous avons ajusté (Eq IV-7).

### 3.2.4 Estimation des taux de croissance

Pour estimer les taux de croissance lors des encagements où la croissance a pu être mesurée, nous avons mesuré les individus au début et à la fin de l'exposition. Entre une et trois classes de taille d'organismes étaient utilisées en fonction de l'abondance des organismes dans la population. Nous observons une croissance lente des individus à faible température (*e.g.*, caging 2 et caging 10) qui augmente progressivement puis diminue pour les températures plus fortes (*e.g.*, caging 5 et caging 6).

Nous avons alors ajusté, par régression non linéaire, un modèle logistique pour chacun des engagements avec la fonction *nl*. Dans ces modèles logistiques, la taille maximale était fixée à 5,2 mm et la taille initiale correspondait à la taille de départ de chacune des classes. Nous avons ainsi pu obtenir les taux de croissance observés lors des différentes campagnes. Nous voyons que les estimations des taux de croissance individuels ainsi obtenus s'ajustent sur les observations faites lors des différents engagements (**Figure IV-16**).

Au regard des résultats aux différentes saisons, la relation entre le taux de croissance individuel  $r$  et la température  $\Theta$  a été modélisée par une fonction gaussienne et intégrée dans le modèle logistique (**Eq IV-8 et IV-9**).

$$L(t) = L_{max} / \left( 1 + \left( \frac{L_{max}}{L_{init}} - 1 \right) e^{-(f(\Theta)) \Delta t} \right) \quad \text{Eq IV-10}$$

$$f(\Theta) = \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} e^{\left( -\frac{1}{2} \left( \frac{\Theta - \mu}{\sigma} \right)^2 \right)} \quad \text{Eq IV-11}$$

où  $L(t)$  correspond à la taille des individus au cours du temps,  $L_{max}$  à la taille maximale des individus (fixée à 5,2 mm),  $L_{init}$  à la taille initiale des individus,  $\Delta t$  au temps,  $\Theta$  à la température de l'eau,  $\mu$  et  $\sigma$  aux paramètres de la loi normale ( $\mu$  correspondant à la température optimale de croissance et  $\sigma$  à l'écart type).

Nous obtenons alors la relation suivante entre le taux de croissance individuel  $r$  et la température  $\Theta$  :

$$r = 0,008 + 0,023 e^{\left( \frac{18,672 - \Theta}{6,981} \right)^2} \quad \text{Eq IV-12}$$

où  $r$  correspond au taux de croissance individuel (mm.jour<sup>-1</sup>) et  $\Theta$  à la température (°C)

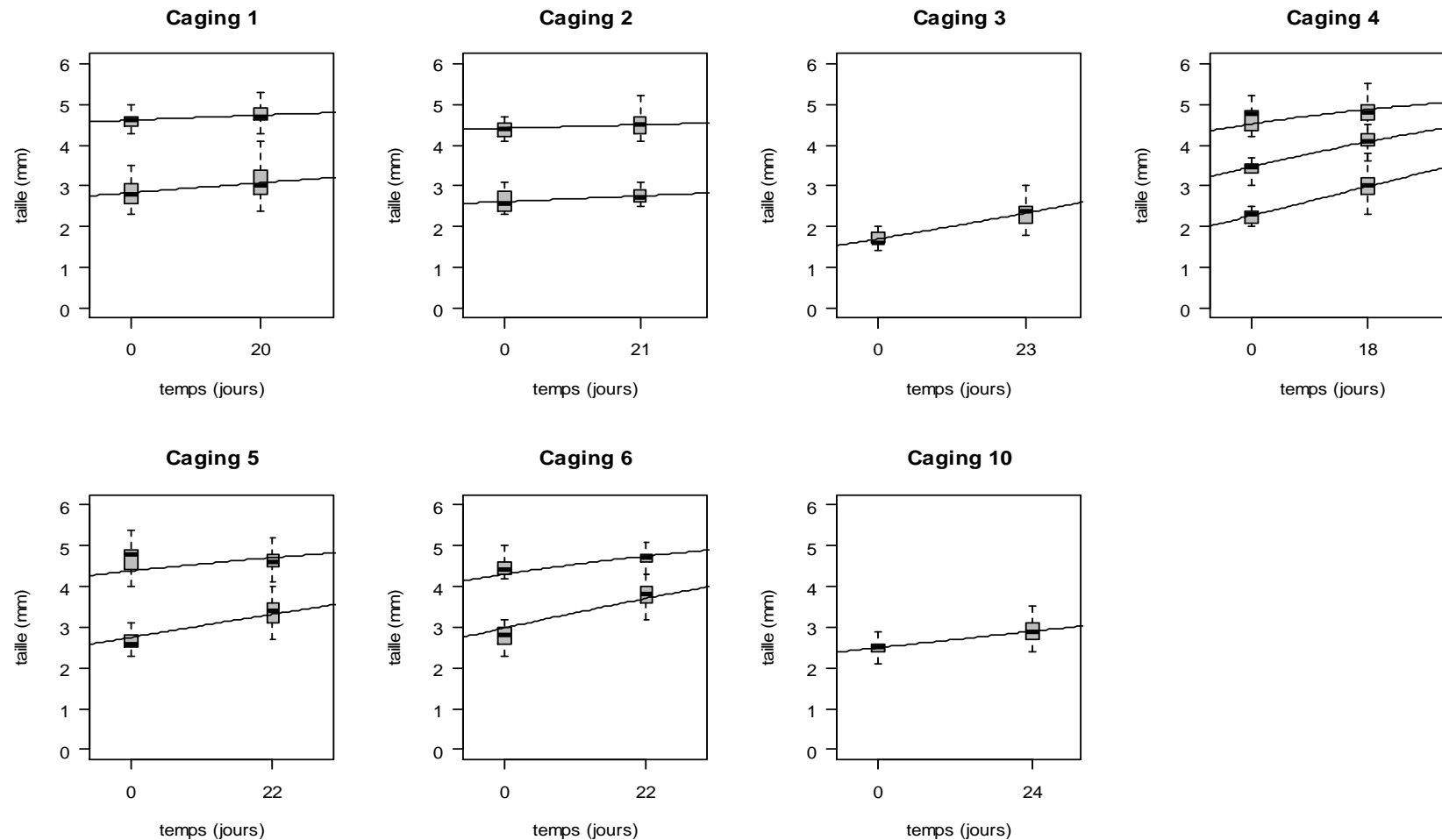
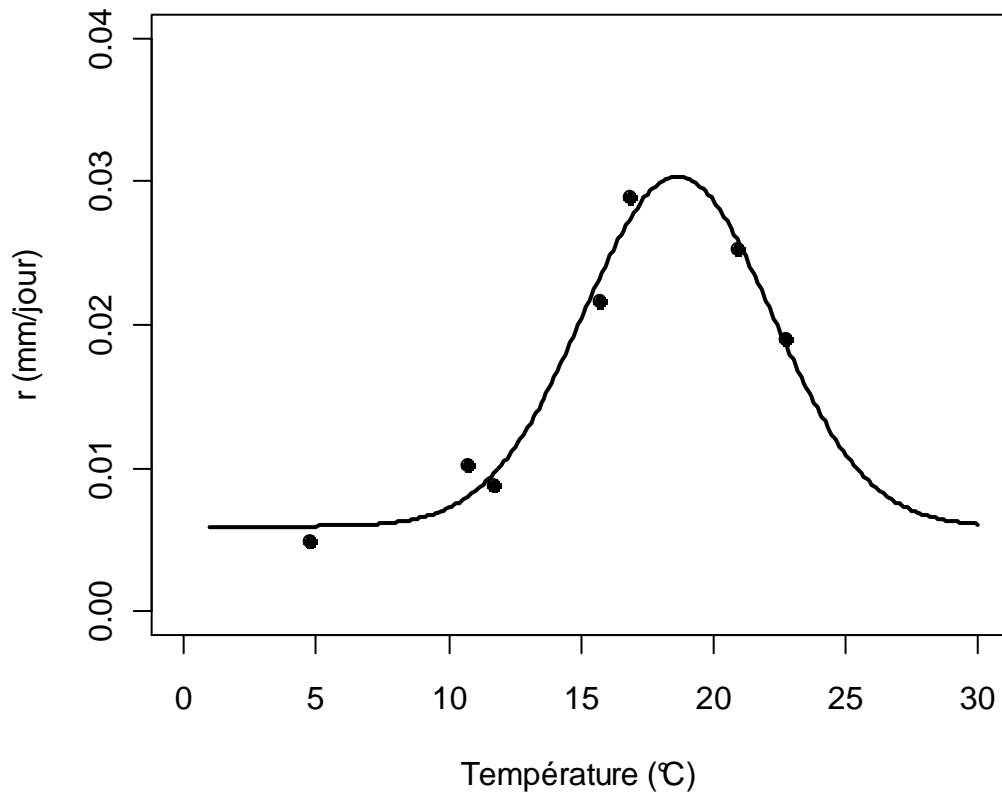


Figure IV-16 : Evolution de la taille (mm) des différentes classes de *P. antipodarum* lors des différents encagements.

Les boîtes s'étendent du premier au troisième quartile de la distribution des mesures avec le trait noir qui correspond à la médiane. Les moustaches s'étendent jusqu'aux valeurs extrêmes des mesures ne dépassant pas 1,5 fois l'écart interquartile. Les courbes correspondent aux prédictions du modèle logistique ajusté pour chacun des encagements.



Nous voyons que cette relation entre température et taux de croissance s'ajuste aux estimations faites pour chaque encagements (**Figure IV-17**).



**Figure IV-17** : Effet de la température (°C) sur le taux de croissance (mm.jour<sup>-1</sup>) de *P. antipodarum*.

Les points correspondent aux taux de croissance estimés pour chacun des encagements *in situ* réalisés entre octobre 2009 et novembre 2010 et la courbe au modèle global (Eq IV-10).

### 3.3 Paramétrisation du modèle de dynamique de population

Soit  $n_{(i)}(k)$  le nombre d'individus de la classe de taille  $i$  (5 classe possibles :  $i = 1$  pour les **J1**,  $i = 2$  pour les **J2**,  $i = 3$  pour les **A1**,  $i = 4$  pour les **A2** et  $i = 5$  pour les **J3**) au mois  $k$  (12 mois possibles :  $k = 1, \dots, k = 12$  avec  $k = 1$  pour le mois d'octobre et  $k = 12$  pour le mois de septembre). De la même manière que pour la population de *G. fossarum*, il est alors possible de définir 12 matrices mensuelles  $\mathbf{M}_k$  (pour chaque mois  $k$ ) qui une fois multipliées toutes les unes à la suite des autres nous permettent de définir une matrice annuelle  $\mathbf{L}$  et de lier le vecteur population de l'année  $t + 1$  à celui de l'année  $t$  (**Eq IV-3 et IV-5**). A partir des expérimentations

présentées précédemment, nous avons pu estimer pour chaque matrice  $\mathbf{M}_k$  les 17 paramètres (**Eq IV-5**) et ainsi calculer la matrice  $\mathbf{L}$ .

### 3.3.1 Estimation de la fécondité $f_{i,k}$

Nous avons estimé les taux de reproduction  $f_{i,k}$  des femelles des  $i$  classes d'adultes ( $i = 3, 4$  et 5) pour chacun des  $k$  ( $k = 1, \dots, 12$ ) mois de l'année de suivi selon la formule :

$$f_{i,k} = sr_k \text{ fec}_{i,k} \text{ perc}repro_{i,k} \Delta t_k \quad \text{Eq IV-13}$$

où  $f_{i,k}$  correspond à la fécondité par femelle et par mois de la classe  $i$  au mois  $k$  ;  $sr_k$  au sex-ratio au mois  $k$  ;  $\text{fec}_{i,k}$  au nombre de néonates pondus par femelle et par jour de la classe  $i$  au mois  $k$  en néonates ;  $\text{perc}repro_{i,k}$  au pourcentage de femelles en reproduction de la classe  $i$  au mois  $k$  et  $\Delta t_k$  à la durée de la période de suivi du mois  $k$  en jours.

Nous avons fixé la sex-ratio à 1 étant donné que la population est composée uniquement de femelles. A partir des engagements, nous avons pu estimer la fécondité (c'est-à-dire le nombre de néonates pondus par jour) pour les individus de la deuxième classe de taille d'adultes (**A2**). Pour des raisons méthodologiques, nous n'avons pas pu l'étudier directement pour les deux autres classes d'adultes. Pour les mois où nous prédisons une fécondité nulle pour la classe **A2**, nous l'avons également considérée comme nulle pour les deux autres classes (**A1** et **A3**). Pour les mois où elle est non nulle, nous nous sommes servis de nos résultats sur la fécondité potentielle des femelles obtenus *via* l'observation des embryons dans la poche embryonnaire. Nous avons fait l'hypothèse que, bien qu'il ne soit pas représentatif du nombre de juvéniles qui seront pondus pendant une période donnée, le nombre d'embryons dans la poche embryonnaire en fonction de la taille était quand même un indicateur de la fécondité relative des femelles. Nous avons vu que ce nombre d'embryons était constant durant les mois de reproduction. Nous observons en moyenne deux fois moins d'embryons pour les individus de la classe **A1** par rapport à ceux de la classe **A2** (12,2 *vs* 24,3) et 1,5 fois plus d'embryons pour ceux de la classe **A3** par rapport à ceux de la classe **A2** (37,6 *vs* 24,3). Nous avons donc appliqué ces facteurs à nos estimations pour la classe **A2** afin de prédire le nombre de juvéniles pondus par jour pour les individus des classes **A1** et **A3**.

Nous obtenons ainsi les taux de fécondité pour chacune des classes et chacun des mois. Ils sont résumés dans le **Tableau IV-11**. Nous voyons que les taux de reproduction sont nuls entre novembre et mars (la température est inférieure au seuil de 10,8 °C) puis qu'ils augmentent progressivement jusqu'à être maximaux en été.

**Tableau IV-11 : Estimation des taux de fécondité  $f_{i,k}$  pour les trois classes d'adultes ( $i = 3$  à  $5$ ) de *P. antipodarum* lors des  $k$  mois du suivi de population (production de néonates par mois et par femelle)**

Mois	Classe		
	$f_3$	$f_4$	$f_5$
Octobre 2009 ( $k = 1$ )	1,20	2,73	4,18
Novembre 2009 ( $k = 2$ )	0,00	0,00	0,00
Décembre 2009 ( $k = 3$ )	0,00	0,00	0,00
Janvier 2010 ( $k = 4$ )	0,00	0,00	0,00
Février 2010 ( $k = 5$ )	0,00	0,00	0,00
Mars 2010 ( $k = 6$ )	0,00	0,00	0,00
Avril 2010 ( $k = 7$ )	2,20	8,02	12,28
Mai 2010 ( $k = 8$ )	6,23	22,74	34,78
Juin 2010 ( $k = 9$ )	5,83	13,30	20,34
Juillet 2010 ( $k = 10$ )	7,62	17,37	26,58
Août 2010 ( $k = 11$ )	9,52	21,73	33,24
Septembre 2010 ( $k = 12$ )	8,40	19,15	29,30

### 3.3.2 Estimation des taux de transition $P_{ij,k}$

#### 3.3.2.1 Calcul des taux de passage $g_{ij,k}$ de la classe $i$ à la classe $j$ pour chacun des $k$ mois de l'année

Afin d'estimer les taux de passage, pour chacune des classes et chacun des mois, nous avons procédé de la même façon que pour *G. fossarum*. Nous avons dans un premier temps calculé, en prenant la température moyenne de chaque mois  $k$ , l'évolution de chacune des classes de taille  $i$  entre le mois  $k$  et le mois  $k + 1$  selon la formule (**Eq IV-14**) :

$$L_{i,k+1} = L_{max} \left/ 1 + \left( \frac{L_{max}}{L_{i,k}} - 1 \right) e^{- \left( 0,008 + 0,023 e^{\left( \frac{18,672 - \Theta_k}{6,98} \right)^2} \right) \Delta k} \right.$$

Eq IV-14

où  $L_{i,k+1}$  correspond à la taille en mm des individus de la classe  $i$  au mois  $k + 1$ ,  $L_{i,k}$  à la taille en mm des individus de la classe  $i$  au mois  $k$ ,  $L_{max}$  à la taille maximale en mm des femelles,  $\Delta k$  à la durée en jours du mois  $k$  et  $\Theta_k$  à la température moyenne du mois  $k$  en °C.

Nous avons ainsi pu déterminer dans un second temps les taux de passage de la classe  $i$  vers la classe  $j$  pour chacune des classes de taille et chacun des mois  $k$ . Nous avons fait l'hypothèse que les individus sont distribués de manière uniforme dans chacune des classes de taille. Selon les mois et les classes, nous observons des variations importantes de ces taux de passage, les individus pouvant grandir de plusieurs classes de tailles lors des mois les plus chauds ou au contraire rester majoritairement dans leur classe taille initiale lors des mois d'hiver. Le **Tableau IV-12** récapitule les différents taux de passage pour les différents mois du suivi de population.

Tableau IV-12 : Estimation des taux de passage mensuels d'une classe à une autre lors des différents mois du suivi de population de *P. antipodarum*.

Mois	$G_{11}$	$G_{12}$	$G_{13}$	$G_{22}$	$G_{23}$	$G_{24}$	$G_{33}$	$G_{34}$	$G_{35}$	$G_{44}$	$G_{45}$	$G_{55}$
Octobre 2009 ( $k = 1$ )	0,76	0,24	0	0,76	0,24	0	0,58	0,42	0	0,69	0,31	1
Novembre 2009 ( $k = 2$ )	0,84	0,16	0	0,84	0,16	0	0,73	0,27	0	0,80	0,20	1
Décembre 2009 ( $k = 3$ )	0,84	0,16	0	0,84	0,16	0	0,73	0,27	0	0,80	0,20	1
Janvier 2010 ( $k = 4$ )	0,84	0,16	0	0,84	0,16	0	0,73	0,27	0	0,80	0,20	1
Février 2010 ( $k = 5$ )	0,85	0,15	0	0,85	0,15	0	0,74	0,26	0	0,81	0,19	1
Mars 2010 ( $k = 6$ )	0,81	0,18	0	0,82	0,18	0	0,68	0,32	0	0,77	0,23	1
Avril 2010 ( $k = 7$ )	0,73	0,27	0	0,72	0,28	0	0,52	0,48	0	0,64	0,36	1
Mai 2010 ( $k = 8$ )	0,34	0,66	0	0,23	0,63	0,14	0	0,86	0,14	0	1	1
Juin 2010 ( $k = 9$ )	0,49	0,51	0	0,43	0,56	0,01	0	1	0	0,19	0,81	1
Juillet 2010 ( $k = 10$ )	0,37	0,63	0	0,27	0,62	0,11	0	0,92	0,08	0	1	1
Août 2010 ( $k = 11$ )	0,27	0,73	0	0,13	0,64	0,23	0	0,69	0,31	0	1	1
Septembre 2010 ( $k = 12$ )	0,44	0,56	0	0,38	0,59	0,03	0	1	0	0,09	0,91	1

3.3.2.2 Estimation des taux de survie  $s_i$  des  $i$  classes pour chacun des  $k$  mois de l'année

De même que pour *G. fossarum*, nous n'avons pas pu étudier directement les taux de survie mensuels des différentes classes de taille de manière expérimentale. Nous avons donc dû estimer ces taux de survie selon la même démarche. Le **Tableau IV-13** nous indique les estimations des différents taux de survie.

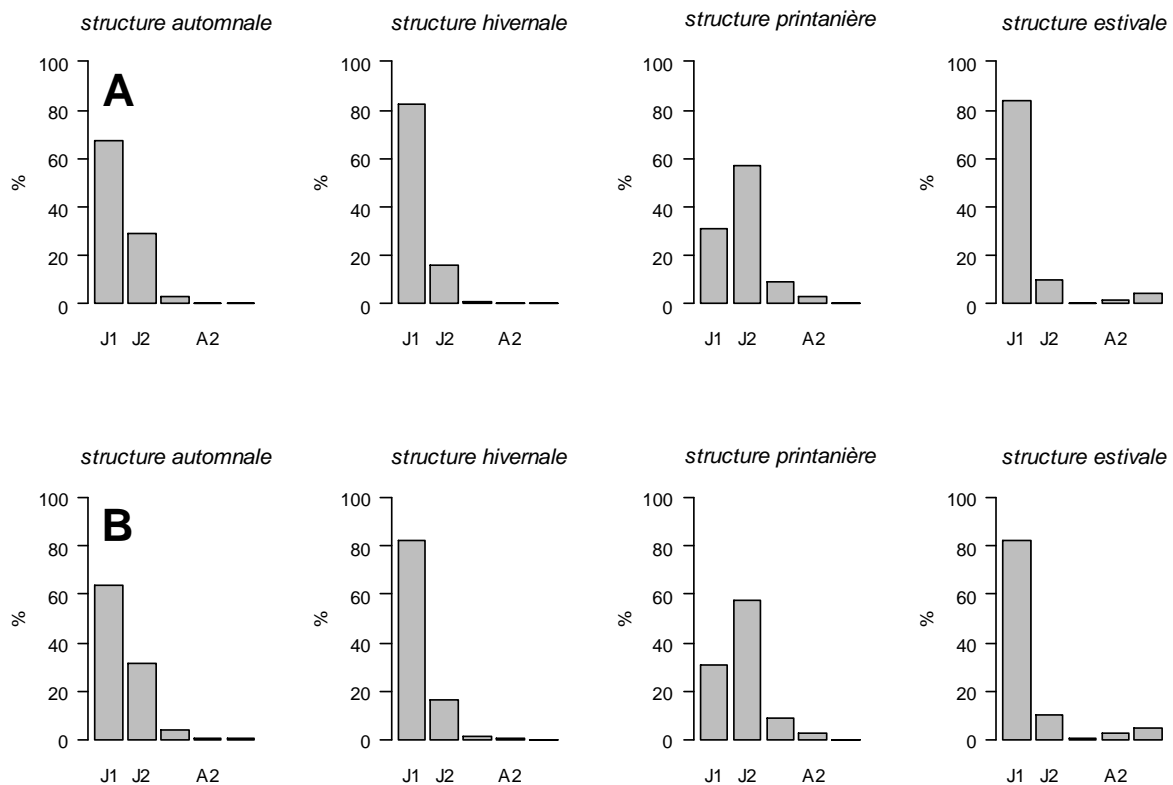
**Tableau IV-13 : Estimation des taux de survie de apparents *P. antipodarum* pour les cinq classes de taille lors des différents mois du suivi de population**

Mois	$S_1$	$S_2$	$S_3$	$S_4$	$S_5$
<b>Octobre 2009 (<math>k = 1</math>)</b>	1,70	0,67	1,95	0,87	0,21
<b>Novembre 2009 (<math>k = 2</math>)</b>	0,41	0,21	1,08	1,37	0,52
<b>Décembre 2009 (<math>k = 3</math>)</b>	1,22	0,33	0,25	0,23	0,13
<b>Janvier 2010 (<math>k = 4</math>)</b>	0,53	0,05	0,09	0,03	0,00
<b>Février 2010 (<math>k = 5</math>)</b>	0,56	0,03	0,40	0,70	1,00
<b>Mars 2010 (<math>k = 6</math>)</b>	2,73	0,14	0,00	0,00	0,00
<b>Avril 2010 (<math>k = 7</math>)</b>	0,88	0,05	0,00	0,00	0,00
<b>Mai 2010 (<math>k = 8</math>)</b>	0,74	0,33	1,43	0,00	0,00
<b>Juin 2010 (<math>k = 9</math>)</b>	0,72	1,74	2,49	5,13	0,00
<b>Juillet 2010 (<math>k = 10</math>)</b>	0,45	1,00	2,41	3,12	0,32
<b>Août 2010 (<math>k = 11</math>)</b>	0,25	0,08	1,26	0,61	0,08
<b>Septembre 2010 (<math>k = 12</math>)</b>	0,94	0,05	1,95	2,21	0,12

De la même façon que pour le gammare, nous voyons que pour certains mois, les survies ainsi estimées sont supérieures à 1. Ces cas de figures correspondent généralement à des mois et des classes de tailles où les effectifs étaient très faibles (*e.g.*, juin 2010, juillet 2010), nous avons donc supposé que ces surestimations des taux de survie étaient liés à des erreurs d'échantillonnage. Nous avons décidé de paramétrer dans ce cas seulement deux modèles de dynamique de population : un premier en conservant les taux de survies apparents (**mod1**) et un deuxième où nous avons forcé à 1 les taux de survie supérieurs à 1 (**mod2**). Contrairement au gammare, nous n'avons pas paramétré de modèle avec des survies moyennées étant donné les faibles différences entre les modèles vus précédemment.

### 3.4 Caractérisation de la dynamique de la population

Le produit des matrices de Leslie mensuelles  $\mathbf{M}_k$  nous permet d'obtenir une matrice de Leslie annuelle  $\mathbf{L}$  de dimension 5. La matrice  $\mathbf{L}$  est une matrice primitive. Aussi, nous avons pu calculer les mêmes indicateurs populationnels que pour la population de gammares. Nous trouvons un taux de croissance asymptotique de 3,34 pour le modèle **mod1** et de 1,17 pour le modèle **mod2**. Ceci indique dans les deux cas une croissance potentielle de la population ( $\lambda > 1$ ).



**Figure IV-18 : Evolution saisonnière de la structure en taille stable de la population de *P. antipodarum***

(A) Structure en taille stable pour le modèle mod1 et (B) Structure en taille stable pour le modèle mod2

Nous avons également caractérisé les structures en taille stables aux différentes saisons pour nos deux modèles (**Figure IV-18**). La structure automnale correspond à la structure à la fin du mois de novembre, la structure hivernale à celle à la fin du mois de février, la structure printanière à celle à la fin du mois de juin et la structure estivale à celle à la fin du mois de septembre. En comparant les distributions en taille stables de chaque classe de taille avec les

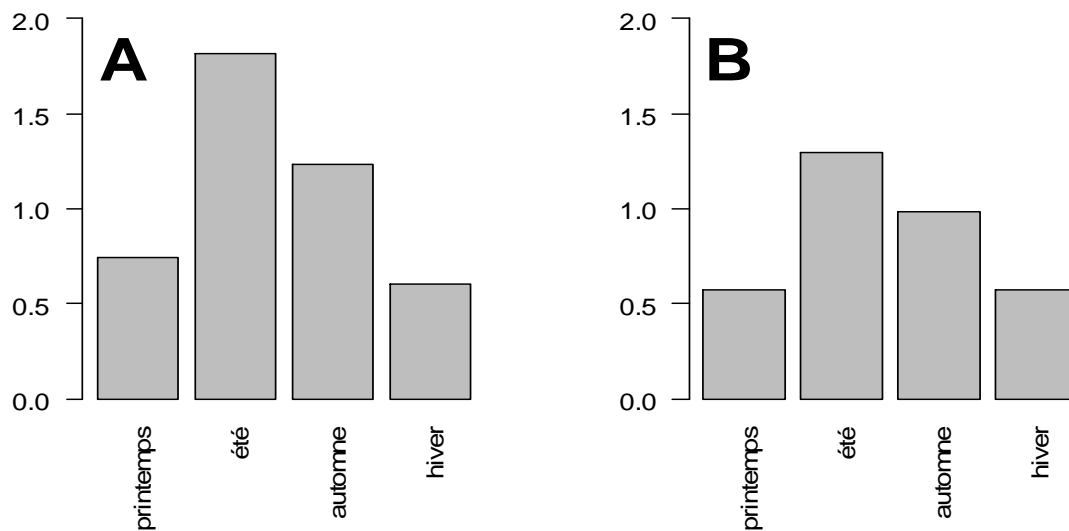
proportions d'individus de chaque classe obtenues lors du suivi démographique, nous voyons que les trois modèles prédisent des structures saisonnières cohérentes avec les observations *in situ*, avec une grande majorité de juvéniles dans la population et de faibles proportions d'adultes, en particulier en hiver et au printemps.

Nous voyons que nos deux modèles, malgré des prédictions du taux de croissance asymptotique très différentes, présentent des structures stables proches qui constituent une description vraisemblable de la dynamique d'une population de *P. antipodarum*. Les flux démographiques relatifs (c'est-à-dire la « mécanique saisonnière » de la population) entre les différentes classes d'individus sont donc bien modélisés.

### 3.5 Variabilité saisonnière de la dynamique

Comme pour la population de gammares, nous avons voulu caractériser les variabilités saisonnières de la dynamique de notre population. Pour cela, nous avons calculé 4 matrices saisonnières résultant du produit des matrices  $\mathbf{M}_k$  des mois de chaque saison (mars – avril – mai pour la matrice printanière  $\mathbf{L}_p$ , juin – juillet – août pour la matrice estivale  $\mathbf{L}_E$ , septembre – octobre – novembre pour la matrice automnale  $\mathbf{L}_A$  et décembre – janvier – février pour la matrice hivernale  $\mathbf{L}_H$ ). Ces matrices étant primitives, nous pouvons déterminer de la même manière que pour la matrice annuelle différents indicateurs populationnels. Nous avons choisi de ne présenter que les résultats concernant le taux d'accroissement asymptotique  $\lambda$  (**Figure IV-19**). Nous observons une forte variabilité des  $\lambda$  saisonniers avec une forte croissance potentielle de la population en été et en automne ( $\lambda > 1$ ) et une décroissance de la population au printemps et en hiver ( $\lambda < 1$ ). Ce profil est observé pour les deux modèles **mod1** et **mod2**.





**Figure IV-19 : Variations saisonnières du taux de croissance asymptotique  $\lambda$  de la population de *P. antipodarum*.**

(A) Taux de croissance asymptotique pour le modèle mod1 et (B) Taux de croissance asymptotique pour le modèle mod2. Chaque  $\lambda$  est calculé à partir des matrices saisonnières (simulation de saisons éternelles) et ramené à une durée de un mois afin de les rendre comparables entre eux.

### 3.6 Sensibilité aux paramètres démographiques

Pour tester la sensibilité de  $\lambda$  à la variation des différents paramètres démographiques (survie, reproduction, croissance), nous avons étudié l'effet sur le taux d'accroissement asymptotique de la population  $\lambda$  des variations des valeurs choisies pour les différents paramètres. Pour cela, nous avons appliqué successivement une diminution de 10 % des valeurs de survie ( $s_1, s_2, s_3, s_4$  et  $s_5$ ), une diminution de 10% de la fécondité (*fec*, **Eq IV-13**) et une diminution de 10% du taux de croissance individuel ( $r$ , **Eq IV-12**).

#### 3.6.1 Sensibilité annuelle

La **Figure IV-20** rend compte des variations de  $\lambda$  pour nos deux modèles **mod1** et **mod2**. Nous voyons que pour nos deux modèles, le taux de survie de la première classe de juvéniles **J1** ( $s_1$ ) est le paramètre le plus influent. Cette forte sensibilité des populations de *P. antipodarum* aux variations de la survie des juvéniles est cohérente avec les conclusions d'autres études (Møller et al. 1996 ; Jensen et al. 2001 ; Pedersen et al. 2009). Ainsi, Pedersen (2009)

souligne, lors d'une étude sur l'impact au niveau populationnel du HHCB, que la survie des jeunes est de très loin le trait de vie le plus influent sur le taux de croissance asymptotique. Dans notre cas, nous obtenons qu'une diminution de 10% de la survie des **J1** conduit à une diminution de plus de 60% du taux de croissance de la population. En revanche, la dynamique de la population apparaît très peu sensible aux survies adultes. Concernant la reproduction, nous voyons que, bien qu'elle soit beaucoup moins influente que la survie des **J1**, la fécondité est quand même un paramètre important pour la dynamique de la population puisque nous observons une diminution d'un peu plus de 10% du  $\lambda$ . Enfin, concernant la croissance, de la même manière que pour la population de gammares à certaines saisons, nous observons une augmentation du taux de croissance asymptotique de la population avec la réduction des taux de croissance individuel  $r$ . Ce résultat surprenant s'explique là aussi probablement par les très faibles taux de survie de la dernière classe de taille lors de certains mois.

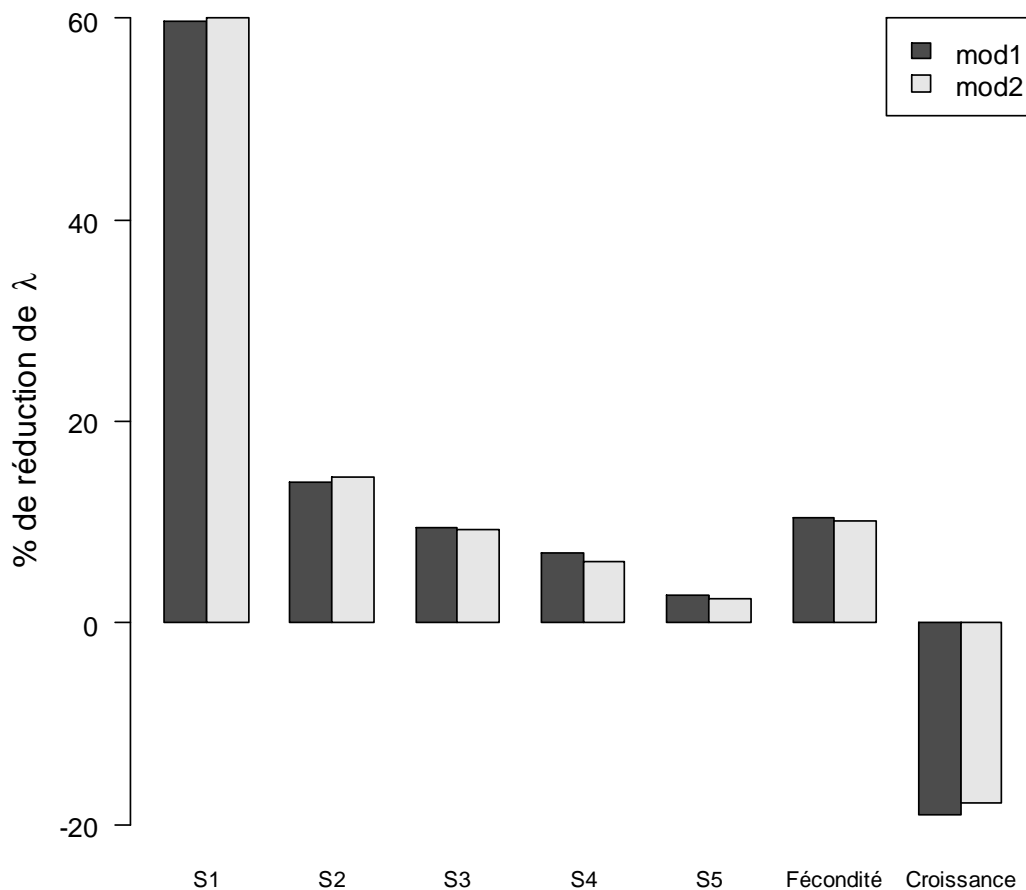


Figure IV-20 : Sensibilité du taux d'accroissement asymptotique annuel  $\lambda$  de la population de *P. antipodarum* aux paramètres de survie, de fécondité et de croissance (réduction de 10 %).

### 3.6.2 Sensibilité saisonnière

De même que pour le gammare, il nous a semblé particulièrement pertinent de nous intéresser aux différences saisonnières de la sensibilité de la population dans le contexte de ce travail. La **Figure IV-21** rend compte des variations de  $\lambda$  observées lors des différentes saisons et pour les deux types de modèles. Là encore, les réponses observées pour les deux modèles sont très proches et il apparaît tout de suite que les variations de la sensibilité du taux d'accroissement sont beaucoup plus marquées que pour la population de gammares. En effet, au printemps et en hiver, le taux d'accroissement de la population se révèle extrêmement sensible à la réduction de la survie des juvéniles de la classe **J1** et très peu aux variations des autres traits alors qu'en été et en automne, la sensibilité à la survie des **J1** est moins importante et la population devient alors plus sensible aux réductions de la fécondité et de la survie des adultes.

Cette forte variabilité saisonnière de la sensibilité de la population s'explique par le fonctionnement assez particulier de la population de *P. antipodarum*. En effet, durant les périodes froides, elle est composée quasiment uniquement de petits juvéniles alors que les adultes ne se reproduisent pas et sont présents en très faible quantité (ils sont même totalement absents durant certains mois de l'année). Il est alors logique que durant cette période, la population soit très sensible à la survie de cette catégorie d'organismes et peu, voire pas du tout, sensible aux autres paramètres. Ce profil singulier explique pourquoi lors de ces deux saisons, nous observons également une augmentation du taux de croissance asymptotique de la population avec la réduction de la croissance individuelle. En effet, les individus restent alors plus longtemps dans la classe de taille **J1** qui présente de très bons taux de survie.

A l'opposé, lorsque les périodes chaudes arrivent, c'est-à-dire en été et en automne, les juvéniles grandissent très vite et approvisionnent les différentes classes d'adultes qui entrent dans une période de forte reproduction. Par rapport à d'autres populations de *P. antipodarum*, dans ce site, les températures sont en effet faibles jusqu'au début de l'été en raison des apports importants d'eau froide lors de la période de fonte des neiges. La population se révèle alors beaucoup plus sensible aux réductions de la survie des différentes classes de taille et à la fécondité. D'un autre côté, la réduction de la croissance devient très peu sensible car la fitness des organismes est élevée quelle que soit leur classe de taille, il n'y a donc ainsi pas d'avantage à rester plus longtemps dans les classes de juvéniles.

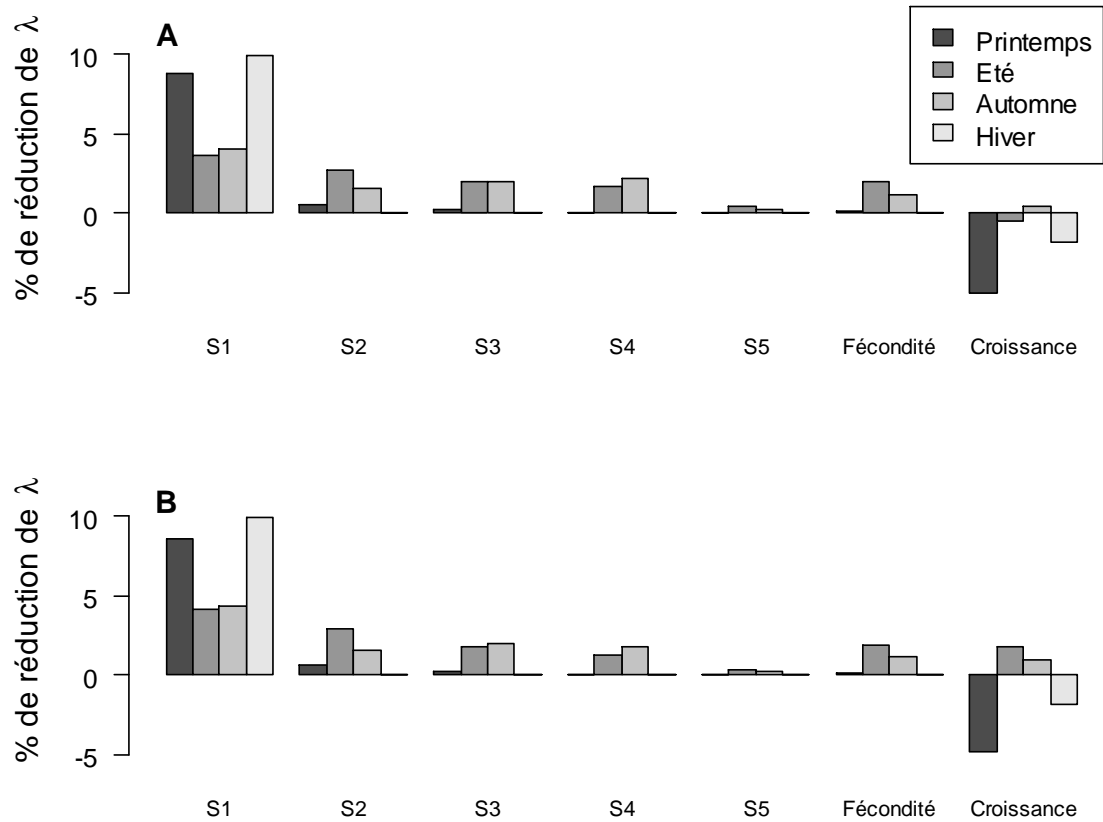
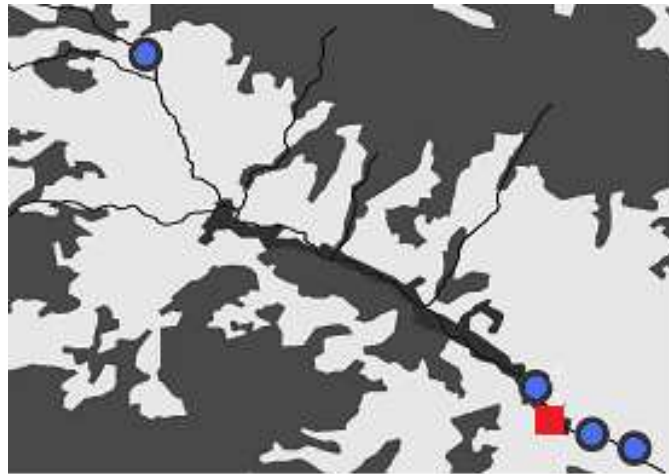


Figure IV-21 : Sensibilité du taux d'accroissement asymptotique mensuel  $\lambda$  de *P. antipodarum* aux paramètres de survie, fécondité et croissance.

(A) Sensibilité du taux d'accroissement asymptotique pour le modèle mod1 et (B) Sensibilité du taux d'accroissement asymptotique pour le modèle mod2.

#### 4 Cas d'étude : extrapolation au niveau populationnel des impacts individuels d'une station d'épuration chez *Gammarus fossarum*

Dans cette partie, nous illustrons comment nous pouvons utiliser les modèles de dynamique de population pour interpréter les effets observés au niveau de marqueurs individuels. Plus particulièrement, nous avons voulu souligner l'importance de la prise en compte de la variabilité saisonnière de la sensibilité des populations lors du diagnostic de la qualité des milieux aquatiques *via* l'extrapolation des effets observés lors de bioessais individuels en terme d'impact sur la dynamique des populations par les modèles de dynamique de population. En effet, nous avons vu précédemment avec les analyses de sensibilité, que pour nos deux populations, la variabilité saisonnière de la sensibilité démographique pouvait être importante. Pour illustrer ce propos, nous nous sommes intéressés à un exemple concret portant sur le diagnostic de l'impact d'une station d'épuration (STEP), située sur le bassin versant de l'Ardières au niveau de la ville de Beaujeu (Rhône), mené dans le cadre d'une étude avec l'agence de l'eau RMC.



**Figure IV-22 : Carte du bassin versant de l'Ardières.**

Les ronds bleus correspondent aux différents sites expérimentaux avec de gauche à droite *Amont 1*, *Amont 2*, *Aval 1* et *Aval 2*; le carré rouge à la station d'épuration de Beaujeu. Les zones en gris très clair correspondent à des zones agricoles, les grises à des zones de forêt et enfin la zone gris foncé à l'agglomération de Beaujeu.

Quatre sites ont été choisis (**Figure IV-22**) : un site situé en amont de la rivière et considéré comme un site de référence (*Amont 1*), un site juste en amont de la STEP qui constitue aussi un site référence vis-à-vis de la STEP mais qui est situé en zone urbaine (*Amont 2*), un site directement en aval de la station (*Aval 1*) et enfin un deuxième site aval plus éloigné (*Aval 2*).

4.1 : Diagnostic de l'impact de la STEP au niveau individuel *via* des encagement *in situ* d'organismes issus de la population de la Bourbre et transplantés sur les différents sites.

Les expérimentations au niveau individuel ont été réalisées en amont de ce travail doctoral par le laboratoire d'écotoxicologie du Cemagref. Différents marqueurs individuels ont alors été mesurés lors d'une campagne d'encagement d'organismes provenant de la population de la Bourbre et transplantés sur les différents sites : la survie de juvéniles, la survie d'adultes et la fécondité de femelles. Les organismes ont été exposés durant 21 jours entre le 10 et le 30 juin 2008. Pour estimer la survie des juvéniles, quatre réplicats de 12 individus de 3,1 (0,4) mm ont été utilisés. Pour la survie et la fécondité des femelles, les organismes ont été exposés selon le protocole du test de reprotoxicité défini dans le **Chapitre II** avec trois réplicats de sept couples. Nous allons brièvement présenter les résultats de ces trois bioessais individuels pour ensuite pouvoir les intégrer dans le modèle de dynamique de population que nous avons construit chez *G. fossarum*.

#### 4.1.1 Survie juvénile

Après 21 jours d'exposition, les taux de survie des juvéniles varient entre 12,5 et 35,4 %. Nous n'observons pas de différences significatives entre les deux sites amont (test des proportions,  $p > 0,05$ ). Par contre, nous observons une diminution significative dans les deux sites en aval de la STEP en comparaison du site *Amont 1* avec des taux de 12,5 % dans le site *Aval 1* et 22,9 % dans le site *Aval 2* (test des proportions,  $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2 Survie adulte

Après 21 jours d'exposition, les taux de survie des adultes femelles varient entre 45,2 et 90,4 %. Nous n'observons pas de différences significatives entre les deux sites amont avec des taux de survie élevés de 90,4 % sur le site *Amont 1* et 88,1% sur le site *Amont 2* (test des proportions,  $p > 0,05$ ). Par contre, nous observons une diminution significative dans les deux sites en aval de la STEP en comparaison du site *Amont 1* avec des taux de 54,7 % dans le site *Aval 1* et 45,2 % dans le site *Aval 2* (test des proportions,  $p < 0,05$ ).

## 4.1.3 Fécondité

Au moment de la réalisation de ces expérimentations, l'influence des facteurs de confusion sur le cycle de reproduction n'avait pas encore été caractérisée et les protocoles des différents tests n'étaient pas encore adaptés pour des expositions sur le terrain. Ainsi, les tests ont été réalisés avec des expositions *in situ* de 21 jours des individus dans chacun des sites quelle que soit la température de l'eau comme cela est fait classiquement pour les tests au laboratoire avec *G. fossarum*. De ce fait, à la fin de la période d'exposition et en fonction des sites, les femelles ont été retrouvées dans des degrés d'avancement légèrement différents, que ce soit en ce qui concerne leur stade de mue ou de développement embryonnaire. Cependant, la température était très proche dans les quatre sites (comprise entre 13,9 et 14,4 °C) et la grande majorité des femelles présentait à la fin de l'expérimentation des stades de mue compris entre les stade C2 et D1 avec des embryons dans les stades de développement 2, 3 et 4. Nous avons vu dans le **Chapitre III** que pour ces stades, le nombre d'embryons était constant et il nous a donc semblé malgré tout pertinent d'utiliser les effets observés durant ces tests pour les extrapoler au niveau populationnel *via* notre modèle.

Afin de prendre en compte l'influence de la taille des femelles, nous avons utilisé la normalisation du nombre d'embryons proposée par Geffard et al. (2010) (**Eq IV-15**) :

$$fecnorm = fec / (taille - taillemat) \quad \text{Eq IV-15}$$

où *fecnorm* correspond à la fécondité normalisée par la taille, *fec* au nombre d'embryons de la femelle, *taille* à la taille de la femelle en mm et *taillemat* à la taille à la maturité sexuelle en mm.

Nous observons en moyenne une fécondité normalisée de 1,7 (0,4) embryons dans le site *Amont 1* ; 1,8 (0,3) embryons dans le site *Amont 2* ; 1,1 (0,9) embryons dans le site *Aval 1* et 1,3 (0,9) embryons dans le site *Aval 2*. Il n'y a ainsi pas de différences significatives entre les deux sites en amont de la station d'épuration (test de Wilcoxon,  $p > 0,05$ ) alors que nous observons une diminution significative dans les deux sites avals en comparaison du site *Amont 1* (test de Wilcoxon,  $p < 0,05$  dans les deux cas).

#### 4.1.4 Bilan

Au final, dans les sites *Aval 1* et *Aval 2*, nous observons respectivement une diminution de 39,5 % et de 50 % de la survie des adultes, de 64,5 % et de 35,3 % de la survie juvénile et de 33,3 % et 28,1 % de la fécondité des femelles dans les deux sites.

#### 4.2 : Extrapolation des effets au niveau populationnel

Nous avons étudié l'impact de la STEP au niveau populationnel en nous intéressant à la réduction du taux d'accroissement asymptotique de la population dans les sites *Aval 1* et *Aval 2*. Pour cela, nous avons intégré les effets observés dans ces deux sites sur les taux de survie des juvéniles et des femelles et sur la fécondité des femelles en comparaison du site *Amont 1* dans les matrices de Leslie mensuelles.

Les différentes analyses présentées dans la suite de ce chapitre ont été réalisées pour les trois versions du modèle de dynamique de population développé chez *G. fossarum* (**mod1**, **mod2** et **mod3**). Les réponses étant dans les trois cas très proches, nous avons décidé de ne présenter que les résultats avec le modèle **mod3**, c'est-à-dire celui où les taux de survie sont plafonnés à 1.

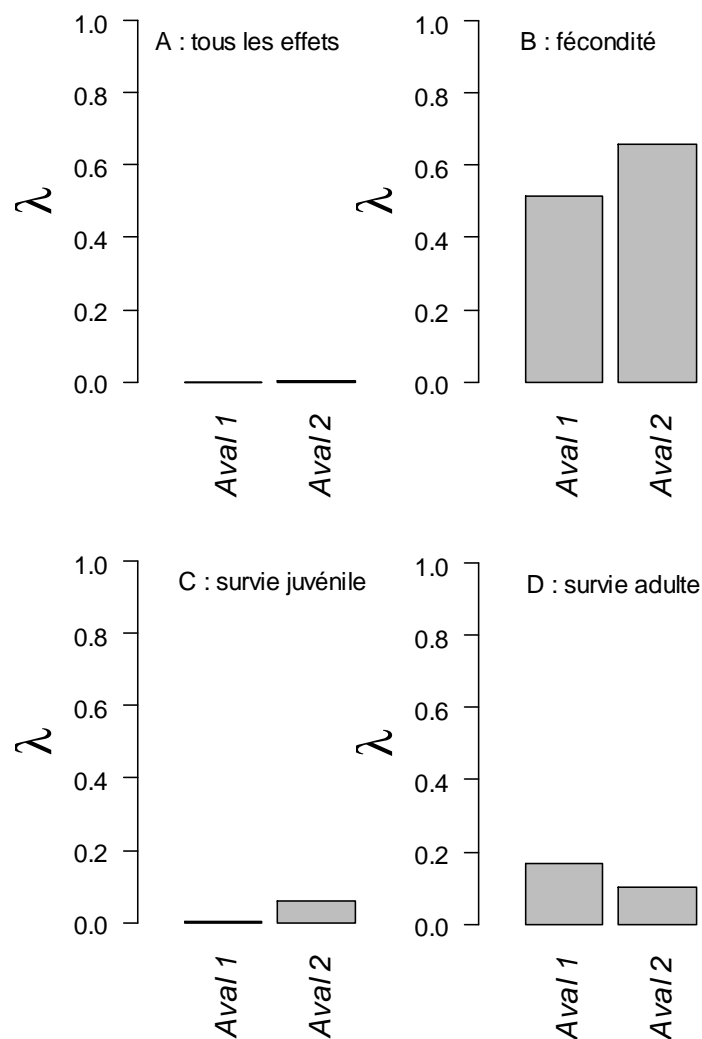
##### 4.2.1 Impact de la station d'épuration sur le taux de croissance asymptotique de la population $\lambda$

La **Figure IV-23** rend compte de la réduction du taux d'accroissement asymptotique de la population  $\lambda$  observée dans les sites *Aval 1* et *Aval 2* pour différents scénarii. Notons ici que sur les différentes figures relatives aux modifications du  $\lambda$ , nous faisons figurer non pas la valeur absolue de  $\lambda$  mais la valeur normalisée par rapport au site référence. En effet, ce ne sont pas tant les valeurs absolues qui nous intéressent mais les variations causées par l'impact d'une contamination et plus précisément dans ce cas d'étude la STEP.

Dans le premier scénario (**Figure IV-23 A**), nous avons appliqué sur chacune des 12 matrices mensuelles les effets observés sur les survies adultes et juvéniles ainsi que sur la reproduction. Ainsi, nous avons appliqué les effets observés sur la survie juvénile sur les taux de survie des classes **J1** et **J2** et ceux observés sur la survie adulte et sur la fécondité sur les classes



**A1, A2 et A3.** Nous observons dans ce cas de figure un impact très fort au niveau populationnel avec un taux d'accroissement diminué dans les deux sites de 99 %, le modèle prédisant ainsi une extinction rapide de la population dans chacun des sites. Il n'est pas surprenant que nous observions des conséquences aussi importantes puisque dans ce cas de figure, nous appliquons des effets individuels qui sont relativement forts de manière répétée lors de chacun des mois de l'année. Cette extinction de la population est cohérente avec les observations faites sur le terrain puisque nous ne retrouvons aucun gammare dans les deux sites en aval de la STEP alors qu'une population naturelle est présente dans les sites amont.



**Figure IV-23 : Impact sur le taux d'accroissement asymptotique de la population de *G. fossarum* (valeur normalisée par rapport au site *Amont 1*) des effets individuels observés en aval de la station d'épuration.**

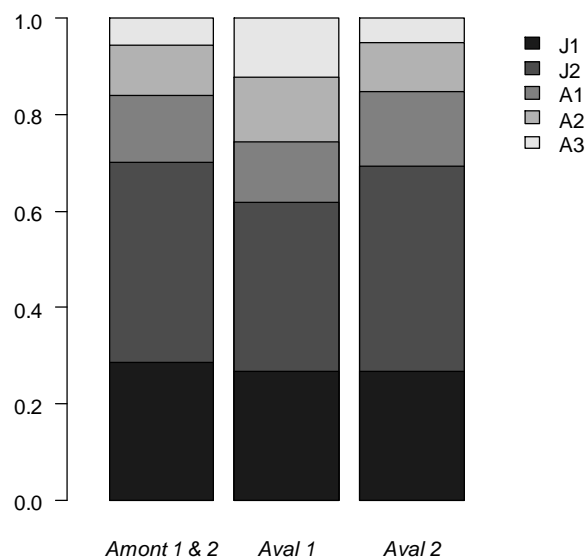
Les effets sont dans ce cas appliqués sur chacune des matrices mensuelles respectivement sur : (A) simultanément la fécondité, la survie juvénile et la survie adulte ; (B) uniquement la fécondité ; (C) uniquement la survie juvénile et (D) uniquement la survie des adultes.

Dans les trois autres scénarios, nous avons voulu dissocier les impacts liés aux différents effets individuels. Ainsi, nous avons dans un premier temps appliqué uniquement les effets sur la reproduction. Nous observons alors une diminution de 50 % du taux d'accroissement asymptotique de la population dans le site *Aval 1* et de 35 % dans le site *Aval 2* (**Figure IV-23 B**). Dans un deuxième temps, nous avons regardé l'impact des effets sur la survie juvénile (**Figure IV-23 C**). Dans ce cas, l'impact sur le  $\lambda$  est beaucoup plus fort avec une réduction de 98 % dans le site *Aval 1* et de 95 % dans le site *Aval 2*. Enfin dans un troisième temps, nous nous sommes intéressés aux conséquences des effets sur la survie des adultes (**Figure IV-23 D**). Nous observons une réduction du  $\lambda$  de 83 % dans le site *Aval 1* et de 90 % dans le site *Aval 2*.

Nous constatons donc une forte variabilité de la contribution des différents effets sur la dynamique de la population. Ainsi, la population de gammares se révèle particulièrement impactée par les effets sur la survie des jeunes et dans une moindre mesure par ceux sur la survie des adultes alors que les effets sur la reproduction sont beaucoup moins forts. Cette forte sensibilité de la population à une réduction de la survie des jeunes et de la reproduction est cohérente avec les analyses de sensibilité que nous avons présentées dans le paragraphe 2.6.1. En effet, nous avons montré, en faisant varier de 10 % les différents traits de vie à l'entrée du modèle, que la survie des jeunes était de loin le paramètre le plus influent pour la population (**Figure IV-10**).

#### 4.2.2 Impact de la station d'épuration sur la structure en taille stable

Nous nous sommes également intéressés à l'impact de la station d'épuration sur la structure en taille stable de la population (**Figure IV-24**). Nous observons sur le site *Aval 1* un vieillissement de la population avec une augmentation de la proportion d'individus des classes **A1**, **A2** et **A3**. En effet, ils représentent environ 40 % de la population contre moins de 30 % en temps normal. Ceci s'explique par l'importante mortalité observée chez les juvéniles (65 % de mortalité supplémentaire par rapport au site *Amont 1*). A *contrario*, dans le site *Aval 2*, nous voyons que, bien qu'il y ait un impact important sur le taux d'accroissement de la population, la structure en taille stable est très peu modifiée par l'impact de la station d'épuration. Les effets sur la survie des jeunes sont moins importants alors que ceux sur la survie des adultes sont au contraire légèrement plus forts par rapport au site *Aval 1*. Ainsi, dans ce cas de figure, l'ensemble des classes de taille est impacté de manière plus homogène ce qui explique que nous n'observons pas de modification de la structure de la population.

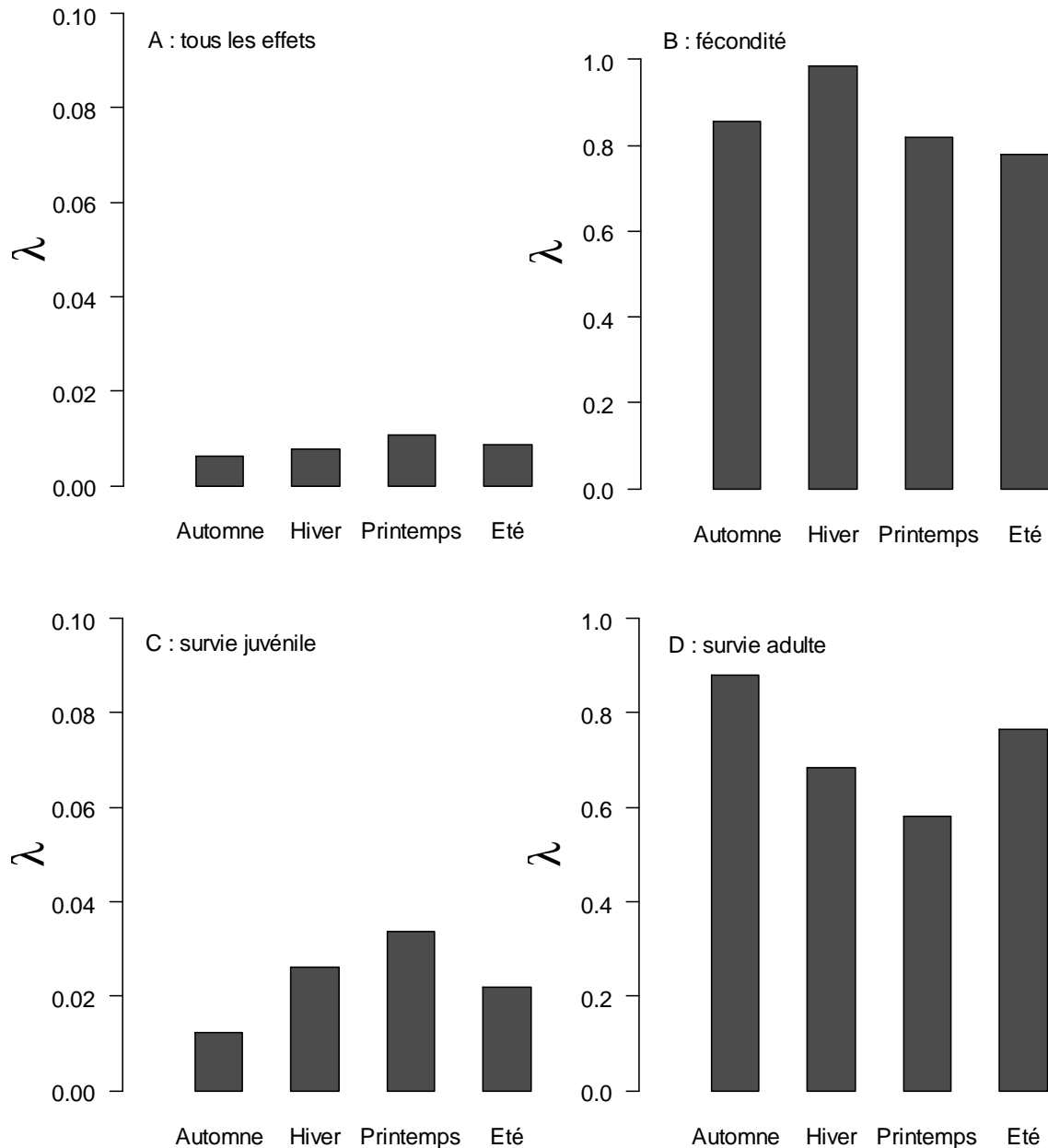


**Figure IV-24 : Structure en taille stable de la population de *G. fossarum* dans les différents sites en amont et en aval de la STEP**

#### 4.2.3 Variabilité saisonnière de l'impact populationnel

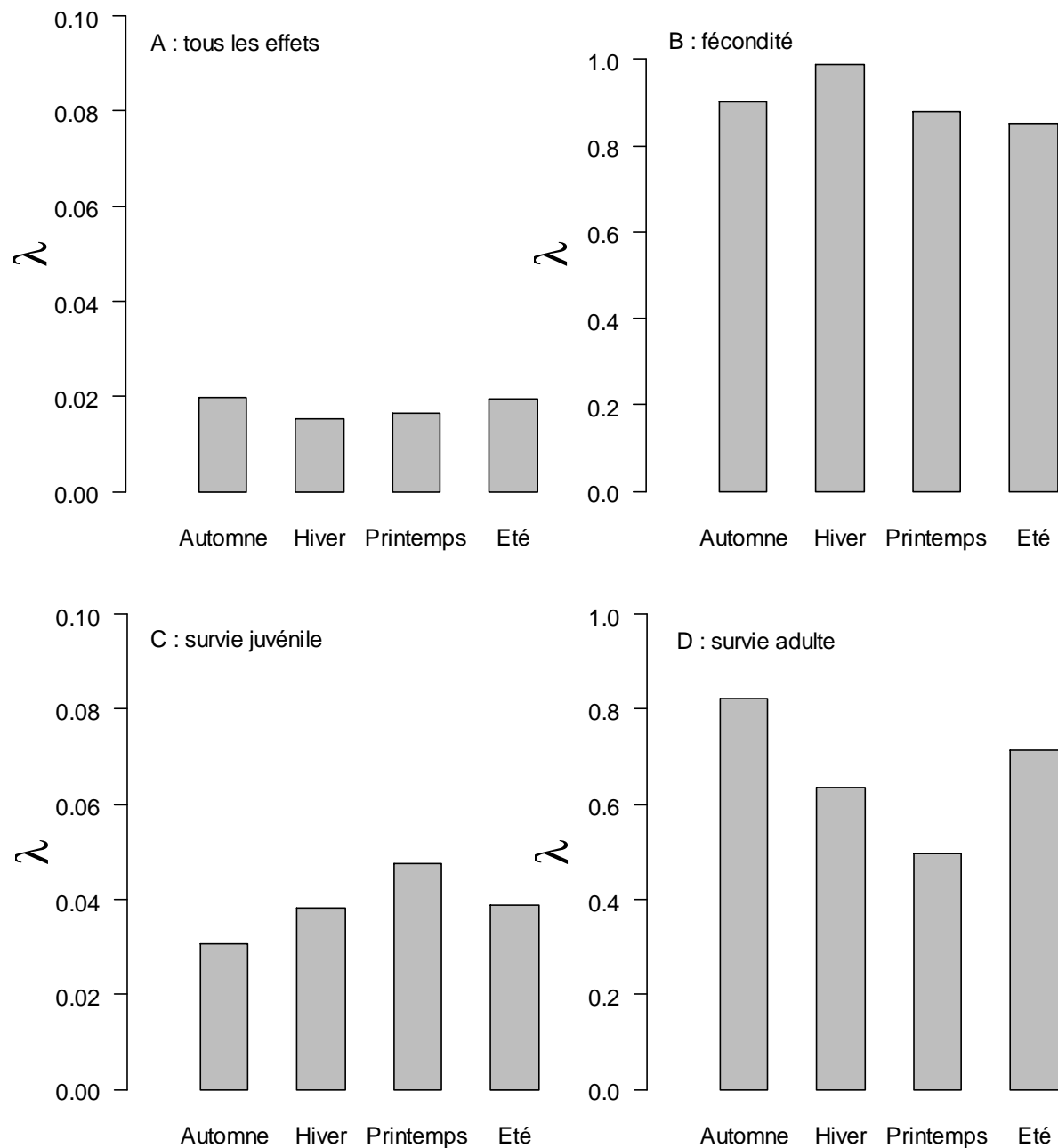
Nous nous sommes intéressés aux variations saisonnières des conséquences populationnelles des effets individuels observés durant ce cas d'étude. Pour cela, contrairement à la démarche que nous avons adoptée pour l'impact annuel en appliquant les effets sur chacune des 12 matrices mensuelles du modèle, nous les avons dans ce cas appliqués seulement aux trois mois relatifs à chaque saison (*e.g.*, septembre – octobre - novembre pour l'automne, décembre – janvier – février pour l'hiver, mars – avril – mai pour le printemps et juin – juillet – août pour l'été). Pour chacune des saisons, nous observons une réduction importante du taux d'accroissement annuel de la population (**Figure IV-25 A** et **Figure IV-26 A**).

L'impact est plus fort sur le site *Aval 1* avec une diminution du  $\lambda$  variant de 85 % au printemps à 92 % durant l'automne que pour le site *Aval 2* où la réduction de  $\lambda$  varie entre 73 à 79 %. Ces variations, relativement peu importantes, sont de prime abord assez surprenantes au regard des résultats de l'analyse de sensibilité réalisée précédemment qui montrait de fortes variations saisonnières de la sensibilité de la population (**Figure IV-11**). Pour comprendre ces résultats, nous nous sommes intéressés, de la même manière que pour l'impact annuel, à la contribution des différents effets pris indépendamment les uns des autres (**Figure IV-25 B-C-D** et **Figure IV-26 B-C-D**).



**Figure IV-25 : Impact sur le taux d'accroissement asymptotique annuel de la population de *G. fossarum* (valeur normalisée par rapport au site *Amont 1*) des effets individuels observés dans le site *Aval 1*.**

Les effets sont dans ce cas appliqués sur les 3 matrices mensuelles correspondant à chaque saison (septembre – octobre - novembre pour l'automne, décembre – janvier – février pour l'hiver, mars – avril – mai pour le printemps et juin – juillet – août pour l'été) respectivement sur : (A) simultanément la fécondité, la survie juvénile et la survie adulte ; (B) uniquement la fécondité ; (C) uniquement la survie juvénile et (D) uniquement la survie des adultes.



**Figure IV-26 : Impact sur le taux d'accroissement asymptotique annuel de la population de *G. fossarum* (valeur normalisée par rapport au site *Amont 1*) des effets individuels observés dans le site *Aval 2*.**

Les effets sont dans ce cas appliqués sur les 3 matrices mensuelles correspondant à chaque saison (septembre – octobre - novembre pour l'automne, décembre – janvier – février pour l'hiver, mars – avril – mai pour le printemps et juin – juillet – août pour l'été) respectivement sur : (A) simultanément la fécondité, la survie juvénile et la survie adulte ; (B) uniquement la fécondité ; (C) uniquement la survie juvénile et (D) uniquement la survie des adultes.

Nous observons alors des variations saisonnières beaucoup plus marquées de l'impact populationnel. Ainsi, lorsque nous appliquons les effets uniquement sur la fécondité, l'impact sur la dynamique de population (en terme de diminution du  $\lambda$ ) varie de 2 à 23 % pour le site *Aval 1* et de 1 à 15 % pour le site *Aval 2* entre les différentes saisons. Lorsque nous appliquons les effets uniquement sur la survie des juvéniles, le taux d'accroissement diminue alors de 53 à 83 % dans le site *Aval 1* et de 44 à 57 % dans le site *Aval 2* selon les saisons. Enfin, concernant les effets sur la survie des adultes, les effets varient de 13 à 42 % dans le site *Aval 1* et de 17 à 51 % dans le site *Aval 2*.

Cette forte variabilité saisonnière de l'impact sur la dynamique de la population observée lorsque les différents effets individuels sont appliqués un à un dans le modèle ne transparait pas lorsqu'ils sont appliqués en même temps car il y a une compensation de l'impact populationnel des différents effets. En effet, l'analyse de sensibilité réalisée sur les matrices saisonnières nous avait indiqué que la population était particulièrement sensible à la réduction de la reproduction au printemps et en été, à la survie des juvéniles au printemps, en été et en automne et enfin à la survie des adultes en hiver. Ainsi, lorsque tous les effets sont appliqués en même temps, nous obtenons un impact fort dans tous les cas puisque : 1- au printemps, le taux d'accroissement de la population est impacté par les effets sur la fécondité et la survie des juvéniles principalement ; 2- en été ce sont les effets sur la fécondité qui sont très problématiques étant donné qu'à cette période, les femelles sont en pleine période de reproduction avec des cycles très rapprochés ; 3- en automne la survie des juvéniles produits durant l'été est le trait le plus sensible ; 4- et enfin en hiver la survie des adultes devient un trait particulièrement sensible étant donné que ce sont eux qui permettront à la population de redémarrer à la fin du printemps et qu'il est essentiel pour le maintien de la population de conserver un stock suffisant d'adultes. A l'opposé, la diminution de la fécondité est responsable en hiver d'un impact très réduit sur la dynamique de la population étant donné que les femelles se reproduisent très peu en raison de la durée des cycles de reproduction qui devient importante (*e.g.*, plus de deux mois à 7°C). Ces résultats soulignent l'importance des analyses de sensibilité pour interpréter les impacts au niveau des populations des effets observés au niveau individuel et en particulier en ce qui concerne les variations saisonnières de ces impacts.

## 5 Discussion

Comme nous l'avons souligné précédemment, les réglementations telles que la DCE ou le programme REACH imposent une évaluation des effets des contaminants au niveau des populations. Dans les démarches prédictives, les approches multi-échelles basées sur l'extrapolation au niveau populationnel des effets observés lors de bioessais réalisés au laboratoire sur des marqueurs individuels à l'aide des modèles de dynamiques de populations représentent une solution de plus en plus couramment utilisée et qui commence à être acceptée dans le cadre réglementaire (*e.g.*, réglementations sur l'utilisation des pesticides : (Forbes et al. 2009 ; Grimm et al. 2009 ; Thorbek et al. 2009 ; Schmolke et al. 2010). Cependant, la transposition de ce type d'approches dans le cadre du diagnostic de l'état écologique des milieux aquatiques reste pour le moment très rare en raison de deux limites principales : 1- la forte variabilité des marqueurs individuels en lien avec l'influence de divers facteurs environnementaux et 2- le manque de pertinence environnementale des modèles utilisés. Dans le **Chapitre III**, nous avons proposé une méthodologie pour répondre à cette première limite et tenir compte de l'influence d'un des principal facteur de confusion dans les milieux aquatiques : la température. Dans ce chapitre, notre objectif était de tester la pertinence de prendre en compte le rôle des histoires de vie et particulièrement des variations saisonnières de la dynamique des populations *via* le développement des modèles adaptés pour extrapoler les effets individuels mesurés *in situ* en terme d'impact sur la dynamique des populations.

### 5.1 Modélisation de la dynamique des populations

Pour modéliser la dynamique de population de nos deux populations, nous avons utilisé des modèles matriciels de Leslie en classes de taille selon la méthodologie proposée en écotoxicologie notamment par Caswell dans les années 1990 (Caswell 1996 ; Caswell 2001) et largement utilisée depuis en écotoxicologie (*c.f.* revue dans le **Chapitre I**). Nous avons opté pour ce type de modèles analytiques, et non pas pour des modèles procédant par simulations numériques (*e.g.*, modèles individu-centrés), qui sont également souvent utilisés en écotoxicologie, car les modèles matriciels permettent facilement de faire le lien entre les paramètres d'entrée et de sortie du modèle *via* des analyses de sensibilité, et de mettre ainsi à jour les différents mécanismes qui entrent en jeu dans la réponse populationnelle globale.

Nous avons pu paramétrer nos différents modèles grâce à un important travail expérimental qui nous a permis d'acquérir données biologiques à partir d'une double approche combinant des expérimentations au laboratoire (*e.g.*, caractérisation de l'influence de la température sur les traits de vie) et sur le terrain (*e.g.*, suivis démographiques mensuels, engagements *in situ*). Nous avons pour cela pu tirer avantage des méthodologies développées dans le cadre de la mise en œuvre de biotests par encagement (*cf.* **Chapitre III**). Nous avons alors pu décrire le fonctionnement et la dynamique de deux populations naturelles chez deux espèces présentant des histoires de vie contrastées : une population du crustacé amphipode *Gammarus fossarum* et une population du mollusque gastéropode *Potamopyrgus antipodarum*. Dans les deux cas, nous observons que nos modèles ont pu être calibrés pour rendre compte de façon pertinente du fonctionnement des populations, notamment au regard de l'évolution des structures en âge stable au cours des différents mois de l'année. De plus, nous voyons que les différentes versions des modèles, liées à l'incertitude sur l'évaluation des survies pour chacune des populations, conduisent à des caractéristiques populationnelles et des sensibilités démographiques très proches. Ceci nous permet d'envisager d'utiliser les sorties de ces modèles comme des indicateurs relativement robustes du fonctionnement des populations. Ces résultats nous confortent dans le fait que nous avons bien réussi à capter les mécanismes clés au sein de nos deux populations et que l'incertitude que nous observons lors de l'estimation des taux de survie ne remet pas en cause la pertinence et le réalisme des modèles que nous avons paramétré. En effet, il apparaît que les réponses populationnelles sont beaucoup plus conditionnées par la forme du graphe du cycle de vie (*e.g.*, nombre d'occasions de reproduction, taux de passage entre les classes) que par une légère incertitude lors de l'estimation des paramètres à l'entrée du modèle ; ceci mettant en avant le fait qu'une bonne connaissance de la biologie et de l'écologie des espèces est indispensable pour appréhender de façon pertinente le fonctionnement des populations.

Pour chacune des deux espèces étudiées, les grandes caractéristiques biologiques ne changent généralement qu'à une large échelle géographique ou entre espèces. Par exemple, chez le gammare, le même type d'approche (*e.g.*, suivi démographique mensuel, étude de la variabilité saisonnière des traits de vie) a été réalisé pour une seconde population (résultats non présentés dans ce manuscrit). Nous avons alors pu constater que malgré des différences sur certains paramètres (*e.g.*, taille à la maturité sexuelle), le fonctionnement des deux populations était très similaire. Par ailleurs, il paraît important de souligner qu'étant donné de la forte similitude des cycles de vie au sein des espèces du groupe des *Gammaridae* (*e.g.*, *G. pulex*, *G. wautieri*), ces modèles présentent une assez grande généralité puisqu'ils peuvent rapidement être transférés d'une



population à une autre voir même d'une espèce de gammare à une autre, et par conséquent leur utilisation peut être envisagée à large échelle (*i.e.*, nationale, voire internationale).

## 5.2 Importance des différences d'histoire de vie dans la sensibilité des populations

Nous nous sommes intéressés à ces deux espèces notamment dans le but de souligner le rôle des histoires de vie dans la sensibilité des populations aux contaminants. En effet, dans les écosystèmes aquatiques, une grande diversité d'espèces cohabite, en particulier dans les sites présentant un bon état écologique (*e.g.*, annélides, insectes, crustacés, mollusques, poissons, amphibiens, *etc.*). Les individus composant ces espèces peuvent présenter une grande variabilité dans leurs histoires de vie (*e.g.*, stratégie de reproduction, capacités de dispersion, taux de survie).

Plusieurs travaux, en particulier dans le cadre d'études prédictives de l'impact d'un contaminant, commencent ainsi, depuis le début des années 2000, à souligner le rôle important des histoires de vie dans la sensibilité des populations lors de l'exposition à un facteur de stress toxique (Møller et al. 1996 ; Forbes et al. 2001 ; Forbes and Calow 2002 ; Salice and Miller 2003 ; Stark et al. 2004 ; Spromberg and Birge 2005a ; Forbes et al. 2006 ; Stark et al. 2007). Stark et al. (2004) observent ainsi une forte variabilité des conséquences populationnelles d'une réduction de 50 % de la survie et/ou de la reproduction chez différentes espèces présentant des histoires de vie contrastées (temps de génération, mode de reproduction, âge à la maturité sexuelle, *etc.*). Dans ce contexte, il devient alors très complexe de définir une concentration limite d'un contaminant qui induise un effet à un seuil acceptable pour l'ensemble des espèces sans prendre en compte l'influence de l'histoire de vie sur la traduction populationnelle des effets toxicologiques. Dans les approches de diagnostic de la qualité des milieux aquatiques, la prise en compte de la variabilité des histoires de vie représente également un enjeu important. Ainsi, lors de l'évaluation de la qualité écologique d'un site ou d'un bassin versant, si nous voulons comprendre les effets observés sur les communautés, lors d'études de bioindication dans un but de restauration par exemple, il est nécessaire de trouver des liens de causalité (quelle pression, quel contaminant ?) et il devient alors indispensable de prendre en compte les différences de sensibilité démographiques des différentes espèces.

Dans notre travail, l'utilisation de deux espèces présentant des caractéristiques écologiques et phylogénétiques contrastées nous a permis d'évaluer l'importance de la variabilité des histoires de vie dans la sensibilité démographique des populations. En effet, nous observons des différences importantes dans les histoires de vie de nos deux espèces (*e.g.*, survies, croissance,

mode de reproduction, fécondité, taille à la maturité sexuelle, sex-ratio). Par exemple, concernant la reproduction, il est intéressant de noter que, chez la population de gammare, les taux de reproduction sont assez faibles mais les femelles vont pouvoir se reproduire tout au long de l'année alors que chez *P. antipodarum*, nous observons une fenêtre de reproduction beaucoup plus courte comprise entre la fin du printemps et le début de l'automne (soit environ six mois par an) avec des taux de reproduction beaucoup plus élevés. Nous avons également vu que pour ces deux populations, les stratégies permettant la persistance de la population durant les périodes défavorables (*e.g.*, du début de l'hiver au milieu du printemps) sont très différentes. Ainsi, chez *G. fossarum*, la population traverse cette période froide grâce à une majorité d'adultes qui pourront repeupler la population lorsque les conditions redeviennent favorables alors que chez *P. antipodarum*, lors de cette même période, les taux de survie des adultes sont très faibles et la population est principalement composée de juvéniles qui croissent rapidement puis se reproduisent au début de l'été.

Les analyses de sensibilités réalisées sur chacun des modèles de dynamique de population de ces deux espèces (**Figure IV-10** et **Figure IV-20**) nous ont permis de montrer que ces différences d'histoire de vie se traduisaient par une forte variabilité de la sensibilité du taux d'accroissement asymptotique de la population  $\lambda$  face aux variations des différents traits de vie à l'entrée des modèles. Ainsi, bien que pour les deux espèces la survie des juvéniles apparaisse comme le trait le plus critique pour la population, le  $\lambda$  est beaucoup plus sensible à la réduction de ce paramètre chez *P. antipodarum* que chez *G. fossarum*. En effet, une diminution de la survie des juvéniles de 10% conduit à une diminution de  $\lambda$  de 60 % chez *P. antipodarum* contre seulement 30 % chez *G. fossarum* (**Figure IV-10** et **Figure IV-20**). Cette forte sensibilité de nos deux populations à la survie des jeunes est cohérente avec les conclusions d'une étude de Forbes et al. (2001) qui souligne que chez les espèces d'invertébrés aquatiques, la survie juvénile est, pour la grande majorité des espèces, le trait auquel les populations sont les plus sensibles. Nous observons également des différences importantes de la sensibilité de nos deux espèces aux variations du taux de croissance individuel. En effet, chez le gammare, la population est très peu sensible alors que chez *P. antipodarum*, nous observons un résultat surprenant avec une augmentation du taux de croissance asymptotique de la population  $\lambda$  lors de la réduction des taux de croissance individuels.

Notre travail souligne donc bien l'importance des histoires de vie dans la sensibilité démographique des populations. L'étude d'autres populations de vertébrés ou invertébrés présentant des histoires de vie différentes (*e.g.*, insectes, poissons, amphibiens) permettrait d'en apprendre davantage concernant l'importance de la variabilité des cycles de vie pour évaluer la

qualité des milieux aquatiques. Dans ces travaux de thèse, les deux espèces appréhendées (*i.e.*, *Gammarus fossarum*, *Potamopyrgus antipodarum*) sont itéropares, c'est-à-dire qu'elles se reproduisent plusieurs fois au cours de leur vie. Etant donné qu'elles se reproduisent même durant une grande partie de l'année, ceci pourrait expliquer pourquoi ces populations ne sont pas très sensibles aux réductions de la fécondité, d'autant plus que les réductions de 10 % que nous avons appliquées pour nos analyses de sensibilité ne sont pas très importantes. Dans ce contexte, il pourrait être particulièrement pertinent d'étudier une population dans laquelle les individus sont sémelpares, c'est-à-dire qu'ils ne se reproduisent qu'une fois durant leur vie, ou du moins d'une espèce dont les individus ont une période de reproduction très courte pendant l'année. Une telle approche pourrait probablement souligner une sensibilité beaucoup plus importante de ce type de population aux paramètres de survie adulte et surtout de fécondité. Ce type de profil est fréquemment rencontré chez les poissons qui présentent généralement des plages de reproduction assez courtes (Miller et al. 2007 ; Beaudouin et al. 2008 ; Hanson 2009a). Par exemple, Hanson (2009a) souligne, chez la perche *Perca fluviatilis*, qui ne se reproduit que durant une courte période de l'année, une sensibilité importante de la population à la réduction de la fécondité des femelles. Par ailleurs, dans une étude sur l'impact du methiocarb (*i.e.*, insecticide) sur une population d'insecte (*i.e.*, l'insecte *Chironomus riparius*), un invertébré sémelpare qui présente une reproduction unique des individus au cours de leur vie (Lopes et al. 2005), les auteurs observent également une sensibilité importante de la population aux paramètres de survie adulte et de fécondité.

### 5.3 Importance de la variabilité saisonnière de la sensibilité des populations

Dans ce chapitre, nous avons également voulu souligner l'importance de la variabilité saisonnière de la sensibilité démographique des populations. Il est en effet important de tenir compte du fait que le degré de contamination d'une rivière est rarement constant au cours de l'année. L'exemple le plus évident de cette variabilité de la contamination concerne les pics de pollution saisonniers liés à l'utilisation des divers pesticides dans les zones agricoles. Mais cette variabilité saisonnière ne se limite pas uniquement au cas des contaminations ponctuelles, les contaminations chroniques (*e.g.*, rejets de station d'épuration, contaminations métalliques) sont potentiellement beaucoup plus concentrées en période d'étiage lorsque les débits sont faibles et les niveaux d'eau bas que durant les

périodes de hautes eaux, en particulier dans les petits hydrosystèmes, ce qui est également à l'origine d'une forte variabilité de la contamination au cours de l'année.

Face à cette variabilité temporelle de la contamination, bien que peu étudiée jusqu'à présent, la compréhension de la variabilité saisonnière de la sensibilité des populations constitue également un enjeu important pour les évaluations écotoxicologiques (Ares 2003 ; Landis 2006 ; Smit et al. 2006 ; Banks et al. 2008 ; Meng et al. 2009). Un même impact sur un marqueur individuel peut ainsi ne pas avoir les mêmes conséquences populationnelles selon la période de l'année à laquelle il intervient. Par exemple, pour les populations de gammares, l'exposition à un facteur de stress ayant des effets reprotoxiques aura beaucoup moins de conséquences sur la dynamique de la population lorsqu'elle intervient en fin d'été, période où les individus sont produits juste avant l'hiver et auront donc une faible contribution à la dynamique future de la population que lorsqu'ils sont observés au printemps, période à laquelle la population est en pleine phase de recolonisation après la période hivernale.

La construction de modèles de dynamique de population intégrant la variabilité saisonnière de la dynamique de population et permettant donc d'extrapoler des effets individuels mesurés à différentes périodes de l'année se révèle alors particulièrement pertinente pour estimer la variabilité saisonnière de l'impact populationnel. Nous avons utilisé ce type d'approche dans ce travail en paramétrant 12 modèles mensuels pour définir notre modèle annuel. Nous avons ainsi pu étudier la variabilité de la sensibilité démographique des populations lors des différentes périodes de l'année. Nous observons pour nos deux espèces des dynamiques de populations très contrastées entre les saisons (**Figure IV-9 ; Figure IV-19**) qui se traduisent par des différences de saisonnières de la sensibilité démographique des populations (**Figure IV-11 ; Figure IV-21**). Nous avons pu illustrer comment ces modèles pouvaient être utilisés pour le diagnostic de la qualité des milieux aquatiques avec l'étude de l'impact d'une STEP sur la dynamique de la population de *G. fossarum* (**Figure IV-25 ; Figure IV-26**). En appliquant les effets observés sur différentes périodes de l'année, nous observons une variabilité saisonnière importante de l'impact populationnel. Ainsi, la dynamique de population se révèle particulièrement sensible à une réduction de la survie des juvéniles en automne, de la survie des adultes au printemps et en hiver et de la fécondité au printemps et en été. Là encore, la projection de ces effets sur la dynamique d'une population présentant une période de reproduction limitée à une courte période de l'année aurait probablement permis de montrer des différences saisonnières de l'impact populationnel beaucoup plus fortes, avec un impact très fort lorsque les effets sont appliqués durant la période de reproduction et plus faibles durant le reste de l'année.

Cette importance de la variabilité saisonnière de la sensibilité des populations, mais aussi des différences d'histoire de vie entre espèces, souligne également l'importance de développer des modèles qui détaillent bien le fonctionnement des populations. En effet, avec des modèles trop simples, composés de seulement deux classes de taille (*e.g.*, une classe de juvéniles et une d'adultes), la variabilité des dynamiques de population, que ce soit entre espèces ou au cours du temps, ne peut être prise en compte de façon pertinente. Ainsi, bien que dans les approches prédictives, lors de l'étude de populations théorique de laboratoire, l'apport de modèles « complexes » par rapport à des modèles simplifiés ne soit pas toujours démontré (Hansen et al. 1999a), dans le cadre du diagnostic de la qualité des milieux aquatiques, il est donc indispensable de proposer des modèles suffisamment détaillés comme nous avons pu le faire dans ce travail, même si cela requiert un important travail expérimental en amont.





**CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**





Les réglementations nationales et internationales (*e.g.*, DCE, REACH) conduisent à multiplier les évaluations du risque écologique lié au rejet des substances chimiques dans les milieux aquatiques avec pour objectif de protéger les populations naturelles. Cependant, ce niveau de protection visé ne peut être utilisé facilement pour établir un lien direct entre une contamination et ses effets. Ainsi, le développement de nouvelles méthodologies représente un enjeu majeur pour la communauté des écotoxicologues. Une approche très prometteuse concerne l'étude de l'effet des contaminations au niveau des organismes sur des espèces sentinelles représentatives des milieux étudiés (Chapman 2007 ; Dagnino et al. 2008 ; Damásio et al. 2008). Elle permet d'étudier les effets des contaminants sur les différentes échelles biologiques et représente, de nos jours, une approche incontournable en écotoxicologie (Lagadic et al. 1997 ; Amiard and Amiard-Triquet 2008). Les approches multi-échelles, basées sur l'étude des effets des contaminations sur des marqueurs individuels puis sur l'extrapolation de ces effets au niveau des populations à partir de modèles de dynamique de population, ont été initialement proposées pour des études prédictives de l'impact des contaminants (*e.g.*, métaux, pesticides) et commencent à être intégrées dans les démarches réglementaires (Forbes et al. 2009). Récemment, plusieurs auteurs ont suggéré que ces approches pourraient également être utilisées pour le diagnostic de la qualité des milieux aquatiques (Baird et al. 2007a ; Liber et al. 2007). Cependant, leur utilisation dans ce contexte reste pour le moment très rare, d'une part en raison de la forte variabilité des réponses des marqueurs individuels *in situ* liée à l'influence de divers facteurs environnementaux confondants pour l'évaluation de la toxicité et d'autre part à cause du manque de pertinence environnementale des modèles actuellement proposés.

Durant ce travail doctoral nous avons tenté d'apporter des éléments de réponses à ces deux grandes limites afin de permettre une utilisation des approches multi-échelles pour le diagnostic de la qualité des milieux aquatiques. Tout d'abord, nous avons proposé, chez le gammare *G. fossarum*, une méthodologie qui permet d'intégrer l'influence des facteurs de confusion lors de la lecture des tests *in situ* et ainsi de proposer une meilleure interprétation des réponses observées sur le terrain lors de la mesure de traits de vie. Puis, nous avons développé chez deux espèces couramment observées dans les hydrosystèmes européens et présentant des caractéristiques écologiques et phylogénétiques contrastées : le crustacé *Gammarus fossarum* et le mollusque *Potamopyrgus antipodarum* une méthodologie permettant l'interprétation au niveau populationnel des effets mesurés lors de ces tests.

## 1 Développement de bioessais *in situ* chez *Gammarus fossarum*

Nous nous sommes intéressés à plusieurs traits de vie chez le crustacé amphipode *Gammarus fossarum* : la mesure du taux d'alimentation, du taux de croissance et des marqueurs de reproduction en lien avec les processus de vitellogenèse et d'embryogenèse (*e.g.*, fertilité, fécondité). Ces trois traits de vie ont déjà été utilisés chez plusieurs espèces d'amphipodes, principalement au laboratoire et sont connus pour être à la fois 1- sensible à la présence de contaminants dans le milieu et 2- fortement influencés par des facteurs de confusion biotiques et abiotiques. Nous avons mis en place une méthodologie innovante basée sur une double approche comprenant des expérimentations au laboratoire et sur le terrain ainsi qu'un travail de modélisation pour améliorer l'interprétation des bioessais, notamment lorsque des études sont réalisées dans le temps et sur une large aire géographique.

Concernant les facteurs biotiques, nous avons vu au laboratoire que la taille (*e.g.*, taux d'alimentation, fécondité, fertilité) et le stade de mue (*e.g.*, fertilité) avaient une influence significative sur les marqueurs individuels mesurés chez *G. fossarum*. Les méthodologies de biomonitoring actif *via* la transplantation d'organismes calibrés lors d'encagements *in situ* (Oikari 2006 ; Baird et al. 2007a ; Liber et al. 2007) se révèlent alors particulièrement pertinentes pour contrôler ces facteurs tout en maintenant les organismes dans des conditions réalistes d'exposition. Nous avons ainsi proposé des protocoles d'encagement pour nos trois marqueurs. Concernant les facteurs abiotiques, nous avons montré que la température de l'eau était le principal facteur de confusion et pouvait être à l'origine d'une variabilité importante de la réponse des marqueurs sur le terrain. Nous avons alors modélisé l'influence de la température sur ces différents marqueurs, ce qui nous a permis de proposer 1- le calcul d'indices (*e.g.*, *FI* pour le taux d'alimentation, *GI* pour le taux de croissance) ou 2- de prédire les durées d'expositions pour obtenir des organismes comparables en fin d'expérience (*e.g.*, pour la mesure de la fertilité et de la fécondité).

A l'issue de ce travail doctoral, notre démarche a été mise en œuvre dans son ensemble pour la mesure du taux d'alimentation (Coulaud et al. 2011) et la méthodologie développée pourrait être recommandée pour des études de biomonitoring à large échelle spatiale et temporelle. En effet, notre travail sur le taux d'alimentation a souligné le fait, qu'une fois l'influence de la température prise en compte, il était possible de définir une gamme de valeurs de référence en absence de pression toxique tenant compte de la variabilité environnementale principalement engendrée par les variations de température. De plus, nous avons observé des

inhibitions significatives du taux d'alimentation dans plusieurs sites potentiellement impactés présentant des profils de contamination variés (*e.g.*, métaux, pesticides, *etc.*), ce qui souligne la bonne sensibilité du taux d'alimentation chez les amphipodes et confirme donc son intérêt pour un diagnostic global de la qualité des milieux aquatiques (Forrow and Maltby 2000 ; Maltby et al. 2002).

La mesure du taux d'alimentation offre également plusieurs perspectives de travail. Tout d'abord, il serait particulièrement intéressant d'intégrer les travaux menés par d'autres auteurs tels que ceux de Xuereb et al. (2009b) sur le lien entre l'activité AChE et le taux d'alimentation ou ceux de Dedourge-Geffard et al. (2009) sur le lien entre l'activité des enzymes digestives et le taux d'alimentation afin d'améliorer la compréhension des mécanismes sous-jacents lors de l'observation d'une inhibition de l'alimentation et donc de proposer ainsi un test plus spécifique. De plus, une des limites actuelles de la mesure du taux d'alimentation réside dans le fait qu'il n'est pas directement lié à la fitness des organismes et qu'il est par conséquent difficile d'intégrer les effets observés sur le taux d'alimentation dans des modèles de dynamique de population. Jusqu'à présent, peu d'études se sont encore intéressées aux liens entre l'inhibition de l'alimentation et les impacts sur les traits de vie (*e.g.*, taux de croissance ou l'activité de reproduction), ce qui représente également une perspective très intéressante. En effet, la formalisation des ces liens entre la mesure du taux d'alimentation et des biomarqueurs et des traits de vie pourrait alors offrir un contexte particulièrement prometteur pour transposer le concept d'*Adverse Outcome Pathways* proposé dans les approches prédictives (Ankley et al. 2010 ; Kramer et al. 2011) (*cf.* paragraphe 3.3 du **Chapitre I**), dans le cadre du diagnostic de la qualité des milieux aquatiques. Ainsi plusieurs schémas pourraient être envisagés à partir des différents marqueurs développés chez *G. fossarum* pour proposer une extrapolation des effets observés au niveau de biomarqueurs sub-individuels jusqu'à des impacts sur la dynamique des populations et le fonctionnement des écosystèmes. Par exemple, les effets observés au niveau de l'activité AChE pourraient ainsi être interprétés en terme d'impact sur le taux d'alimentation, sur la reproduction, la dynamique des populations voire au niveau des écosystèmes *via* la perturbation des processus de décomposition de la matière organique.

Pour l'étude des traits de vie, nous n'avons pour le moment étudié l'impact des facteurs de confusion qu'au laboratoire et nous avons observé un impact fort de la température sur la durée du cycle de reproduction et le taux de croissance individuel. Des encagements *in situ* à large échelle spatiale, dans des sites de référence et des sites potentiellement impactés sont encore à finaliser afin de 1- confirmer le fait que la température représente bien le principal facteur de

confusion sur le terrain, 2- définir des gammes de valeurs de référence sur les différents marqueurs mesurés (*e.g.*, fertilité, fécondité) et 3- de valider la sensibilité de ces marqueurs lors de l'exposition à un facteur de stress toxique. Concernant la durée du cycle de reproduction, nous avons pu constater durant les encagements que nous avons réalisés sur deux sites, que nous observions une bonne concordance entre les prédictions de nos modèles et les observations *in situ*. De plus, dans une étude en cours (Jubeaux et al. in prep), nos modèles nous ont permis de prédire la durée d'exposition des organismes en fonction de la température de l'eau du site. De cette manière, nous obtenons lors des arrêts une grande majorité de femelles au stade de mue souhaité pour la mesure des différents marqueurs (*i.e.*, le stade C2). La température de l'eau semble donc bien être l'un des principaux facteurs de confusion pour la mise en place *in situ* du test de reprotoxicité. Concernant la croissance, la prise en compte de l'influence de la température lors des encagements réalisés sur le site de la Bourbre à différentes saisons explique une grande partie de la variabilité saisonnière. Toutefois, dans une étude préliminaire non présentée dans ce manuscrit, nous avons mesuré les taux de croissance lors d'encagement *in situ* dans plusieurs sites présentant des caractéristiques physico-chimiques contrastées. Après la prise en compte de l'influence de la température, les taux de croissance étaient encore assez variables dans les sites de référence. D'autres facteurs tels que la dureté de l'eau ou la teneur en matière organique sont également susceptibles d'avoir une influence importante sur les taux de croissance qu'il serait intéressant de caractériser.

## 2 Extrapolation au niveau populationnel

Le second objectif de la thèse était de développer des modèles de dynamique de population afin d'extrapoler les effets observés lors de bioessais individuels en terme de conséquences sur la dynamique des populations. Nous nous sommes attachés en particulier à 1- l'importance de la prise en compte des différences d'histoire de vie entre les espèces pour et 2- la variabilité saisonnière de la sensibilité des populations.

Pour cela, nous avons étudié deux populations naturelles : une population du crustacé amphipode *Gammarus fossarum* sur l'Ardières et une population du mollusque gastéropode *Potamopyrgus antipodarum* sur le Rhône. Ces deux populations sont présentes depuis de nombreuses années dans ces sites, elles représentaient donc des populations pertinentes pour comprendre le fonctionnement et la dynamique d'une population pas ou faiblement impactée. Nous avons utilisés des modèles matriciels de Leslie en classes de taille selon la méthodologie proposée, en

écotoxicologie notamment, par Caswell dans les années 1990 (Caswell 1996 ; Caswell 2001) et largement utilisée depuis. La double approche expérimentale que nous avons mise en place pour les deux espèces comprenait 1- un suivi démographique mensuel des populations durant une année (*e.g.*, évolution des densités, des structures en taille) et 2- l'étude de la variations saisonnières des traits de vie (en nous servant notamment des méthodologies d'encagement *in situ* développées pour répondre à notre premier objectif). Cette approche nous a permis de paramétrer des modèles de dynamique de population qui rendent compte de façon pertinente du fonctionnement de nos populations (*e.g.*, cohérence des structures en taille stables avec les observations du suivi démographique). Les analyses de sensibilité de ces modèles nous ont permis de souligner que la variabilité des d'histoires de vie étaient à l'origine de différences importantes de sensibilité entre nos deux populations. En effet, la population de *P. antipodarum* s'est révélée très sensible aux variations de la survie des juvéniles alors que la population de *G. fossarum*, bien qu'également sensibles à la survie des jeunes, présente également une sensibilité importante à la réduction des taux de fécondité). De plus, nous avons également montré une variabilité saisonnière importante de la sensibilité pour nos deux espèces.

L'extrapolation en terme d'impact au niveau populationnel des effets observés sur des marqueurs individuels chez *G. fossarum* en aval d'une STEP nous a permis d'illustrer 1- qu'en appliquant les effets observés sur différentes périodes de l'année, nous observions une variabilité saisonnière importante de l'impact populationnel et 2- comment ces modèles pouvaient être utilisés pour le diagnostic de la qualité des milieux aquatiques à partir d'un cas concret de pollution identifiée. A ce stade de développement, les modèles développés pour nos deux espèces pourraient donc être utilisés pour l'extrapolation des effets observés au niveau individuel lors de campagnes de biomonitoring basées sur la mesure de traits de vie (*e.g.*, croissance, reproduction, survie) et donc constituer des outils prometteurs pour les gestionnaires des milieux aquatiques en fournissant des indicateurs pertinents au niveau populationnel.

Toutefois, les modèles développés au cours de ces travaux ainsi que leurs analyses peuvent être améliorés. Tout d'abord, nous nous sommes concentrés dans ce manuscrit sur les variations du taux d'accroissement asymptotique de la population et de sa structure en taille stable. Comme nous l'avons décrit dans la synthèse bibliographique, l'analyse des modèles matriciels permet de calculer d'autres indicateurs populationnels tels que le temps de génération ou encore les valeurs reproductives. Il est également possible de calculer des indicateurs tels que le temps de récupération de la population suite à l'exposition à un facteur de stress toxique ou le risque d'extinction de la population qui peuvent être plus informatifs de l'impact d'une

contamination sur les populations pour les gestionnaires des milieux aquatiques. De plus, les analyses de sensibilité que nous avons réalisées jusqu'à présent ont été faites par simulation en faisant varier les différents paramètres à l'entrée du modèle (*e.g.*, survie, reproduction, croissance) de 10%. Un des intérêts des modèles matriciels réside dans le fait qu'il est possible de réaliser ces analyses de sensibilité de façon analytique en étudiant la contribution des différents paramètres conformément à la méthodologie proposée par Caswell (1996). Ces analyses de sensibilité permettent alors d'analyser plus finement la sensibilité de la population à la variation des différents traits de vie et il serait pertinent de les réaliser sur nos modèles.

Afin d'avancer dans la compréhension de la sensibilité démographique des populations naturelles, il pourrait être pertinent de nous intéresser à l'importance de la variabilité des histoires de vie entre populations et d'évaluer à quel point cette variabilité peut être à l'origine de différences de sensibilités populationnelles. Ainsi, des encagements *in situ* et des suivis démographiques sur un grand nombre de populations naturelles de gammares sont envisagés afin de caractériser la variabilité inter-populationnelle des histoires de vie et du fonctionnement des populations. De plus, l'étude d'autres populations de vertébrés ou invertébrés présentant des histoires de vie différentes (*e.g.*, insectes, poissons, amphibiens) permettrait d'en apprendre d'avantage sur l'importance de la variabilité inter-spécifique des cycles de vie. Les insectes, tels que les chironomes, pourraient alors présenter un profil intéressant. En effet, ces espèces sont couramment observées dans les hydrosystèmes européens et présentent des caractéristiques écologiques et phylogénétiques complémentaires des deux espèces utilisées dans ce travail (*e.g.*, espèce sémelpare qui présente une reproduction unique au cours de sa vie). De plus, elles sont couramment utilisées en écotoxicologie et de nombreux bioessais sur des marqueurs individuels sont déjà proposés.

Pour conclure, ce travail doctoral souligne l'intérêt de la modélisation en écotoxicologie pour le diagnostic de la qualité des milieux aquatiques. En effet, nous avons montré tout au long de ce manuscrit comment la modélisation pouvait apporter des solutions en proposant des outils pour 1- améliorer la spécificité et la sensibilité des réponses observées sur le terrain au niveau des biomarqueurs sub-individuels et des marqueurs individuels *via* la prise en compte des facteurs de confusion et 2- augmenter la pertinence écologique du diagnostic en donnant accès à une interprétation des effets observés lors des tests sur des niveaux d'organisation supérieurs tels que les populations.

Il apparaît alors fondamental de 1- continuer à développer ce type d'approches sur les différents marqueurs utilisés en écotoxicologie et de formaliser des liens entre ces marqueurs afin

d'améliorer la spécificité et la sensibilité de l'évaluation proposée et 2- de continuer d'augmenter la pertinence écologique des modèles de dynamique de population en considérant un maximum d'espèces présentant des traits de vie contrastés et représentatives des écosystèmes ou encore en tenant compte de la variabilité saisonnière et inter-populationnelle de la sensibilité des population.





---

**BIBLIOGRAPHIE**

- Adam, O. (2008). "Impact des produits du bois sur les amphipodes *Gammarus pulex* (L.) et *Gammarus fossarum* (K.) : approches chimique, hydro-écologique et écotoxicologique." Université de Bourgogne.
- Adam, O., Badot, P. M., Degiorgi, F. and Crini, G. (2009). "Mixture toxicity assessment of wood preservative pesticides in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.)." Ecotoxicology and Environmental Safety **72**(2): 441-449.
- Aguirre-Sierra, A., Alonso, A. and Camargo, J. A. (2011). "Contrasting sensitivities to fluoride toxicity between juveniles and adults of the aquatic snail *Potamopyrgus antipodarum* (Hydrobiidae, Mollusca)." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **86**(5): 476-479.
- Akçakaya, H. R., Stark, J. D. and Bridges, T. S. (2008). "Demographic toxicity: methods in ecological risk assessment". Oxford University Press.
- Allan, I. J., Vrana, B., Greenwood, R., Mills, G. A., Roig, B. and Gonzalez, C. (2006). "A "toolbox" for biological and chemical monitoring requirements for the European Union's Water Framework Directive." Talanta **69**(2): 302-322.
- Almeida, C., Pereira, C., Gomes, T., Bebianno, M. J. and Cravo, A. (2011). "DNA damage as a biomarker of genotoxic contamination in *Mytilus galloprovincialis* from the south coast of Portugal." Journal of Environmental Monitoring **13**(9): 2559-2567.
- Alonso, A. and Camargo, J. A. (2003). "Short-term toxicity of ammonia, nitrite, and nitrate to the aquatic snail *Potamopyrgus antipodarum* (Hydrobiidae, Mollusca)." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **70**(5): 1006-1012.
- Alonso, Á. and Camargo, J. A. (2009). "Long-term effects of ammonia on the behavioral activity of the aquatic snail *Potamopyrgus antipodarum* (Hydrobiidae, Mollusca)." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **56**(4): 796-802.
- Alonso, Á. and Camargo, J. A. (2011a). "Subchronic toxic effects of fluoride ion on the survival and behaviour of the aquatic snail *Potamopyrgus antipodarum* (hydrobiidae, mollusca)." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **60**(3): 511-517.
- Alonso, Á. and Camargo, J. A. (2011b). "Toxic effects of fluoride ion on survival, reproduction and behaviour of the aquatic snail *Potamopyrgus antipodarum* (Hydrobiidae, Mollusca)." Water, Air, and Soil Pollution **219**(1-4): 81-90.
- Alonso, A. and Castro-Díez, P. (2008). "What explains the invading success of the aquatic mud snail *Potamopyrgus antipodarum* (Hydrobiidae, Mollusca)?" Hydrobiologia **614**(1): 107-116.
- Alonso, A., De Lange, H. J. and Peeters, E. T. H. M. (2009). "Development of a feeding behavioural bioassay using the freshwater amphipod *Gammarus pulex* and the Multispecies Freshwater Biomonitor." Chemosphere **75**(3): 341-346.
- Alonso, Á., De Lange, H. J. and Peeters, E. T. H. M. (2010). "Contrasting sensitivities to toxicants of the freshwater amphipods *Gammarus pulex* and *G. fossarum*." Ecotoxicology **19**(1): 133-140.

- Amiard-Triquet, C. (2009). "Behavioral disturbances: The missing link between sub-organismal and supra-organismal responses to stress? Prospects based on aquatic research." Human and Ecological Risk Assessment **15**(1): 87-110.
- Amiard-Triquet, C., Rainbow, P. S. and Roméo, M. (2011). "Tolerance to Environmental Contaminants". CRC Press Inc.
- Amiard, J. C. and Amiard-Triquet, C. (2008). "Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques". Paris : Ed. Tec & Doc.
- An, W., Hu, J. Y. and Yao, F. (2006). "A method of assessing ecological risk to night heron, *Nycticorax nycticorax*, population persistence from dichlorodiphenyltrichloroethane exposure." Environmental Toxicology and Chemistry **25**(1): 281-286.
- Ankley, G. T., Bennett, R. S., Erickson, R. J., Hoff, D. J., Hornung, M. W., Johnson, R. D., Mount, D. R., Nichols, J. W., Russom, C. L., Schmieder, P. K., Serrano, J. A., Tietge, J. E. and Villeneuve, D. L. (2010). "Adverse outcome pathways: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment." Environmental Toxicology and Chemistry **29**(3): 730-741.
- Archaimbault, V. (2003). "Réponses bio-écologiques des macroinvertébrés benthiques aux perturbations : la base d'un outil diagnostique fonctionnel des écosystèmes d'eaux courantes." Université de Metz.
- Ares, J. (2003). "Time and space issues in ecotoxicology: Population models, landscape pattern analysis, and long-range environmental chemistry." Environmental Toxicology and Chemistry **22**(5): 945-957.
- Aronsson, K. A. and Ekelund, N. G. A. (2005). "Respiration measurements can assess the fitness of *Gammarus pulex* (L.) after exposure to different contaminants; experiments with wood ash, cadmium and aluminum." Archiv fur Hydrobiologie **164**(4): 479-491.
- Arthur, J. W. (1970). "Chronic effects of linear alkylate sulfonate detergent on *Gammarus pseudolimnaeus*, *Campeloma decisum* and *Physa integra*." Water Research **4**(3): 251-257.
- Ashauer, R., Boxall, A. and Brown, C. (2006a). "Predicting effects on aquatic organisms from fluctuating or pulsed exposure to pesticides." Environmental Toxicology and Chemistry **25**(7): 1899-1912.
- Ashauer, R., Boxall, A. and Brown, C. (2006b). "Uptake and elimination of chlorpyrifos and pentachlorophenol into the freshwater amphipod *Gammarus pulex*." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **51**(4): 542-548.
- Ashauer, R., Boxall, A. B. A. and Brown, C. D. (2007). "Simulating toxicity of carbaryl to *Gammarus pulex* after sequential pulsed exposure." Environmental Science and Technology **41**(15): 5528-5534.
- Ashauer, R., Caravatti, I., Hintermeister, A. and Escher, B. I. (2010). "Bioaccumulation kinetics of organic xenobiotic pollutants in the freshwater invertebrate *Gammarus pulex* modeled with prediction intervals." Environmental Toxicology and Chemistry **29**(7): 1625-1636.
- Ashauer, R., Hintermeister, A., Potthoff, E. and Escher, B. I. (2011). "Acute toxicity of organic chemicals to *Gammarus pulex* correlates with sensitivity of *Daphnia magna* across most modes of action." Aquatic Toxicology **103**(1-2): 38-45.
- Auber, A., Roucaute, M., Togola, A. and Caquet, T. (2011). "Structural and functional effects of conventional and low pesticide input crop-protection programs on benthic macroinvertebrate communities in outdoor pond mesocosms." Ecotoxicology 1-14.

- Baird, D. J., Brown, S. S., Lagadic, L., Liess, M., Maltby, L., Moreira-Santos, M., Schulz, R. and Scott, G. I. (2007a). "In situ-based effects measures: determining the ecological relevance of measured responses." Integrated environmental assessment and management **3**(2): 259-267.
- Baird, D. J., Burton, G. A., Culp, J. M. and Maltby, L. (2007b). "Summary and recommendations from a SETAC Pellston Workshop on *in situ* measures of ecological effects." Integrated Environmental Assessment and Management **3**(2): 275-278.
- Baird, D. J. and Van den Brink, P. J. (2007). "Using biological traits to predict species sensitivity to toxic substances." Ecotoxicology and Environmental Safety **67**(2): 296-301.
- Banks, J. E., Dick, L. K., Banks, H. T. and Stark, J. D. (2008). "Time-varying vital rates in ecotoxicology: Selective pesticides and aphid population dynamics." Ecological Modelling **210**(1-2): 155-160.
- Barata, C., Damasio, J., LÃ³pez, M. A., Kuster, M., De Alda, M. L., BarcelÃ³, D., Riva, M. C. and RaldÃ³a, D. (2007). "Combined use of biomarkers and *in situ* bioassays in *Daphnia magna* to monitor environmental hazards of pesticides in the field." Environmental Toxicology and Chemistry **26**(2): 370-379.
- Barnard, J. L. and Barnard, C. M. (1983). "Freshwater Amphipod of the world- I. Evolutionary patterns". Hayfield associates.
- Barnthouse, L. W., Munns, W. R. and Sorensen, M. T. (2008). "Population-level ecological risk assessment". SETAC.
- Barnthouse, L. W., Suter, G. W., Rosen, A. E. and Beauchamp, J. J. (1987). "Estimating responses of fish populations to toxic contaminants." Environmental Toxicology and Chemistry **6**(10): 811-824.
- Bartell, S. M., Campbell, K. R., Lovelock, C. M., Nair, S. K. and Shaw, J. L. (2000). "Characterizing aquatic ecological risks from pesticides using a diquat dibromide case study III. Ecological process models." Environmental Toxicology and Chemistry **19**(5): 1441-1453.
- Bartell, S. M., Pastorok, R. A., Akçakaya, H. R., Regan, H., Ferson, S. and Mackay, C. (2003). "Realism and relevance of ecological models used in chemical risk assessment." Human and Ecological Risk Assessment **9**(4): 907-938.
- Baveco, J. M. and De Roos, A. M. (1996). "Assessing the impact of pesticides on lumbricid populations: An individual-based modelling approach." Journal of Applied Ecology **33**(6): 1451-1468.
- Beard Jr, T. D. and Essington, T. E. (2000). "Effects of angling and life history processes on bluegill size structure: Insights from an individual-based model." Transactions of the American Fisheries Society **129**(2): 561-568.
- Beaudoin, R. (2007). "Modélisation individu-centrée pour aider à la détection et à l'interprétation des effets des polluants chimiques sur la dynamique de population d'un poisson, la gambusie, en écosystème expérimental." Université de Rennes 1.
- Beaudouin, R., Monod, G. and Ginot, V. (2008). "Selecting parameters for calibration via sensitivity analysis: An individual-based model of mosquitofish population dynamics." Ecological Modelling **218**(1-2): 29-48.
- Beketov, M. A. and Liess, M. (2008a). "Acute and delayed effects of the neonicotinoid insecticide thiacloprid on seven freshwater arthropods." Environmental Toxicology and Chemistry **27**(2): 461-470.

- Beketov, M. A. and Liess, M. (2008b). "Potential of 11 pesticides to initiate downstream drift of stream macroinvertebrates." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **55**(2): 247-253.
- Bermingham, S., Fisher, P. J., Martin, A., Marriott, M. and Lappin-Scott, H. (1998). "The effect of the herbicide mecoprop on *Heliscus lugdunensis* and its influence on the preferential feeding of *Gammarus Pseudolimnaeus*." Microbial Ecology **35**(2): 199-204.
- Billoir, E., da Silva Ferrão-Filho, A., Laure Delignette-Muller, M. and Charles, S. (2009). "DEBtox theory and matrix population models as helpful tools in understanding the interaction between toxic cyanobacteria and zooplankton." Journal of Theoretical Biology **258**(3): 380-388.
- Billoir, E., Laure Delignette-Muller, M., Péry, A. R. R., Geffard, O. and Charles, S. (2008). "Statistical cautions when estimating DEBtox parameters." Journal of Theoretical Biology **254**(1): 55-64.
- Billoir, E., Péry, A. R. R. and 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.
- Blanchet-Tournier, M.-F. (1980). "Mue et vitellogénèse chez le crustacé amphipode *Orchestia gammarellus* (Pallas) : Controles endocries et interactions." Université Pierre et Marie Curie (Paris 6).
- Blandin, P., Mollon, A. and Nataf, L. (1986). "Bioindicateurs et diagnostic des systèmes écologiques".
- Blockwell, S. J., Pascoe, D. and Taylor, E. J. (1996). "Effects of lindane on the growth of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.)." Chemosphere **32**(9): 1795-1803.
- Blockwell, S. J., Taylor, E. J., Jones, I. and Pascoe, D. (1998). "The influence of fresh water pollutants and interaction with *Asellus aquaticus* (L.) on the Feeding activity of *Gammarus pulex* (L.)." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **34**(1): 41-47.
- Bloor, M. C. and Banks, C. J. (2006a). "Acute and sub-lethal toxicity of landfill leachate towards two aquatic macro-invertebrates: Demonstrating the remediation potential of aerobic digestion." Hydrobiologia **556**(1): 387-397.
- Bloor, M. C. and Banks, C. J. (2006b). "An evaluation of mixed species in-situ and ex-situ feeding assays: The altered response of *Asellus aquaticus* and *Gammarus pulex*." Environment International **32**(1): 22-27.
- Bloor, M. C., Banks, C. J. and Krivtsov, V. (2005). "Acute and sublethal toxicity tests to monitor the impact of leachate on an aquatic environment." Environment International **31**(2): 269-273.
- Bocchetti, R., Lamberti, C. V., Pisanelli, B., Razzetti, E. M., Maggi, C., Catalano, B., Sesta, G., Martuccio, G., Gabellini, M. and Regoli, F. (2008). "Seasonal variations of exposure biomarkers, oxidative stress responses and cell damage in the clams, *Tapes philippinarum*, and mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Adriatic sea." Marine Environmental Research **66**(1): 24-26.
- Bocchetti, R. and Regoli, F. (2006). "Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea." Chemosphere **65**(6): 913-921.

- 
- Bodin, N., Burgeot, T., Stanisière, J. Y., Bocquené, G., Menard, D., Minier, C., Boutet, I., Amat, A., Cherel, Y. and Budzinski, H. (2004). "Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **138**(4): 411-427.
- Bollache, L. (2003). "Trois espèces d'amphipodes épigés nouvelles pour la Saône bourguignonne." Bulletin Scientifique de Bourgogne **51**:3-11.
- Bollache, L. and Cezilly, F. (2004). "State-dependent pairing behaviour in male *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea, Amphipoda): Effects of time left to moult and prior pairing status." Behavioural Processes **66**(2): 131-137.
- Brandt, K. K., Jørgensen, N. O. G., Nielsen, T. H. and Winding, A. (2004). "Microbial community-level toxicity testing of linear alkylbenzene sulfonates in aquatic microcosms." FEMS Microbiology Ecology **49**(2): 229-241.
- Brian, J. V., Harris, C. A., Runnalls, T. J., Fantinati, A., Pojana, G., Marcomini, A., Booy, P., Lamoree, M., Kortenkamp, A. and Sumpter, J. P. (2008). "Evidence of temperature-dependent effects on the estrogenic response of fish: Implications with regard to climate change." Science of the Total Environment **397**(1-3): 72-81.
- Brix, K. V., Henderson, D. G., Adams, W. J., Reash, R. J., Carlton, R. G. and McIntyre, D. O. (2001). "Acute toxicity of sodium selenate to two Daphnids and three amphipods." Environmental Toxicology **16**(2): 142-150.
- Brooks, S. J. and Mills, C. L. (2003). "The effect of copper on osmoregulation in the freshwater amphipod *Gammarus pulex*." Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology **135**(4): 527-537.
- Brown, A. F. and Pascoe, D. (1989). "Parasitism and host sensitivity to cadmium: an acanthocephalan infection of the freshwater amphipod *Gammarus pulex*." Journal of Applied Ecology **26**(2): 473-487.
- Brown, L. (1980). "The use of hydrobia jenkinsi to detect intermittent toxic discharges to a river." Water Research **14**(8): 941-947.
- Brown, R. J., Conradi, M. and Depledge, M. H. (1999). "Long-term exposure to 4-nonylphenol affects sexual differentiation and growth of the amphipod *Corophium volutator* (Pallas, 1766)." Science of the Total Environment **233**(1-3): 77-88.
- Bundschuh, M., Gessner, M. O., Fink, G., Ternes, T. A., Sögdin, C. and Schulz, R. (2011a). "Ecotoxicological evaluation of wastewater ozonation based on detritus-detritivore interactions." Chemosphere **82**(3): 355-361.
- Bundschuh, M., Hahn, T., Gessner, M. O. and Schulz, R. (2009). "Antibiotics as a chemical stressor affecting an aquatic decomposer-detritivore system." Environmental Toxicology and Chemistry **28**(1): 197-203.
- Bundschuh, M. and Schulz, R. (2011). "Population response to ozone application in wastewater: An on-site microcosm study with *Gammarus fossarum* (Crustacea: Amphipoda)." Ecotoxicology **20**(2): 466-473.
- Bundschuh, M., Zubrod, J. P., Seitz, F., Stang, C. and Schulz, R. (2011b). "Ecotoxicological evaluation of three tertiary wastewater treatment techniques via meta-analysis and feeding bioassays using *Gammarus fossarum*." Journal of Hazardous Materials **192**(2): 772-778.
-

- Buschini, A., Carboni, P., Martino, A., Poli, P. and Rossi, C. (2003). "Effects of temperature on baseline and genotoxicant-induced DNA damage in haemocytes of *Dreissena polymorpha*." Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis **537**(1): 81-92.
- Cailleaud, K., Maillet, G., Budzinski, H., Souissi, S. and Forget-Leray, J. (2007). "Effects of salinity and temperature on the expression of enzymatic biomarkers in *Eurytemora affinis* (Calanoida, Copepoda)." Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology **147**(4): 841-849.
- Cairns, J. and Pratt, J. R. (1993). "Trends in ecotoxicology." Science of the Total Environment **134, Supplement 1**(0): 7-22.
- Calow, P. (1978). "The evolution of life-cycles strategies in freshwater gastropods." Malacologia **17**(2): 351-364.
- Calow, P. and Forbes, V. E. (1998). "How do physiological responses to stress translate into ecological and evolutionary processes?" Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology **120**(1): 11-16.
- Calow, P., Sibly, R. M. and Forbes, V. (1997). "Risk assessment on the basis of simplified life-history scenarios." Environmental Toxicology and Chemistry **16**(9): 1983-1989.
- Caquet, T., Lagadic, L., Monod, G., Lacaze, J. C. and Couté, A. (2001). "Variability of physicochemical and biological parameters between replicated outdoor freshwater lentic mesocosms." Ecotoxicology **10**(1): 51-66.
- Caquet, T., Roucaute, M., Le Goff, P. and Lagadic, L. (2011). "Effects of repeated field applications of two formulations of *Bacillus thuringiensis var. israelensis* on non-target saltmarsh invertebrates in Atlantic coastal wetlands." Ecotoxicology and Environmental Safety **74**(5): 1122-1130.
- Carballeira, C., Martín-Díaz, L. and DelValls, T. A. (2011). "Influence of salinity on fertilization and larval development toxicity tests with two species of sea urchin." Marine Environmental Research **72**(4): 196-203.
- Castellani, C. and Altunbaş, Y. (2006). "Factors controlling the temporal dynamics of egg production in the copepod *Temora longicornis*." Marine Ecology Progress Series **308**(143-153).
- Caswell, H. (1996). "Analysis of life table response experiments II. Alternative parameterizations for size- and stage-structured models." Ecological Modelling **88**(1-3): 73-82.
- Caswell, H. (2001). "Matrix Population Models". John Wiley & Sons, Ltd.
- Cengiz, E. I. and Unlu, E. (1999). "The effects of the different concentrations of Thiodan® on the mortality rates of *Gambusia affinis* and *Gammarus pulex*." Biochemical Archives **15**(3): 251-254.
- Chandler, G. T., Cary, T. L., Bejarano, A. C., Pender, J. and Ferry, J. L. (2004). "Population consequences of fipronil and degradates to copepods at field concentrations: An integration of life cycle testing with Leslie matrix population modeling." Environmental Science and Technology **38**(23): 6407-6414.
- Chapman, P. M. (2002). "Integrating toxicology and ecology: Putting the 'eco' into ecotoxicology." Marine Pollution Bulletin **44**(1): 7-15.
- Chapman, P. M. (2007). "Determining when contamination is pollution - Weight of evidence determinations for sediments and effluents." Environment International **33**(4): 492-501.

- 
- Charles, S., Billoir, E., Lopes, C. and Chaumot, A. (2009). "Matrix Population Models as Relevant Modeling Tools in Ecotoxicology." in *Ecotoxicology Modeling*, Springer
- Charles, S., Ferreol, M., Chaumot, A. and Péry, A. R. R. (2004). "Food availability effect on population dynamics of the midge *Chironomus riparius*: A Leslie modeling approach." *Ecological Modelling* **175**(3): 217-229.
- Charniaux-Cotton, H. (1957). "Croissance, régénération et déterminisme endocrinien des caractères sexuels d'*Orchestia gammarella* (Pallas) Crustacé Amphipode." *Annales des sciences Naturelles, Zoologie* **11**(411-559).
- Chaumot, A. (2002). "Ecotoxicologie et Modélisation spatiale en Dynamique de Population. exemple d'une population de truites exposée à une pollution dans un réseau de rivières." *Université Claude Bernard - Lyon 1*.
- Chaumot, A., Adam, O., Coulaud, R., Quéau, H. and Geffard, O. (in prep). "Reproductive test using the amphipod *Gammarus fossarum*: impact of confounding factors on the reproductive cycle and implications for ecotoxicological assessment."
- Chaumot, A., Charles, S., Flammarion, P. and Auger, P. (2003a). "Do migratory or demographic disruptions rule the population impact of pollution in spatial networks?" *Theoretical Population Biology* **64**(4): 473-480.
- Chaumot, A., Charles, S., Flammarion, P. and Auger, P. (2003b). "Ecotoxicology and spatial modeling in population dynamics: An illustration with brown trout." *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**(5): 958-969.
- Chaumot, A., Charles, S., Flammarion, P., Garric, J. and Auger, P. (2002). "Using aggregation methods to assess toxicant effects on population dynamics in spatial systems." *Ecological Applications* **12**(6): 1771-1784.
- Chaumot, A., Gos, P., Garric, J. and Geffard, O. (2009). "Additive vs non-additive genetic components in lethal cadmium tolerance of *Gammarus* (Crustacea): Novel light on the assessment of the potential for adaptation to contamination." *Aquatic Toxicology* **94**(4): 294-299.
- Chen, B. C. and Liao, C. M. (2004). "Population models of farmed abalone *Haliotis diversicolor* supertexta exposed to waterborne zinc." *Aquaculture* **242**(1-4): 251-269.
- Chevreaux, E. and Fage, L. (1970). "Faune de France, Tome 9 : Amphipodes". *Kraus reprint*.
- Choi, W. I., Moorhead, D. L., Neher, D. A. and Ryoo, M. I. (2006a). "A modeling study of soil temperature and moisture effects on population dynamics of *Paronychiurus kimi* (Collembola: Onychiuridae)." *Biology and Fertility of Soils* **43**(1): 69-75.
- Choi, Y. H., Bohan, D. A., Potting, R. P. J., Semenov, M. A. and Glen, D. M. (2006b). "Individual based model of slug population and spatial dynamics." *Ecological Modelling* **190**(3-4): 336-350.
- Clark, J. S. (2003). "Uncertainty and variability in demography and population growth: A hierarchical approach." *Ecology* **84**(6): 1370-1381.
- Clément, B., Devaux, A., Perrodin, Y., Danjean, M. and Ghidini-Fatus, M. (2004). "Assessment of sediment ecotoxicity and genotoxicity in freshwater laboratory microcosms." *Ecotoxicology* **13**(4): 323-333.
- Clements, W. H. (2000). "Integrating effects of contaminants across levels of biological organization: An overview." *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* **7**(2): 113-116.
-



- Cold, A. and Forbes, V. E. (2004). "Consequences of a short pulse of pesticide exposure for survival and reproduction of *Gammarus pulex*." *Aquatic Toxicology* **67**(3): 287-299.
- Colville, A., Jones, P., Pablo, F., Krassoi, F., Hose, G. and Lim, R. (2008). "Effects of chlorpyrifos on macroinvertebrate communities in coastal stream mesocosms." *Ecotoxicology* **17**(3): 173-180.
- Costa, F. O. and Costa, M. H. (1999). "Life history of the amphipod *Gammarus locusta* in the Sado estuary (Portugal)." *Acta Oecologica* **20**(4): 305-314.
- Costa, F. O., Neuparth, T., Correia, A. D. and Helena Costa, M. (2005). "Multi-level assessment of chronic toxicity of estuarine sediments with the amphipod *Gammarus locusta*. II. Organism and population-level endpoints." *Marine Environmental Research* **60**(1): 93-110.
- Coulaud, R., Geffard, O., Xuereb, B., Lacaze, E., Quéau, H., Garric, J., Charles, S. and Chaumot, A. (2011). "In situ feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring." *Water Research* **45**(6417-6429).
- Crane, M., Attwood, C., Sheahan, D. and Morris, S. (1999). "Toxicity and bioavailability of the organophosphorus insecticide pirimiphos methyl to the freshwater amphipod *Gammarus pulex* L. In laboratory and mesocosm systems." *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**(7): 1456-1461.
- Crane, M., Burton, G. A., Culp, J. M., Greenberg, M. S., Munkittrick, K. R., Ribeiro, R., Salazar, M. H. and St-Jean, S. D. (2007). "Review of aquatic *in situ* approaches for stressor and effect diagnosis." *Integrated environmental assessment and management* **3**(2): 234-245.
- Crane, M., Delaney, P., Mainstone, C. and Clarke, S. (1995). "Measurement by *in situ* bioassay of water quality in an agricultural catchment." *Water Research* **29**(11): 2441-2448.
- Crone, E. E., Marler, M. and Pearson, D. E. (2009). "Non-target effects of broadleaf herbicide on a native perennial forb: A demographic framework for assessing and minimizing impacts." *Journal of Applied Ecology* **46**(3): 673-682.
- Cuzin-Roudy, J. and Buchholz, F. (1999). "Ovarian development and spawning in relation to the moult cycle in Northern krill, *Meganyctiphanes norvegica* (Crustacea: Euphausiacea), along a climatic gradient." *Marine Biology* **133**(2): 267-281.
- Dagnino, A., Sforzini, S., Dondero, F., Fenoglio, S., Bona, E., Jensen, J. and Viarengo, A. (2008). "A "Weight-of-Evidence" approach for the integration of environmental "Triad" data to assess ecological risk and biological vulnerability." *Integrated Environmental Assessment and Management* **4**(3): 314-326.
- Dahl, J. and Greenberg, L. (1996). "Effects of habitat structure on habitat use by *Gammarus pulex* in artificial streams." *Freshwater Biology* **36**(487-495).
- Dalkvist, T., Topping, C. J. and Forbes, V. E. (2009). "Population-level impacts of pesticide-induced chronic effects on individuals depend more on ecology than toxicology." *Ecotoxicology and Environmental Safety* **72**(6): 1663-1672.
- Damáso, J., Tauler, R., Teixidó, E., Rieradevall, M., Prat, N., Riva, M. C., Soares, A. M. V. M. and Barata, C. (2008). "Combined use of *Daphnia magna in situ* bioassays, biomarkers and biological indices to diagnose and identify environmental pressures on invertebrate communities in two Mediterranean urbanized and industrialized rivers (NE Spain)." *Aquatic Toxicology* **87**(4): 310-320.

- Damiens, G., Gnassia-Barelli, M., Loquès, F., Roméo, M. and Salbert, V. (2007). "Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels." Chemosphere **66**(3): 574-583.
- Damiens, G., His, E., Gnassia-Barelli, M., Quiniou, F. and Roméo, M. (2004). "Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions." Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology **138**(2): 121-128.
- Dangles, O. J. and Guerold, F. A. (2001). "Feeding activity of *Gammarus fossarum* (Crustacea : Amphipoda) in acidic and low mineralized streams." in *International Association of Theoretical and Applied Limnology, Vol 27, Pt 5, Proceedings*, Williams, W. D.
- Davidson, R. S. and Armstrong, D. P. (2002). "Estimating impacts of poison operations on non-target species using mark - Recapture analysis and simulation modelling: An example with saddlebacks." Biological Conservation **105**(3): 375-381.
- De Jong, F. M. W., Mensink, B. J. W. G., Smit, C. E. and Montforts, M. H. M. M. (2005). "Evaluation of ecotoxicological field studies for authorization of plant protection products in Europe." Human and Ecological Risk Assessment **11**(6): 1157-1176.
- De Lafontaine, Y., Gagné, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P. and Chan, H. M. (2000). "Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada)." Aquatic Toxicology **50**(1-2): 51-71.
- De Lange, H. J., Noordoven, W., Murk, A. J., Lürling, M. and Peeters, E. T. H. M. (2006). "Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals." Aquatic Toxicology **78**(3): 209-216.
- DeAngelis, D. L., Godbout, L. and Shuter, B. J. (1991). "An individual-based approach to predicting density-dependent dynamics in smallmouth bass populations." Ecological Modelling **57**(1-2): 91-115.
- Dedourge-Geffard, O., Palais, F., Biagiatti-Risbourg, S., Geffard, O. and Geffard, A. (2009). "Effects of metals on feeding rate and digestive enzymes in *Gammarus fossarum*: An *in situ* experiment." Chemosphere **77**(11): 1569-1576.
- Depledge, M. H. and Fossi, M. C. (1994). "The role of biomarkers in environmental assessment. (2) Invertebrates." Ecotoxicology **3**(3): 161-172.
- Depledge, M. H. and Galloway, T. S. (2005). "Healthy animals, healthy ecosystems." Frontiers in Ecology and the Environment **3**(5): 251-258.
- Devin, S., Piscart, C., Beisel, J. N. and Moreteau, J. C. (2004). "Life History Traits of the Invader *Dikerogammarus villosus* (Crustacea: Amphipoda) in the Moselle River, France." International Review of Hydrobiology **89**(1): 21-34.
- Dick, J. T. A., Faloon, S. E. and Elwood, R. W. (1998). "Active brood care in an amphipod: Influences of embryonic development, temperature and oxygen." Animal Behaviour **56**(3): 663-672.
- Dietrich, S., Dammel, S., Ploessl, F., Bracher, F. and Laforsch, C. (2010). "Effects of a pharmaceutical mixture at environmentally relevant concentrations on the amphipod *Gammarus fossarum*." Marine and Freshwater Research **61**(2): 196-203.
- Dorgelo, J. (1987). "Density fluctuations in populations (1982-1986) and biological observations of *Potamopyrgus jenkinsi* in two trophically differing lakes." Hydrobiological Bulletin **21**(1): 95-110.
- Dorgelo, J. (1988). "Growth in a freshwater snail under laboratory conditions in relation to eutrophication." Hydrobiologia **157**(2): 125-127.

- Dorgelo, J. and Hengst, P. A. (1986). "Two modifications of the quantitative hydraulic lift sampler for benthic invertebrates." Water Research **20**(7): 825-829.
- Dorgelo, J. and Leonards, P. E. G. (2001). "Relationship between C/N ratio of food types and growth rate in the snail *Potamopyrgus jenkinsi* (E. A. Smith)." Journal of the North American Benthological Society **20**(1): 60-67.
- Dorgelo, J., Meester, H. and Van Velzen, C. (1995). "Effects of diet and heavy metals on growth rate and fertility in the deposit-feeding snail *Potamopyrgus jenkinsi* (Smith) (Gastropoda: Hydrobiidae)." Hydrobiologia **316**(3): 199-210.
- Dragun, Z., Podrug, M. and Raspor, B. (2009). "The assessment of natural causes of metallothionein variability in the gills of European chub (*Squalius cephalus* L.)." Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology **150**(2): 209-217.
- Dragun, Z., Raspor, B. and Podrug, M. (2007). "The influence of the season and the biotic factors on the cytosolic metal concentrations in the gills of the European chub (*Leuciscus cephalus* L.)." Chemosphere **69**(6): 911-919.
- Drechsler, M., Wätzold, F., Johst, K., Bergmann, H. and Settele, J. (2007). "A model-based approach for designing cost-effective compensation payments for conservation of endangered species in real landscapes." Biological Conservation **140**(1-2): 174-186.
- Ducrot, V., Billoir, E., Péry, A. R. R., Garric, J. and 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 and Technology **44**(9): 3566-3571.
- Ducrot, V., Péry, A. R. R., Mons, R., Quéau, H., Charles, S. and Garric, J. (2007). "Dynamic energy budget as a basis to model population-level effects of zinc-spiked sediments in the gastropod *Valvata piscinalis*." Environmental Toxicology and Chemistry **26**(8): 1774-1783.
- Duft, M., Schulte-Oehlmann, U., Tillmann, M., Markert, B. and Oehlmann, J. (2003a). "Toxicity of triphenyltin and tributyltin to the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* in a new sediment biotest." Environmental Toxicology and Chemistry **22**(1): 145-152.
- Duft, M., Schulte-Oehlmann, U., Weltje, L., Tillmann, M. and Oehlmann, J. (2003b). "Stimulated embryo production as a parameter of estrogenic exposure via sediments in the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*." Aquatic Toxicology **64**(4): 437-449.
- Duran, M. (2004). "Estimating the growth rate of *Gammarus pulex* (L.) from the River Yeşilirmak (Turkey)." Archiv für Hydrobiologie **161**(4): 553-559.
- Eisinger, D. and Thulke, H. H. (2008). "Spatial pattern formation facilitates eradication of infectious diseases." Journal of Applied Ecology **45**(2): 415-423.
- Elliott, J. M. (2002). "The drift distances and time spent in the drift by freshwater shrimps, *Gammarus pulex*, in a small stony stream, and their implications for the interpretation of downstream dispersal." Freshwater Biology **47**(1403-1417).
- Emlen, J. M. and Springman, K. R. (2007). "Developing methods to assess and predict the population level effects of environmental contaminants." Integrated Environmental Assessment and Management **3**(2): 157-165.

- Falfushynska, H. I., Gnatyshyna, L. L., Priydu, C. V., Stoliar, O. B. and Nam, Y. K. (2010). "Variability of responses in the crucian carp *Carassius carassius* from two Ukrainian ponds determined by multi-marker approach." Ecotoxicology and Environmental Safety **73**(8): 1896-1906.
- Felten, V. (2003). "Effets de l'acidification des ruisseaux vosgiens sur la biologie, l'écologie et l'écophysiologie de *Gammarus fossarum* Koch, 1835 (Crustacea Amphipoda): Approche intégrée à différents niveaux d'organisation.", Université de Metz.
- Felten, V., Charmantier, G., Mons, R., Geffard, A., Rousselle, P., Coquery, M., Garric, J. and Geffard, O. (2008a). "Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium." Aquatic Toxicology **86**(3): 413-425.
- Felten, V. and Guerold, F. (2001). "Hyperventilation and loss of hemolymph Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* exposed to acid stress: A preliminary study." Diseases of Aquatic Organisms **45**(1): 77-80.
- Felten, V., Tixier, G., Guérol, F., De Crespin De Billy, V. and Dangles, O. (2008b). "Quantification of diet variability in a stream amphipod: Implications for ecosystem functioning." Fundamental and Applied Limnology **170**(4): 303-313.
- Fialkowski, W., Fialkowska, E., Smith, B. D. and Rainbow, P. S. (2003). "Biomonitoring survey of trace metal pollution in streams of a catchment draining a zinc and lead mining area of Upper Silesia, Poland using the amphipod *Gammarus fossarum*." International Review of Hydrobiology **88**(2): 187-200.
- Fielding, N. J., MacNeil, C., Dick, J. T. A., Elwood, R. W., Riddell, G. E. and Dunn, A. M. (2003). "Effects of the acanthocephalan parasite *Echinorhynchus truttae* on the feeding ecology of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda)." Journal of Zoology **261**(3): 321-325.
- Flammarion, P. and Garric, J. (1999). "A statistical approach for classifying the extent of EROD induction of fish sampled in clean and contaminated waters." Water Research **33**(11): 2683-2689.
- Forbes, V. E. and Calow, P. (1999). "Is the per capita rate of increase a good measure of population-level effects in ecotoxicology?" Environmental Toxicology and Chemistry **18**(7): 1544-1556.
- Forbes, V. E. and Calow, P. (2002). "Extrapolation in Ecological Risk Assessment: Balancing Pragmatism and Precaution in Chemical Controls Legislation." BioScience **52**(3): 249-257.
- Forbes, V. E., Calow, P., Grimmz, V., Hayashi, T., Jager, T., Palmqvist, A., Pastorok, R., Salvitoy, D., Sibly, R., Spromberg, J., Stark, J. and Stillman, R. A. (2010). "Integrating population modeling into ecological risk assessment." Integrated Environmental Assessment and Management **6**(1): 191-193.
- Forbes, V. E., Calow, P. and Sibly, R. M. (2001). "Are current species extrapolation models a good basis for ecological risk assessment?" Environmental Toxicology and Chemistry **20**(2): 442-447.
- Forbes, V. E., Calow, P. and Sibly, R. M. (2008). "The extrapolation problem and how population modeling can help." Environmental Toxicology and Chemistry **27**(10): 1987-1994.
- Forbes, V. E., Hommen, U., Thorbek, P., Heimbach, F., Van Den Brink, P. J., Wogram, J., Thulke, H. H. and Grimm, V. (2009). "Ecological models in support of regulatory risk assessments of pesticides: Developing a strategy for the future." Integrated Environmental Assessment and Management **5**(1): 167-172.

- Forbes, V. E., Moller, V. and Depledge, M. H. (1995). "Intrapopulation variability in sublethal response to heavy metal stress in sexual and asexual gastropod populations". Wiley-Blackwell.
- Forbes, V. E., Palmqvist, A. and Bach, L. (2006). "The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology." Environmental Toxicology and Chemistry **25**(1): 272-280.
- Ford, A. T., Fernandes, T. F., Rider, S. A., Read, P. A., Robinson, C. D. and Davies, I. M. (2003). "Measuring sublethal impacts of pollution on reproductive output of marine Crustacea." Marine Ecology Progress Series **265**(303-309).
- Forrow, D. M. and Maltby, L. (2000). "Toward a mechanistic understanding of contaminant-induced changes in detritus processing in streams: Direct and indirect effects on detritivore feeding." Environmental Toxicology and Chemistry **19**(8): 2100-2106.
- Fossi Tankoua, O. (2011). "Perturbations du comportement et de la reproduction : des outils pour l'évaluation précoce de la dégradation de l'environnement estuarien et côtier." Université de Nantes.
- Fossi Tankoua, O., Buffet, P. E., Amiard, J. C., Amiard-Triquet, C., Mouneyrac, C. and Berthet, B. (2011). "Potential influence of confounding factors (size, salinity) on biomarkers in the sentinel species *Scrobicularia plana* used in programmes monitoring estuarine quality." Environmental Science and Pollution Research **18**(8): 1253-1263.
- Fretter, V. and Graham, A. (1994). "British Prosobranch molluscs. Their functional anatomy and ecology." Ray Society: London.
- Gagnaire, B., Gagné, F., André, C., Blaise, C., Abbaci, K., Budzinski, H., Dévier, M. H. and Garric, J. (2009). "Development of biomarkers of stress related to endocrine disruption in gastropods: Alkali-labile phosphates, protein-bound lipids and vitellogenin-like proteins." Aquatic Toxicology **92**(3): 155-167.
- Gagnaire, B., Geffard, O., Noury, P. and Garric, J. (2010). "*In vivo* indirect measurement of cytochrome P450-associated activities in freshwater gastropod molluscs." Environmental Toxicology **25**(6): 545-553.
- Gagnaire, B., Geffard, O., Xuereb, B., Margoum, C. and Garric, J. (2008). "Cholinesterase activities as potential biomarkers: Characterization in two freshwater snails, *Potamopyrgus antipodarum* (Mollusca, Hydrobiidae, Smith 1889) and *Valvata piscinalis* (Mollusca, Valvatidae, Müller 1774)." Chemosphere **71**(3): 553-560.
- Gagné, F., Blaise, C. and Pellerin, J. (2005). "Altered exoskeleton composition and vitellogenesis in the crustacean *Gammarus sp.* collected at polluted sites in the Saguenay Fjord, Quebec, Canada." Environmental Research **98**(1): 89-99.
- Galic, N., Hommen, U., Baveco, J. M. and Van Den Brink, P. J. (2010). "Potential application of population models in the european ecological risk assessment of chemicals II: Review of models and their potential to address environmental protection aims." Integrated Environmental Assessment and Management **6**(3): 338-360.
- Galloway, T. S., Brown, R. J., Browne, M. A., Dissanayake, A., Lowe, D., Depledge, M. H. and Jones, M. B. (2006). "The ECOMAN project: A novel approach to defining sustainable ecosystem function." Marine Pollution Bulletin **53**(1): 186-194.
- Gangloff, M. M. (1998). "The new zealand mudsnail in western North America." Aquatic Nuisance Species Digest **2**(3): 25-30.

- 
- Garmendia, J. M., Menchaca, I., Belzunce, M. J., Franco, J. and Revilla, M. (2010). "Seasonal variability in gonad development in the sea urchin (*Paracentrotus lividus*) on the Basque coast (Southeastern Bay of Biscay)." Marine Pollution Bulletin **61**(4-6): 259-266.
- Geffard, A., Amiard-Triquet, C. and Amiard, J. C. (2005). "Do seasonal changes affect metallothionein induction by metals in mussels, *Mytilus edulis*?" Ecotoxicology and Environmental Safety **61**(2): 209-220.
- Geffard, A., Amiard-Triquet, C., Amiard, J. C. and Mouneyrac, C. (2001). "Temporal variations of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of oysters (*Crassostrea gigas*) from a clean and a metal-rich site." Biomarkers **6**(2): 91-107.
- Geffard, A., Amiard, J. C. and Amiard-Triquet, C. (2002). "Use of metallothionein in gills from oysters (*Crassostrea gigas*) as a biomarker: Seasonal and intersite fluctuations." Biomarkers **7**(2): 123-137.
- Geffard, A., Quéau, H., Dedourge, O., Biagianti-Risboug, S. and Geffard, O. (2007). "Influence of biotic and abiotic factors on metallothionein level in *Gammarus pulex*." Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology **145**(4): 632-640.
- Geffard, O., Xuereb, B., Chaumot, A., Geffard, A., Biagianti, S., Noël, C., Abbaci, K., Garric, J., Charmantier, G. and Charmantier-Daures, M. (2010). "Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: Application for reproductive toxicity assessment." Environmental Toxicology and Chemistry **29**(10): 2249-2259.
- Gerard, C. and Dussart, G. B. J. (2003). "Invader and invaded - colonisation by, and of, *Potamopyrgus antipodarum* Gray (Mollusca, Hydrobiidae)." Slugs & Snails: Agricultural, Veterinary & Environmental Perspectives **80**(281-286).
- Gerard, C. and Poullain, V. (2005). "Variation in the response of the invasive species *Potamopyrgus antipodarum* (Smith) to natural (cyanobacterial toxin) and anthropogenic (herbicide atrazine) stressors." Environmental Pollution **138**(1): 28-33.
- Gerhardt, A. (1996). "Behavioural early warning responses to polluted water - Performance of *Gammarus pulex* L. (Crustacea) and *Hydropsyche angustipennis* (Curtis) (Insecta) to a complex industrial effluent." Environmental Science and Pollution Research **3**(2): 63-70.
- Gerhardt, A., Carlsson, A., Ressemann, C. and Stich, K. P. (1998). "New online biomonitoring system for *Gammarus pulex* (L) (Crustacea): *In situ* test below a copper effluent in South Sweden." Environmental Science and Technology **32**(1): 150-156.
- Giarratano, E., Gil, M. N. and Malanga, G. (2011). "Seasonal and pollution-induced variations in biomarkers of transplanted mussels within the Beagle Channel." Marine Pollution Bulletin **62**(6): 1337-1344.
- Gillis, P. L., Reynoldson, T. B. and Dixon, D. G. (2004). "Natural variation in a metallothionein-like protein in *Tubifex tubifex* in the absence of metal exposure." Ecotoxicology and Environmental Safety **58**(1): 22-28.
- Goedmakers, A. M. and Roux, A. L. (1975). "Essais d'hybridation entre plusieurs populations de gammares du groupe *Pulex* (Amphipoda)." Crustaceana **29**(1): 99-109.
- Golding, L. A., Timperley, M. H. and Evans, C. W. (1997). "Non-lethal responses of the freshwater snail *Potamopyrgus antipodarum* to dissolved arsenic." Environmental Monitoring and Assessment **47**(3): 239-254.
-

- Gorbi, S., Baldini, C. and Regoli, F. (2005). "Seasonal variability of metallothioneins, cytochrome P450, bile metabolites and oxyradical metabolism in the European eel *Anguilla anguilla* L. (Anguillidae) and striped mullet *Mugil cephalus* L. (Mugilidae)." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **49**(1): 62-70.
- Gorbi, S., Virno Lamberti, C., Notti, A., Benedetti, M., Fattorini, D., Moltedo, G. and Regoli, F. (2008). "An ecotoxicological protocol with caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring the impact of an offshore platform in the Adriatic sea." Marine Environmental Research **65**(1): 34-49.
- Gorzerino, C., Quemeneur, A., Hillenweck, A., Baradat, M., Delous, G., Ollitrault, M., Azam, D., Caquet, T. and Lagadic, L. (2009). "Effects of diquat and fomesafen applied alone and in combination with a nonylphenol polyethoxylate adjuvant on *Lemma minor* in aquatic indoor microcosms." Ecotoxicology and Environmental Safety **72**(3): 802-810.
- Grimm, V. (1999). "Ten years of individual-based modelling in ecology: What have we learned and what could we learn in the future?" Ecological Modelling **115**(2-3): 129-148.
- Grimm, V., Ashauer, R., Forbes, V., Hommen, U., Preuss, T. G., Schmidt, A., van den Brink, P. J., Wogram, J. and Thorbek, P. (2009). "CREAM: A European project on mechanistic effect models for ecological risk assessment of chemicals." Environmental Science and Pollution Research **16**(6): 614-617.
- Grimm, V., Lorek, H., Finke, J., Koester, F., Malachinski, M., Sonnenschein, M., Moilanen, A., Storch, I., Singer, A., Wissel, C. and Frank, K. (2004). "META-X: Generic software for metapopulation viability analysis." Biodiversity and Conservation **13**(1): 165-188.
- Grimm, V. and Railsback, S. F. (2005). "Individual-based modelling and Ecology". Princeton.
- Gross-Sorokin, M. Y., Grist, E. P. M., Cooke, M. and Crane, M. (2003). "Uptake and depuration of 4-nonylphenol by the benthic invertebrate *Gammarus pulex*: How important is feeding rate?" Environmental Science and Technology **37**(10): 2236-2241.
- Gross, M. Y., Maycock, D. S., Thorndyke, M. C., Morritt, D. and Crane, M. (2001). "Abnormalities in sexual development of the amphipod *Gammarus pulex* (L.) found below sewage treatment works." Environmental Toxicology and Chemistry **20**(8): 1792-1797.
- Guénette, S. and Pitcher, T. J. (1999). "An age-structured model showing the benefits of marine reserves in controlling overexploitation." Fisheries Research **39**(3): 295-303.
- Gust, M. (2010). "Développement et faisabilité de marqueurs de la perturbation endocrinienne chez des Gastropodes d'eau douce : *Potamopyrgus antipodarum* et *Valvata piscinalis*. Application au laboratoire et au terrain." , Université de Metz.
- Gust, M., Buronfosse, T., André, C., Mons, R., Gagné, F. and Garric, J. (2011a). "Is exposure temperature a confounding factor for the assessment of reproductive parameters of New Zealand mudsnails *Potamopyrgus antipodarum* (Gray)?" Aquatic Toxicology **101**(2): 396-404.
- Gust, M., Buronfosse, T., Geffard, O., Coquery, M., Mons, R., Abbaci, K., Giamberini, L. and Garric, J. (2011b). "Comprehensive biological effects of a complex field poly-metallic pollution gradient on the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray)." Aquatic Toxicology **101**(1): 100-108.
- Gust, M., Buronfosse, T., Geffard, O., Mons, R., Queau, H., Mouthon, J. and Garric, J. (2010a). "In situ biomonitoring of freshwater quality using the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray) exposed to waste water treatment plant (WWTP) effluent discharges." Water Research **44**(15): 4517-4528.

- Gust, M., Buronfosse, T., Giamberini, L., Ramil, M., Mons, R. and Garric, J. (2009). "Effects of fluoxetine on the reproduction of two prosobranch mollusks: *Potamopyrgus antipodarum* and *Valvata piscinalis*." Environmental Pollution **157**(2): 423-429.
- Gust, M., Garric, J., Giamberini, L., Mons, R., Abbaci, K., Garnier, F. and Buronfosse, T. (2010b). "Sensitivity of New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray) to a specific aromatase inhibitor." Chemosphere **79**(1): 47-53.
- Gust, M., Mouthon, J., Queau, H., Dussart, C., Buronfosse, T. and Garric, J. (2011c). "Natural variability and response interpretation of fecundity, vertebrate-like sex-steroid levels and energy status in the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray)." General and Comparative Endocrinology **172**(2): 243-250.
- Haeba, M. H., Hilscherová, K., Mazurová, E. and Bláha, L. (2008). "Selected endocrine disrupting compounds (Vinclozolin, Flutamide, Ketoconazole and Dicofol): Effects on survival, occurrence of males, growth, molting and reproduction of *Daphnia magna*." Environmental Science and Pollution Research **15**(3): 222-227.
- Hagger, J. A., Jones, M. B., Leonard, D. R., Owen, R. and Galloway, T. S. (2006). "Biomarkers and integrated environmental risk assessment: are there more questions than answers?" Integrated Environmental Assessment and Management **2**(4): 312-329.
- Hagger, J. A., Jones, M. B., Lowe, D., Leonard, D. R. P., Owen, R. and Galloway, T. S. (2008). "Application of biomarkers for improving risk assessments of chemicals under the Water Framework Directive: A case study." Marine Pollution Bulletin **56**(6): 1111-1118.
- Hagger, J. A., Lowe, D., Dissanayake, A., Jones, M. B. and Galloway, T. S. (2010). "The influence of seasonality on biomarker responses in *Mytilus edulis*." Ecotoxicology **19**(5): 953-962.
- Hansen, F. T., Forbes, V. E. and Forbes, T. L. (1999a). "Effects of 4-n-nonylphenol on life-history traits and population dynamics of a polychaete." Ecological Applications **9**(2): 482-495.
- Hansen, J. A., Woodward, D. F., Little, E. E., Delonay, A. J. and Bergman, H. L. (1999b). "Behavioral avoidance: Possible mechanism for explaining abundance and distribution of trout species in a metal-impacted river." Environmental Toxicology and Chemistry **18**(2): 313-317.
- Hanski, I. (1994). "A practical model of metapopulation dynamics." Journal of Animal Ecology **63**(1): 151-162.
- Hanski, I. and Thomas, C. D. (1994). "Metapopulation dynamics and conservation: A spatially explicit model applied to butterflies." Biological Conservation **68**(2): 167-180.
- Hanson, N. (2009a). "Population level effects of reduced fecundity in the fish species perch (*Perca fluviatilis*) and the implications for environmental monitoring." Ecological Modelling **220**(17): 2051-2059.
- Hanson, N. (2009b). "Utility of biomarkers in fish for environmental monitoring." Integrated Environmental Assessment and Management **5**(1): 180-181.
- Hanson, N. (2011a). "Population Modeling of the Fish Species Roach (*Rutilus rutilus*) to Investigate How Latitudinal Variations in Life History Traits Affect the Sensitivity to Anthropogenic Stress." Environmental Modeling and Assessment 1-11.
- Hanson, N. (2011b). "Using biological data from field studies with multiple reference sites as a basis for environmental management: The risks for false positives and false negatives." Journal of Environmental Management **92**(3): 610-619.



- Hanson, N., Åberg, P. and Sundelöf, A. (2005). "Population-level effects of male-biased broods in eelpout (*Zoarces viviparus*)." Environmental Toxicology and Chemistry **24**(5): 1235-1241.
- Hanson, N., Förlin, L. and Larsson, Å. (2009). "Evaluation of long-term biomarker data from perch (*Perca fluviatilis*) in the Baltic Sea suggests increasing exposure to environmental pollutants." Environmental Toxicology and Chemistry **28**(2): 364-373.
- Hanson, N., Förlin, L. and Larsson, Å. (2010). "Spatial and annual variation to define the normal range of biological endpoints: An example with biomarkers in perch." Environmental Toxicology and Chemistry **29**(11): 2616-2624.
- Hanson, N. and Larsson, Å. (2009). "Experiences from a biomarker study on farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) used for environmental monitoring in a Swedish river." Environmental Toxicology and Chemistry **28**(7): 1536-1545.
- Hanson, N. and Larsson, Å. (2011). "Biomarker analyses in caged and wild fish suggest exposure to pollutants in an urban area with a landfill." Environmental Toxicology **26**(3): 315-324.
- Hanson, N. and Stark, J. D. (2011). "A comparison of simple and complex population models to reduce uncertainty in ecological risk assessments of chemicals: example with three species of *Daphnia*." Ecotoxicology 1-9.
- Hargeby, A. and Petersen Jr, R. C. (1988). "Effects of low pH and humus on the survivorship, growth and feeding of *Gammarus pulex* (L.) (Amphipoda)." Freshwater Biology **19**(2): 235-247.
- Hayashi, T. I., Kamo, M. and Tanaka, Y. (2009). "Population-level ecological effect assessment: Estimating the effect of toxic chemicals on density-dependent populations." Ecological Research **24**(5): 945-954.
- Hayes, E. H. and Landis, W. G. (2004). "Regional ecological risk assessment of a near shore marine environment: Cherry Point, WA." Human and Ecological Risk Assessment **10**(2): 299-325.
- Haynes, A., Taylor, B. J. R. and Varley, M. E. (1985). "The influence of the mobility of *Potamopyrgus jenkinsi* (Smith, E. A.) (Prosobranchia: Hydrobiidae) on its spread". Schweizerbart.
- Heywood, J. and Edwards, R. W. (1962). "Some Aspects of the Ecology of *Potamopyrgus jenkinsi* Smith." Journal of Animal Ecology **31**(2): 239-250.
- Hickey, C. W. and Clements, W. H. (1998). "Effects of heavy metals on benthic macroinvertebrate communities in New Zealand streams." Environmental Toxicology and Chemistry **17**(11): 2338-2346.
- Hickie, B. E., Muir, D. C. G., Addison, R. F. and Hoekstra, P. F. (2005). "Development and application of bioaccumulation models to assess persistent organic pollutant temporal trends in arctic ringed seal (*Phoca hispida*) populations." Science of the Total Environment **351-352**(413-426).
- Hommen, U., Baveco, J. M., Galic, N. and van den Brink, P. J. (2010). "Potential application of ecological models in the european environmental risk assessment of chemicals I: Review of protection goals in EU directives and regulations." Integrated Environmental Assessment and Management **6**(3): 325-337.
- Huggett, R. J., Kimerle, R. A., Mehrle, P. M. J. and Bergman, H. L. (2002). "Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress". Lewis.

- 
- Huth, A. and Tietjen, B. (2007). "Management strategies for tropical rain forests: Results of ecological models and requirements for ecological-economic modelling." Ecological Economics **62**(2): 207-215.
- Hylleberg, J. and Siegismund, H. R. (1987). "Niche overlap in mud snails (*hydrobiidae*): freezing tolerance." Marine Biology **94**(3): 403-407.
- Hyne, R. V. (2011). "Review of the reproductive biology of amphipods and their endocrine regulation: Identification of mechanistic pathways for reproductive toxicants." Environmental Toxicology and Chemistry **30**(12): 2647-2657.
- Issartel, J., Boulo, V., Wallon, S., Geffard, O. and Charmantier, G. (2010). "Cellular and molecular osmoregulatory responses to cadmium exposure in *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda)." Chemosphere **81**(6): 701-710.
- Ivanković, D., Pavičić, J., Erk, M., Filipović-Marijić, V. and Raspor, B. (2005). "Evaluation of the *Mytilus galloprovincialis* Lam. digestive gland metallothionein as a biomarker in a long-term field study: Seasonal and spatial variability." Marine Pollution Bulletin **50**(11): 1303-1313.
- Iwasaki, Y., Hayashi, T. I. and Kamo, M. (2010). "Comparison of population-level effects of heavy metals on fathead minnow (*Pimephales promelas*)." Ecotoxicology and Environmental Safety **73**(4): 465-471.
- Jacobsen, R. and Forbes, V. E. (1997). "Clonal variation in life-history traits and feeding rates in the gastropod, *Potamopyrgus antipodarum*: Performance across a salinity gradient." Functional Ecology **11**(2): 260-267.
- Janetzky, W. (1994). "Distribution of the genus *Gammarus* (Amphipoda: Gammaridae) in the River Hunte and its tributaries (Lower Saxony, northern Germany)." Hydrobiologia **294**(23-34).
- Jaworska, J. S., Rose, K. A. and Brenkert, A. L. (1997). "Individual-based modeling of PCBs effects on young-of-the-year largemouth bass in southeastern USA reservoirs." Ecological Modelling **99**(2-3): 113-135.
- Jemec, A., Drobne, D., Tišler, T. and Sepčić, K. (2010). "Biochemical biomarkers in environmental studies-lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species." Environmental Science and Pollution Research **17**(3): 571-581.
- Jensen, A., Forbes, V. E. and Parker Jr, E. D. (2001). "Variation in cadmium uptake, feeding rate, and life-history effects in the gastropod *Potamopyrgus antipodarum*: Linking toxicant effects on individuals to the population level." Environmental Toxicology and Chemistry **20**(11): 2503-2513.
- Ji, Y., Lu, G., Wang, C., Song, W. and Wu, H. (2010). "Fish transplantation and stress-related biomarkers as useful tools for assessing water quality." Journal of Environmental Sciences **22**(11): 1826-1832.
- Jobling, S., Casey, D., Rogers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., Baunbeck, T., Turner, A. P. and Tyler, C. R. (2004). "Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent." Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands) **66**(2): 207-222.
- Johnson, D. H. (1999). "The insignificance of statistical significance testing." Journal of Wildlife Management **63**(3): 763-772.
-

- Jubeaux, G., Chaumot, A., Coulaud, R., Techer, R. and Geffard, O. (in prep). "Reproductive toxicity assessment with the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835) by laboratory and field surveys."
- Jubeaux, G., Salvador, A., Simon, R., Quéau, H., Chaumot, A. and Geffard, O. (submitted). "Vitellogenin-like proteins in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): functional characterization throughout reproductive process, potential for use as an indicator of oocyte quality and endocrine disruption biomarker in males. ." Aquatic Toxicology
- Kalman, J., Buffet, P. E., Amiard, J. C., Denis, F., Mouneyrac, C. and Amiard-Triquet, C. (2010). "Assessment of the influence of confounding factors (weight, salinity) on the response of biomarkers in the estuarine polychaete *Nereis diversicolor*." Biomarkers **15**(5): 461-469.
- Karaman, G. S. and Pinkster, S. (1987). "Freshwater *Gammarus* species from Europe, North Africa and adjacent regions of Asia (Crustacea-Amphipoda)". Artis Library Committee.
- Kater, B. J., Postma, J. F., Dubbeldam, M. and Prins, J. T. H. J. (2001). "Comparison of laboratory and *in situ* sediment bioassays using *Corophium volutator*." Environmental Toxicology and Chemistry **20**(6): 1291-1295.
- Kerans, B. L., Dybdahl, M. F., Gangloff, M. M. and Jannot, J. E. (2005). "Potamopyrgus antipodarum: Distribution, density, and effects on native macroinvertebrate assemblages in the Greater Yellowstone Ecosystem." Journal of the North American Benthological Society **24**(1): 123-138.
- Kestrup, Å. and Ricciardi, A. (2010). "Influence of conductivity on life history traits of exotic and native amphipods in the St. Lawrence River." Fundamental and Applied Limnology **176**(3): 249-262.
- Kevrekidis, T., Kourakos, G. and Boubonari, T. (2009). "Life history, reproduction, growth, population dynamics and production of *Gammarus aequicauda* (Crustacea: Amphipoda) at extremely low salinities in a mediterranean lagoon." International Review of Hydrobiology **94**(3): 308-325.
- Khan, F. R., Irving, J. R., Bury, N. R. and Hogstrand, C. (2011). "Differential tolerance of two *Gammarus pulex* populations transplanted from different metallogenic regions to a polymetal gradient." Aquatic Toxicology **102**(1-2): 95-103.
- Klobučar, G. I. V., Štambuk, A., Pavlica, M., Sertić Perić, M., Kutuzović Hackenberger, B. and Hylland, K. (2010). "Genotoxicity monitoring of freshwater environments using caged carp (*Cyprinus carpio*)." Ecotoxicology **19**(1): 77-84.
- Klok, C. and De Roos, A. M. (1996). "Population level consequences of toxicological influences on individual growth and reproduction in *Lumbricus rubellus* (Lumbricidae, Oligochaeta)." Ecotoxicology and Environmental Safety **33**(2): 118-127.
- Klok, C., Holmstrup, M. and Damgaard, C. (2007). "Extending a combined dynamic energy budget matrix population model with a Bayesian approach to assess variation in the intrinsic rate of population increase. An example in the earthworm *Dendrobaena octaedra*." Environmental Toxicology and Chemistry **26**(11): 2383-2388.
- Klok, C., Van Der Hout, A. and Bodt, J. (2006). "Population growth and development of the earthworm *Lumbricus rubellus* in a polluted field soil: Possible consequences for the godwit (*Limosa limosa*)." Environmental Toxicology and Chemistry **25**(1): 213-219.
- Kooijman, S. A. L. M. (2000). "Dynamic energy and mass budgets in biological systems". Cambridge University Press.

- Kooijman, S. A. L. M. and 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. and Metz, J. A. J. (1984). "On the dynamics of chemically stressed populations: The deduction of population consequences from effects on individuals." Ecotoxicology and Environmental Safety **8**(3): 254-274.
- Korpinen, S., Karjalainen, M. and Viitasalo, M. (2006). "Effects of cyanobacteria on survival and reproduction of the littoral crustacean *Gammarus zaddachi* (Amphipoda)." Hydrobiologia **559**(1): 285-295.
- Kramer, V. J., Etterson, M. A., Hecker, M., Murphy, C. A., Roesijadi, G., Spade, D. J., Spromberg, J. A., Wang, M. and Ankley, G. T. (2011). "Adverse outcome pathways and ecological risk assessment: Bridging to population-level effects." Environmental Toxicology and Chemistry **30**(1): 64-76.
- Krell, B., Moreira-Santos, M. and Ribeiro, R. (2011). "An estuarine mudsnail *in situ* toxicity assay based on postexposure feeding." Environmental Toxicology and Chemistry **30**(8): 1935-1942.
- Kuhn, A., Munns Jr, W. R., Serbst, J., Edwards, P., Cantwell, M. G., Gleason, T., Pelletier, M. C. and Berry, W. (2002). "Evaluating the ecological significance of laboratory response data to predict population-level effects for the estuarine amphipod *Ampelisca abdita*." Environmental Toxicology and Chemistry **21**(4): 865-874.
- Kuhn, A., Munns W.R, Jr., Poucher, S., Champlin, D. and Lussier, S. (2000). "Prediction of population-level response from mysid toxicity test data using population modeling techniques." Environmental Toxicology and Chemistry **19**(9): 2364-2371.
- Kuhn, K. and Streit, B. (1994). "Detecting sublethal effects of organophosphates by measuring acetylcholinesterase activity in *Gammarus*." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **53**(3): 398-404.
- Kunz, P. Y., Kienle, C. and Gerhardt, A. (2010). *Gammarus* spp. in aquatic ecotoxicology and water quality assessment: Toward integrated multilevel tests. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. **205**: 1-76.
- Lacaze, E. (2011). "Un biomarqueur de génotoxicité chez *Gammarus fossarum* : développement, signification fonctionnelle et application au milieu naturel." Université de Metz.
- Lacaze, E., Devaux, A., Jubeaux, G., Mons, R., Gardette, M., Bony, S., Garric, J. and Geffard, O. (2011a). "DNA damage in *Gammarus fossarum* sperm as a biomarker of genotoxic pressure: Intrinsic variability and reference level." Science of The Total Environment **409**(17): 3230-3236.
- Lacaze, E., Devaux, A., Mons, R., Bony, S., Garric, J., Geffard, A. and Geffard, O. (2011b). "DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: A tool for freshwater genotoxicity assessment." Environmental Pollution **159**(6): 1682-1691.
- Lacaze, E., Geffard, O., Bony, S. and Devaux, A. (2010). "Genotoxicity assessment in the amphipod *Gammarus fossarum* by use of the alkaline Comet assay." Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis **700**(1-2): 32-38.
- Lacaze, E., Geffard, O., Goyet, D., Bony, S. and Devaux, A. (2011c). "Linking genotoxic responses in *Gammarus fossarum* germ cells with reproduction impairment, using the Comet assay." Environmental Research **111**(5): 626-634.

- Ladewig, V., Jungmann, D., Köhler, H. R., Schirling, M., Triebkorn, R. and Nagel, R. (2006). "Population structure and dynamics of *Gammarus fossarum* (Amphipoda) upstream and downstream from effluents of sewage treatment plants." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **50**(3): 370-383.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J. C. and Ramade, F. (1997). "Biomarqueurs en écotoxicologie: aspects fondamentaux". Masson.
- Lance, E., Briant, L., Carpentier, A., Acou, A., Marion, L., Bormans, M. and Gérard, C. (2010). "Impact of toxic cyanobacteria on gastropods and microcystin accumulation in a eutrophic lake (Grand-Lieu, France) with special reference to *Physa* (= *Physella*) *acuta*." Science of the Total Environment **408**(17): 3560-3568.
- Lance, E., Bugajny, E., Bormans, M. and Gérard, C. (2008). "Consumption of toxic cyanobacteria by *Potamopyrgus antipodarum* (Gastropoda, Prosobranchia) and consequences on life traits and microcystin accumulation." Harmful Algae **7**(4): 464-472.
- Landis, W. G. (2006). "Population-scale assessment endpoints in ecological risk assessment. Part 1: Reflections of stakeholder values." Integrated Environmental Assessment and Management **2**(1): 86-91.
- Landis, W. G. and Kaminski, L. A. (2007). "Population-scale assessment endpoints in ecological risk assessment part II: selection of assessment endpoint attributes." Integrated environmental assessment and management **3**(3): 450-457.
- Lange, U., Saborowski, R., Siebers, D., Buchholz, F. and Karbe, L. (1998). "Temperature as a key factor determining the regional variability of the xenobiotic-inducible ethoxyresorufin-O-deethylase activity in the liver of dab (*Limanda limanda*)." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **55**(2): 328-338.
- Lasier, P. J., Winger, P. V. and Hardin, I. R. (2006). "Effects of hardness and alkalinity in culture and test waters on reproduction of *Ceriodaphnia dubia*." Environmental Toxicology and Chemistry **25**(10): 2781-2786.
- Lau, P. S., Wong, H. L. and Garrigues, P. (2004). "Seasonal variation in antioxidative responses and acetylcholinesterase activity in *Perna viridis* in eastern oceanic and western estuarine waters of Hong Kong." Continental Shelf Research **24**(16): 1969-1987.
- Lebreton, J. D. and Gonzales-Davila, G. (1993). "Introduction to models of subdivided populations." Journal of Biological Systems **1**(389-423).
- Lebrun, J. D., Perret, M., Uher, E., Tusseau-Vuillemin, M. H. and Gourlay-Francé, C. (2011). "Waterborne nickel bioaccumulation in *Gammarus pulex*: Comparison of mechanistic models and influence of water cationic composition." Aquatic Toxicology **104**(3-4): 161-167.
- Lefkovich, L. P. (1965). "The study of population growth in organisms grouped by stages." Biometrics **21**(1-18).
- Leiniö, S. and Lehtonen, K. K. (2005). "Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **140**(3-4): 408-421.
- Leroy, D., Haubruge, E., De Pauw, E., Thomé, J. P. and Francis, F. (2010). "Development of ecotoxicoproteomics on the freshwater amphipod *Gammarus pulex*: Identification of PCB biomarkers in glycolysis and glutamate pathways." Ecotoxicology and Environmental Safety **73**(3): 343-352.

- 
- 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**(3/4): 213-245.
- Lettni, S. E. and Sukhdeo, M. V. K. (2010). "The energetic cost of parasitism in isopods." Ecoscience **17**(1): 1-8.
- Leung, K. M. Y., Svavarsson, J., Crane, M. and Morritt, D. (2002). "Influence of static and fluctuating salinity on cadmium uptake and metallothionein expression by the dogwhelk *Nucella lapillus* (L.)." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **274**(2): 175-189.
- Leung, K. M. Y., Taylor, A. C. and Furness, R. W. (2000). "Temperature-dependent physiological responses of the dogwhelk *Nucella lapillus* to cadmium exposure." Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom **80**(4): 647-660.
- Levin, L., Caswell, H., Bridges, T., Dibacco, C., Cabrera, D. and Plaia, G. (1996). "Demographic responses of estuarine polychaetes to pollutants: life table response experiments." Ecological Applications **6**(4): 1295-1313.
- Lewis, C. and Galloway, T. (2009). "Reproductive consequences of paternal genotoxin exposure in marine invertebrates." Environmental Science and Technology **43**(3): 928-933.
- Liao, C. M., Chiang, K. C. and Tsai, J. W. (2006). "Bioenergetics-based matrix population modeling enhances life-cycle toxicity assessment of tilapia *Oreochromis mossambicus* exposed to arsenic." Environmental Toxicology **21**(2): 154-165.
- Liao, C. M. and Yeh, C. H. (2007). "Hard clam *Meretrix lusoria* to Hg-stressed birnavirus susceptibility revealed through stage-structured disease transmission dynamics." Aquaculture **264**(1-4): 101-118.
- Liber, K., Goodfellow, W., den Besten, P., Clements, W., Galloway, T., Gerhardt, A., Green, A. and Simpson, S. (2007). "In situ-based effects measures: considerations for improving methods and approaches." Integrated environmental assessment and management **3**(2): 246-258.
- Liess, M. and Schulz, R. (1999). "Linking insecticide contamination and population response in an agricultural stream." Environmental Toxicology and Chemistry **18**(9): 1948-1955.
- Lin, B.-L. and Meng, Y. (2009). "Extrapolation of available acute and chronic toxicity test data to population-level effects for ecological risk management of chemicals." Environmental Toxicology and Chemistry **28**(7): 1557-1566.
- Lin, B. L., Tokai, A. and Nakanishi, J. (2005). "Approaches for establishing predicted-no-effect concentrations for population-level ecological risk assessment in the context of chemical substances management." Environmental Science and Technology **39**(13): 4833-4840.
- Livingstone, D. R., Mitchelmore, C. L., Peters, L. D., O'Hara, S. C. M., Shaw, J. P., Chesman, B. S., Doyotte, A., McEvoy, J., Ronisz, D., Larsson, D. G. J. and Förlin, L. (2000). "Development of hepatic CYP1A and blood vitellogenin in eel (*Anguilla anguilla*) for use as biomarkers in the Thames Estuary, UK." Marine Environmental Research **50**(1-5): 367-371.
- Logofet, D. O. and Denisenko, E. A. (1999). "Principles of modelling vegetation dynamics with regard to climate changes." Zhurnal Obshchei Biologii **60**(5): 540-542.
- Lomnicki, A. (1999). "Individual-based models and the individual-based approach to population ecology." Ecological Modelling **115**(2-3): 191-198.
-

- Lopes, C., Péry, A. R. R., Chaumot, A. and Charles, S. (2005). "Ecotoxicology and population dynamics: Using DEBtox models in a Leslie modeling approach." Ecological Modelling **188**(1): 30-40.
- Lozano, S. J., Gedeon, M. L. and Landrum, P. F. (2003). "The effects of temperature and organism size on the feeding rate and modeled chemical accumulation in *Diporeia sp.* for Lake Michigan sediments." Journal of Great Lakes Research **29**(1): 79-88.
- Lundström, E., Björlenius, B., Brinkmann, M., Hollert, H., Persson, J.-O. and Breitholtz, M. (2010). "Comparison of six sewage effluents treated with different treatment technologies--Population level responses in the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*." Aquatic Toxicology **96**(4): 298-307.
- Macedo-Sousa, J. A., Pestana, J. L. T., Gerhardt, A., Nogueira, A. J. A. and Soares, A. M. V. M. (2007). "Behavioural and feeding responses of *Echinogammarus meridionalis* (Crustacea, Amphipoda) to acid mine drainage." Chemosphere **67**(8): 1663-1670.
- Macneil, C., Dick, J. T. A. and Elwood, R. W. (1997). "The trophic ecology of freshwater *Gammarus sp.* (Crustacea: Amphipoda): Problems and perspectives concerning the functional feeding group concept." Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society **72**(3): 349-364.
- MacNeil, C., Elwood, R. W. and Dick, J. T. A. (2000). "Factors influencing the importance of *Gammarus sp.* (Crustacea: Amphipoda) in riverine salmonid diets." Archiv fur Hydrobiologie **149**(1): 87-107.
- Madenjian, C. P., Carpenter, S. R., Eck, G. W. and Miller, M. A. (1993). "Accumulation of PCBs by lake trout (*Salvelinus namaycush*): an individual-based model approach." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **50**(1): 97-109.
- Magni, P., De Falco, G., Falugi, C., Franzoni, M., Monteverde, M., Perrone, E., Sgro, M. and Bolognesi, C. (2006). "Genotoxicity biomarkers and acetylcholinesterase activity in natural populations of *Mytilus galloprovincialis* along a pollution gradient in the Gulf of Oristano (Sardinia, western Mediterranean)." Environmental Pollution **142**(1): 65-72.
- Maitland, P. S. (1966). "Notes on the biology of *Gammarus pulex* in the river Endrick." Hydrobiologia **28**(142-152).
- Malbouisson, J. F. C., Young, T. W. K. and Bark, A. W. (1995). "Use of feeding rate and re-pairing of precopulatory *Gammarus pulex* to assess toxicity of gamma-hexa chlorocyclohexane (Lindane)." Chemosphere **30**(8): 1573-1583.
- Maltby, L. (1994). "Stress, shredders and streams: Using *Gammarus* energetics to assess water quality." in *Water Quality and Stress Indicators in Marine and Freshwater Systems: Linking Levels of Organisation*,
- Maltby, L. (1995). "Sensitivity of the Crustaceans *Gammarus pulex* (L.) and *Asellus aquaticus* (L.) to short-term exposure to hypoxia and unionized ammonia: Observations and possible mechanisms." Water Research **29**(3): 781-787.
- Maltby, L. (1999). "Studying stress: The importance of organism-level responses." Ecological Applications **9**(2): 431-440.
- Maltby, L., Clayton, S. A., Wood, R. M. and McLoughlin, N. (2002). "Evaluation of the *Gammarus pulex in situ* feeding assay as a biomonitor of water quality: Robustness, responsiveness, and relevance." Environmental Toxicology and Chemistry **21**(2): 361-368.

- 
- Maltby, L. and Crane, M. (1994). "Responses of *Gammarus pulex* (Amphipoda, crustacea) to metalliferous effluents: Identification of toxic components and the importance of interpopulation variation." Environmental Pollution **84**(1): 45-52.
- Maltby, L. and Naylor, C. (1990). "Preliminary observations on the ecological relevance of the *Gammarus* 'scope for growth' assay: effect of zinc on reproduction." Functional Ecology **4**(3): 393-397.
- Maltby, L., Naylor, C. and Calow, P. (1990a). "Effect of stress on a freshwater benthic detritivore: Scope for growth in *Gammarus pulex*." Ecotoxicology and Environmental Safety **19**(3): 285-291.
- Maltby, L., Naylor, C. and Calow, P. (1990b). "Field deployment of a scope for growth assay involving *Gammarus pulex*, a freshwater benthic invertebrate." Ecotoxicology and Environmental Safety **19**(3): 292-300.
- Manyin, T. and Rowe, C. L. (2008). "Modeling effects of cadmium on population growth of *Palaemonetes pugio*: Results of a full life cycle exposure." Aquatic Toxicology **88**(2): 111-120.
- Maranhão, P. and Marques, J. C. (2003). "The influence of temperature and salinity on the duration of embryonic development, fecundity and growth of the amphipod *Echinogammarus marinus* Leach (Gammaridae)." Acta Oecologica **24**(1): 5-13.
- Martell, S. J. D., Pine Iii, W. E. and Walters, C. J. (2008). "Parameterizing age-structured models from a fisheries management perspective." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **65**(8): 1586-1600.
- Martín-Díaz, M. L., Sales, D. and Del Valls Casillas, T. Á. (2004). "Influence of salinity in hemolymph vitellogenin of the shore crab *Carcinus maenas*, to be used as a biomarker of contamination." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **73**(5): 870-877.
- Martin, A. L. (1965). "The histochemistry of the moulting cycle in *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda)." Proceedings of the Zoological Society of London **147**(2): 185-200.
- Martin, J. W. and Davis, G. E. (2001). "An updated classification of the recent crustacea". Natural History Museum of Los Angeles County.
- Massarin, S. (2010). "Etude des effets de l'uranium sur le budget énergétique et la dynamique de population de *Daphnia magna*." Université Aix-Marseille II - Université de la méditerranée.
- Matthiessen, P. (2008). "An assessment of endocrine disruption in Mollusks and the potential for developing internationally standardized mollusk life cycle test guidelines." Integrated Environmental Assessment and Management **4**(3): 274-284.
- Matthiessen, P., Sheahan, D., Harrison, R., Kirby, M., Rycroft, R., Turnbull, A., Volkner, C. and Williams, R. (1995). "Use of a *Gammarus pulex* bioassay to measure the effects of transient carbofuran runoff from farmland." Ecotoxicology and Environmental Safety **30**(2): 111-119.
- Maund, S. J., Taylor, E. J. and Pascoe, D. (1992). "Population responses of the freshwater amphipod crustacean *Gammarus pulex* (L.) to copper." Freshwater Biology **28**(1): 29-36.
- Mazurová, E., Hilscherová, K., Jálová, V., Köhler, H. R., Triebkorn, R., Giesy, J. P. and Bláha, L. (2008). "Endocrine effects of contaminated sediments on the freshwater snail *Potamopyrgus antipodarum* *in vivo* and in the cell bioassays *in vitro*." Aquatic Toxicology **89**(3): 172-179.
-



- Mazurová, E., Hilscherová, K., Šídlová-Štěpánková, T., Köhler, H., Triebkorn, R., Jungmann, D., Giesy, J. P. and Bláha, L. (2010). "Chronic toxicity of contaminated sediments on reproduction and histopathology of the crustacean *Gammarus fossarum* and relationship with the chemical contamination and *in vitro* effects." Journal of Soils and Sediments **10**(3): 423-433.
- McCahon, C. P., Brown, A. F. and Pascoe, D. (1988). "The effect of the acanthocephalan *Pomphorhynchus laevis* (Muller 1776) on the acute toxicity of cadmium to its intermediate host, the amphipod *Gammarus pulex* (L.)." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **17**(2): 239-243.
- McCahon, C. P. and Pascoe, D. (1988). "Culture techniques for three freshwater macroinvertebrate species and their use in toxicity tests." Chemosphere **17**(2471-2480).
- McCarthy, J. F. and Shugart, L. R. (1990). "Biomarkers of environmental contamination".
- McLoughlin, N., Yin, D., Maltby, L., Wood, R. M. and Yu, H. (2000). "Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers." Environmental Toxicology and Chemistry **19**(8): 2085-2092.
- Meijering, M. P. D. (1991). "Lack of oxygen and low pH as limiting factors for *Gammarus* in Hessian brooks and rivers." Hydrobiologia **223**(1): 159-169.
- Melvin, S. D., Munkittrick, K. R., Bosker, T. and Maclatchy, D. L. (2009). "Detectable effect size and bioassay power of mummichog (*Fundulus heteroclitus*) and fathead minnow (*Pimephales promelas*) adult reproductive tests." Environmental Toxicology and Chemistry **28**(11): 2416-2425.
- Menezes, S., Soares, A. M. V. M., Guilhermino, L. and R. Peck, M. (2006). "Biomarker responses of the estuarine brown shrimp *Crangon crangon* L. to non-toxic stressors: Temperature, salinity and handling stress effects." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **335**(1): 114-122.
- Meng, Y., Shi, L. and Shi, P. (2009). Deriving an ecological risk assessment criterion concentration for populations with seasonal variation: Reconsidering and improving the algorithm.
- Meyran, J.-C., Monnerot, M. and Taberlet, P. (1997). "Taxonomic Status and Phylogenetic Relationships of Some Species of the Genus *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda) Deduced from Mitochondrial DNA Sequences." Molecular Phylogenetics and Evolution **8**(1): 1-10.
- Meyran, J. C. (1997). "Impact of water calcium on the phenotypic diversity of alpine populations of *Gammarus fossarum*." Ecology **78**(5): 1579-1587.
- Michaut, P. (1968). "Données biologiques sur un Gastéropode Prosobranche récemment introduit en Côte-d'Or, *Potamopyrgus jenkinsi*." Hydrobiologia **32**(3): 513-527.
- Miller, D. H. and Ankley, G. T. (2004). "Modeling impacts on populations: Fathead minnow (*Pimephales promelas*) exposure to the endocrine disruptor 17 $\beta$ -trenbolone as a case study." Ecotoxicology and Environmental Safety **59**(1): 1-9.
- Miller, D. H., Jensen, K. M., Villeneuve, D. L., Kahl, M. D., Makynen, E. A., Durhan, E. J. and Ankley, G. T. (2007). "Linkage of biochemical responses to population-level effects: A case study with vitellogenin in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)." Environmental Toxicology and Chemistry **26**(3): 521-527.

- 
- Moe, S. J., Kristoffersen, A. B., Smith, R. H. and Stenseth, N. C. (2005). "From patterns to processes and back: Analysing density-dependent responses to an abiotic stressor by statistical and mechanistic modelling." Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences **272**(1577): 2133-2142.
- Moe, S. J., Stenseth, N. C. and Smith, R. H. (2002). "Density-dependent compensation in blowfly populations give indirectly positive effects of a toxicant." Ecology **83**(6): 1597-1603.
- Møller, V., Forbes, V. E. and Depledge, M. H. (1996). "Population responses to acute and chronic cadmium exposure in sexual and asexual estuarine gastropods." Ecotoxicology **5**(5): 313-326.
- Moreira, S. M., Moreira-Santos, M., Guilhermino, L. and Ribeiro, R. (2006). "An *in situ* postexposure feeding assay with *Carcinus maenas* for estuarine sediment-overlying water toxicity evaluations." Environmental Pollution **139**(2): 318-329.
- Morin, S., Duong, T. T., Dabrin, A., Coynel, A., Herlory, O., Baudrimont, M., Delmas, F., Durrieu, G., Schäfer, J., Winterton, P., Blanc, G. and Coste, M. (2008). "Long-term survey of heavy-metal pollution, biofilm contamination and diatom community structure in the Riou Mort watershed, South-West France." Environmental Pollution **151**(3): 532-542.
- Moser, T., Römbke, J., Schallnass, H. J. and Van Gestel, C. A. M. (2007). "The use of the multivariate Principal Response Curve (PRC) for community level analysis: A case study on the effects of carbendazim on enchytraeids in Terrestrial Model Ecosystems (TME)." Ecotoxicology **16**(8): 573-583.
- Mouneyrac, C., Amiard-Triquet, C., Amiard, J. C. and Rainbow, P. S. (2001). "Comparison of metallothionein concentrations and tissue distribution of trace metals in crabs (*Pachygrapsus marmoratus*) from a metal-rich estuary, in and out of the reproductive season." Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology **129**(3): 193-209.
- Mouthon, J. (1982). "Les mollusques ducicoles - Données biologiques et écologiques - Clés de détermination des principaux genres de Bivalves et de Gastéropodes de France". Bulletin Français de Pisciculture.
- Mouthon, J. (2001). "Life cycle and population dynamics of the asian clam *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculidae) in the Rhône river at Creys-Malville (France)". Schweizerbart.
- Mouthon, J. and Dubois, J. P. (2001). "Mollusc communities of the littoral zone of Annecy Lake (Savoie, France)." Les peuplements de mollusques de la zone littorale du lac d'Annecy (Savoie, France) **37**(4): 267-276.
- Munkittrick, K. R., Arens, C. J., Lowell, R. B. and Kaminski, G. P. (2009). "A review of potential methods of determining critical effect size for designing environmental monitoring programs." Environmental Toxicology and Chemistry **28**(7): 1361-1371.
- Munns Jr, W. R., Black, D. E., Gleason, T. R., Salomon, K., Bengtson, D. and Gutjahr-Gobell, R. (1997). "Evaluation of the effects of dioxin and PCBs on *Fundulus heteroclitus* populations using a modeling approach." Environmental Toxicology and Chemistry **16**(5): 1074-1081.
- Muysen, B. T. A., De Schampelaere, K. A. C. and Janssen, C. R. (2009). "Calcium accumulation and regulation in *Daphnia magna*: Links with feeding, growth and reproduction." Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology **152**(1): 53-57.
- Nakamaru, M., Iwasa, Y. and Nakanishi, J. (2002). "Extinction risk to herring gull populations from DDT exposure." Environmental Toxicology and Chemistry **21**(1): 195-202.
-

- Nakamaru, M., Iwasa, Y. and Nakanishi, J. (2003). "Extinction risk to bird populations caused by DDT exposure." Chemosphere **53**(4): 377-387.
- Naylor, C., Maltby, L. and Calow, P. (1989). "Scope for growth in *Gammarus pulex*, a freshwater benthic detritivore." Hydrobiologia **188-189**(1): 517-523.
- Nebeker, A. V., Griffis, W. L., Wise, C. M., Hopkins, E. and Barbitta, J. A. (1989). "Survival, reproduction and bioconcentration in invertebrates and fish exposed to hexachlorobenzene." Environmental Toxicology and Chemistry **8**(7): 601-611.
- Neiman, M., Jokela, J. and Lively, C. M. (2005). "Variation in asexual lineage age in *Potamopyrgus antipodarum*, a New Zealand snail." Evolution **59**(9): 1945-1952.
- Nelder, J. A. and Wedderburn, R. W. M. (1972). "Generalized Linear Models." Journal of the Royal Statistical Society. Series A (General) **135**(3): 370-384.
- Nélieu, S., Bonnemoy, F., Bonnet, J. L., Lefeuvre, L., Baudiffier, D., Heydorff, M., Quéméneur, A., Azam, D., Ducrot, P. H., Lagadic, L., Bohatier, J. and Einhorn, J. (2010). "Ecotoxicological effects of diuron and chlorotoluron nitrate-induced photodegradation products: Monospecific and aquatic mesocosm-integrated studies." Environmental Toxicology and Chemistry **29**(12): 2644-2652.
- Nentwig, G. (2007). "Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part II: The antidepressant drug fluoxetine." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **52**(2): 163-170.
- Neuparth, T., Costa, F. O. and Costa, M. H. (2002). "Effects of temperature and salinity on life history of the marine amphipod *Gammarus locusta*. Implications for ecotoxicological testing." Ecotoxicology **11**(1): 61-73.
- Newman, M. C. and Clements, W. H. (2008). "Ecotoxicology: a comprehensive treatment". CRC Press.
- Niehoff, B. (2007). "Life history strategies in zooplankton communities: The significance of female gonad morphology and maturation types for the reproductive biology of marine calanoid copepods." Progress in Oceanography **74**(1): 1-47.
- Nigro, M., Falleni, A., Barga, I. D., Scarcelli, V., Lucchesi, P., Regoli, F. and Frenzilli, G. (2006). "Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: Transplanted versus native mussels." Aquatic Toxicology **77**(4): 339-347.
- Nilsson, L. M. (1974). "Energy budget of a laboratory population of *Gammarus pulex* (Amphipoda)." Oikos **25**(1): 35-42.
- Nørum, U., Friberg, N., Jensen, M. R., Pedersen, J. M. and Bjerregaard, P. (2010). "Behavioural changes in three species of freshwater macroinvertebrates exposed to the pyrethroid lambda-cyhalothrin: Laboratory and stream microcosm studies." Aquatic Toxicology **98**(4): 328-335.
- OECD (2010). "Detailed Review Paper (DRP) on Molluscs Life-Cycle Toxicity Testing. (OECD Series on Testing and Assessment No 121)." Paris: Organization for Economic Co-operation and Development
- Oetken, M., Nentwig, G., Löffler, D., Ternes, T. and Oehlmann, J. (2005). "Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part I. The antiepileptic drug carbamazepine." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **49**(3): 353-361.
- Oikari, A. (2006). "Caging techniques for field exposures of fish to chemical contaminants." Aquatic Toxicology **78**(4): 370-381.

- 
- Oplinger, R. W., Brown, P. and Wagner, E. J. (2009). "Effect of sodium chloride, tricaine methanesulfonate, and light on New Zealand mud snail behavior, survival of snails defecated from rainbow trout, and effects of Epsom salt on snail Elimination rate." North American Journal of Aquaculture **71**(2): 157-164.
- Pacaud, A. (1945). "Les amphipodes de la faune nutritive des eaux douces françaises." Bulletin Français de Pisciculture **136**(105-119).
- Pacaud, A. (1952). "Nouvelle revue de la distribution géographique des gammarides dans les eaux continentales Françaises." Compte Rendu des Séances de la Société de Biogéographie **252**(95-111).
- Pascoe, D., Kedwards, T. J., Blockwell, S. J. and Taylor, E. J. (1995). "*Gammarus pulex* (L.) feeding bioassay - Effects of parasitism." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **55**(4): 629-632.
- Pastorok, R. A., Akçakaya, H. R., Regan, H., Ferson, S. and Bartell, S. M. (2003). "Role of ecological modeling in risk assessment." Human and Ecological Risk Assessment **9**(4): 939-972.
- Pedersen, S., Selck, H., Salvito, D. and Forbes, V. (2009). "Effects of the polycyclic musk HHCb on individual- and population-level endpoints in *Potamopyrgus antipodarum*." Ecotoxicology and Environmental Safety **72**(4): 1190-1199.
- Peeters, E. T. H. M. and Gardeniers, J. J. P. (1998). "Logistic regression as a tool for defining habitat requirements of two common gammarids." Freshwater Biology **39**(4): 605-615.
- Pereira, A. M. M., Soares, A. M. V. M., Gonçalves, F. and Ribeiro, R. (2000). "Water-Column, Sediment, and *in situ* Chronic Bioassays with Cladocerans." Ecotoxicology and Environmental Safety **47**(1): 27-38.
- Péry, A. R. R., Geffard, A. and Garric, J. (2006). "Mechanistic models to perform population risk assessment with the midge *Chironomus riparius*: Application to heavy metals." Environmental Science and Technology **40**(19): 6026-6031.
- Pestana, J. L. T., Alexander, A. C., Culp, J. M., Baird, D. J., Cessna, A. J. and Soares, A. M. V. M. (2009). "Structural and functional responses of benthic invertebrates to imidacloprid in outdoor stream mesocosms." Environmental Pollution **157**(8-9): 2328-2334.
- Pestana, J. L. T., Ré, A., Nogueira, A. J. A. and Soares, A. M. V. M. (2007). "Effects of Cadmium and Zinc on the feeding behaviour of two freshwater crustaceans: *Atyaephyra desmarestii* (Decapoda) and *Echinogammarus meridionalis* (Amphipoda)." Chemosphere **68**(8): 1556-1562.
- Pfeifer, S., Schiedek, D. and Dippner, J. W. (2005). "Effect of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus* sp. from the south-western Baltic Sea." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **320**(1): 93-103.
- Pisanelli, B., Benedetti, M., Fattorini, D. and Regoli, F. (2009). "Seasonal and inter-annual variability of DNA integrity in mussels *Mytilus galloprovincialis*: A possible role for natural fluctuations of trace metal concentrations and oxidative biomarkers." Chemosphere **77**(11): 1551-1557.
- Plénet, S. (1999). "Metal accumulation by an epigeal and a hypogean freshwater amphipod: Considerations for water quality assessment." Water Environment Research **71**(7): 1298-1309.
-

- Pöckl, M. (1992). "Effects of temperature, age and body size on moulting and growth in the freshwater amphipods *Gammarus fossarum* and *G. roeseli*." Freshwater Biology **27**(2): 211-225.
- Pöckl, M. (1993). "Reproductive potential and lifetime potential fecundity of the freshwater amphipods *Gammarus fossarum* and *G. roeseli* in Austrian streams and rivers." Freshwater Biology **30**(1): 73-91.
- Pöckl, M. (1995). "Laboratory studies on growth, feeding, moulting and mortality in the freshwater amphipods *Gammarus fossarum* and *G. roeseli*." Archiv für Hydrobiologie **134**(2): 223-253.
- Pöckl, M. (2007). "Strategies of a successful new invader in European fresh waters: Fecundity and reproductive potential of the Ponto-Caspian amphipod *Dikerogammarus villosus* in the Austrian Danube, compared with the indigenous *Gammarus fossarum* and *G. roeseli*." Freshwater Biology **52**(1): 50-63.
- Pöckl, M. and Humpesch, U. H. (1990). "Intra- and inter-specific variations in egg survival and brood development time for Austrian populations of *Gammarus fossarum* and *G. roeseli* (Crustacea: Amphipoda)." Freshwater Biology **23**(3): 441-455.
- Pöckl, M. and Timischl, W. (1990). "Comparative study of mathematical models for the relationship between water temperature and brood development time of *Gammarus fossarum* and *G. roeseli* (Crustacea: Amphipoda)." Freshwater Biology **23**(3): 433-440.
- Pöckl, M., Webb, B. W. and Sutcliffe, D. W. (2003). "Life history and reproductive capacity of *Gammarus fossarum* and *G. roeseli* (Crustacea: Amphipoda) under naturally fluctuating water temperatures: A simulation study." Freshwater Biology **48**(1): 53-66.
- Ponder, W. F. (1988). "Potamopyrgus antipodarum - A Molluscan coloniser of Europe and Australia." Journal of Molluscan Studies **54**(3): 271-285.
- Ponder, W. F. and Lindberg, D. R. (1997). "Towards a phylogeny of gastropod molluscs: An analysis using morphological characters." Zoological Journal of the Linnean Society **119**(2): 83-265.
- Prato, E., Biandolino, F. and Scardicchio, C. (2008). "Implications for toxicity tests with amphipod *Gammarus aequicauda*: Effects of temperature and salinity on life cycle." Environmental Technology **29**(12): 1349-1356.
- Prenter, J., MacNeil, C., Dick, J. T. A., Riddell, G. E. and Dunn, A. M. (2004). "Lethal and sublethal toxicity of ammonia to native, invasive, and parasitised freshwater amphipods." Water Research **38**(12): 2847-2850.
- Pretzsch, H., Biber, P. and Ďurský, J. (2002). "The single tree-based stand simulator SILVA: Construction, application and evaluation." Forest Ecology and Management **162**(1): 3-21.
- Preuss, T. G., Hammers-Wirtz, M., Hommen, U., Rubach, M. N. and Ratte, H. T. (2009a). "Development and validation of an individual based *Daphnia magna* population model: The influence of crowding on population dynamics." Ecological Modelling **220**(3): 310-329.
- Preuss, T. G., Hammers-Wirtz, M. and Ratte, H. T. (2010). "The potential of individual based population models to extrapolate effects measured at standardized test conditions to relevant environmental conditions - An example for 3,4-dichloroaniline on *Daphnia magna*." Journal of Environmental Monitoring **12**(11): 2070-2079.

- Preuss, T. G., Hommen, U., Alix, A., Ashauer, R., Van Den Brink, P., Chapman, P., Ducrot, V., Forbes, V., Grimm, V., Schäfer, D., Streissl, F. and Thorbek, P. (2009b). "Mechanistic effect models for ecological risk assessment of chemicals (MEMoRisk) - A new SETAC-Europe Advisory Group." Environmental Science and Pollution Research **16**(3): 250-252.
- Raimondo, S. and McKenney Jr, C. L. (2005). "Projecting population-level responses of mysids exposed to an endocrine disrupting chemical." Integrative and Comparative Biology **45**(1): 151-157.
- Raimondo, S. and McKenney Jr, C. L. (2006). "From organisms to populations: Modeling aquatic toxicity data across two levels of biological organization." Environmental Toxicology and Chemistry **25**(2): 589-596.
- Relyea, R. (2006). "The effects of pesticides, pH, and predatory stress on amphibians under mesocosm conditions." Ecotoxicology **15**(6): 503-511.
- Relyea, R. and Hoverman, J. (2006). "Assessing the ecology in ecotoxicology: A review and synthesis in freshwater systems." Ecology Letters **9**(10): 1157-1171.
- Ricciardi, F., Binelli, A. and Provini, A. (2006). "Use of two biomarkers (CYP450 and acetylcholinesterase) in zebra mussel for the biomonitoring of Lake Maggiore (northern Italy)." Ecotoxicology and Environmental Safety **63**(3): 406-412.
- Rinderhagen, M., Ritterhoff, J. and Zauke, G.-P. (2000). "Crustaceans as Bioindicators." in Biomonitoring of Polluted Water - Reviews on Actual Topics, Environmental Research Forum, Trans Tech Publications - Scitech Publications
- Rinke, K. and Petzoldt, T. (2008). "Individual-based simulation of diel vertical migration of *Daphnia*: A synthesis of proximate and ultimate factors." Limnologica **38**(3-4): 269-285.
- Rinke, K. and Vijverberg, J. (2005). "A model approach to evaluate the effect of temperature and food concentration on individual life-history and population dynamics of *Daphnia*." Ecological Modelling **186**(3): 326-344.
- Robillard, S., Beauchamp, G. and Laulier, M. (2003). "The role of abiotic factors and pesticide levels on enzymatic activity in the freshwater mussel *Anodonta cygnea* at three different exposure sites." Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology **135**(1): 49-59.
- Robson, G. C. (1926). "Parthenogenesis in the Mollusc *Paludetrina jenkinsi* - Part I." Journal of Experimental Biology **1**(65-78).
- Roman, Y. E., De Schamphelaere, K. A. C., Nguyen, L. T. H. and Janssen, C. R. (2007). "Chronic toxicity of copper to five benthic invertebrates in laboratory-formulated sediment: Sensitivity comparison and preliminary risk assessment." Science of the Total Environment **387**(1-3): 128-140.
- Rosenberg, D. M. and Resh, V. H. (1993). "Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates". Chapman & Hall.
- Roth, G. (1987). "Zur Verbreitung und Biologie von *Potamopyrgus jenkinsi* (E.A. Smith, 1889) in Rhein-Einzugsgebiet (Prosobranchia: Hydrobiidae)." Archiv für Hydrobiologia **79**(1):
- Roux, A. L. (1970). "Le cycle de reproduction de deux espèces étroitement parentes de crustacés amphipodes : *Gammarus pulex* et *G. fossarum*." Ann. Limnol. **6**(1): 24-49.
- Roux, C. (1982). "Les variations du métabolisme respiratoire et de l'activité de quelques invertébrés dulçaquicoles sous l'influence de divers facteurs écologiques." Université Claude Bernard - Lyon I.

- Rukke, N. A. (2002). "Effects of low calcium concentrations on two common freshwater crustaceans, *Gammarus lacustris* and *Astacus astacus*." Functional Ecology **16**(3): 357-366.
- Salice, C. J. and Miller, T. J. (2003). "Population-level responses to long-term cadmium exposure in two strains of the freshwater gastropod *Biomphalaria glabrata*: Results from a life-table response experiment." Environmental Toxicology and Chemistry **22**(3): 678-688.
- Sanderson, H. (2002). "Pesticide studies: Replicability of micro/mesocosms." Environmental Science and Pollution Research **9**(6): 429-435.
- Sandström, O., Larsson, A., Andersson, J., Appelberg, M., Bignert, A., Ek, H., Förlin, L. and Olsson, M. (2005). "Three decades of Swedish experience demonstrates the need for integrated long-term monitoring of fish in marine coastal areas." Water Quality Research Journal of Canada **40**(3): 233-250.
- Scheil, V., Triebkorn, R. and Köhler, H. R. (2008). "Cellular and stress protein responses to the UV filter 3-benzylidene camphor in the amphipod crustacean *Gammarus fossarum* (Koch 1835)." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **54**(4): 684-689.
- Schirling, M., Jungmann, D., Ladewig, V., Ludwichowski, K. U., Nagel, R., Köhler, H. R. and Triebkorn, R. (2006). "Bisphenol A in artificial indoor streams: II. Stress response and gonad histology in *Gammarus fossarum* (Amphipoda)." Ecotoxicology **15**(2): 143-156.
- Schirling, M., Jungmann, D., Ladewig, V., Nagel, R., Triebkorn, R. and Köhler, H. R. (2005). "Endocrine effects in *Gammarus fossarum* (Amphipoda): Influence of wastewater effluents, temporal variability, and spatial aspects on natural populations." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **49**(1): 53-61.
- Schmitt-Jansen, M., Veit, U., Dudel, G. and Altenburger, R. (2008). "An ecological perspective in aquatic ecotoxicology: Approaches and challenges." Basic and Applied Ecology **9**(4): 337-345.
- Schmitt, C., Oetken, M., Dittberner, O., Wagner, M. and Oehlmann, J. (2008). "Endocrine modulation and toxic effects of two commonly used UV screens on the aquatic invertebrates *Potamopyrgus antipodarum* and *Lumbriculus variegatus*." Environmental Pollution **152**(2): 322-329.
- Schmitt, C., Streck, G., Lamoree, M., Leonards, P., Brack, W. and de Deckere, E. (2011a). "Effect directed analysis of riverine sediments-The usefulness of *Potamopyrgus antipodarum* for *in vivo* effect confirmation of endocrine disruption." Aquatic Toxicology **101**(1): 237-243.
- Schmitt, C., Vogt, C., Machala, M. and de Deckere, E. (2011b). "Sediment contact test with *Potamopyrgus antipodarum* in effect-directed analyses-challenges and opportunities." Environmental Science and Pollution Research 1-7.
- Schmitt, C., Vogt, C., Van Ballaer, B., Brix, R., Suetens, A., Schmitt-Jansen, M. and de Deckere, E. (2010). "*In situ* cage experiments with *Potamopyrgus antipodarum*-A novel tool for real life exposure assessment in freshwater ecosystems." Ecotoxicology and Environmental Safety **73**(7): 1574-1579.
- Schmitz, E. H. (1992). "Amphipoda." in Microscopic Anatomy of invertebrates, John Wiley and Son
- Schmolke, A., Thorbek, P., Chapman, P. and Grimm, V. (2010). "Ecological models and pesticide risk assessment: Current modeling practice." Environmental Toxicology and Chemistry **29**(4): 1006-1012.
- Schreiber, E. S. G., Glaister, A., Quinn, G. P. and Lake, P. S. (1998). "Life history and population dynamics of the exotic snail *Potamopyrgus antipodarum* (Prosobranchia: Hydrobiidae) in Lake Purrumbete, Victoria, Australia." Marine and Freshwater Research **49**(1): 73-78.

- Schulz, R. (2003). "Using a freshwater amphipod *in situ* bioassay as a sensitive tool to detect pesticide effects in the field." Environmental Toxicology and Chemistry **22**(5): 1172-1176.
- Schulz, R. and Liess, M. (1999). "A field study of the effects of agriculturally derived insecticide input on stream macroinvertebrate dynamics." Aquatic Toxicology **46**(3-4): 155-176.
- Schwarzenbach, R. P., Escher, B. I., Fenner, K., Hofstetter, T. B., Johnson, C. A., Von Gunten, U. and Wehrli, B. (2006). "The challenge of micropollutants in aquatic systems." Science **313**(5790): 1072-1077.
- Selck, H., Aufderheide, J., Pounds, N., Staples, C., Caspers, N. and Forbes, V. (2006). "Effects of food type, feeding frequency, and temperature on juvenile survival and growth of *Marisa cornuarietis* (Mollusca: Gastropoda)." Invertebrate Biology **125**(2): 106-116.
- Selck, H., Riemann, B., Christoffersen, K., Forbes, V. E., Gustavson, K., Hansen, B. W., Jacobsen, J. A., Kusk, O. K. and Petersen, S. (2002). "Comparing sensitivity of ecotoxicological effect endpoints between laboratory and field." Ecotoxicology and Environmental Safety **52**(2): 97-112.
- Serafim, M. A., Company, R. M., Bebianno, M. J. and Langston, W. J. (2002). "Effect of temperature and size on metallothionein synthesis in the gill of *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium." Marine Environmental Research **54**(3-5): 361-365.
- Shaw, J. P., Large, A. T., Chipman, J. K., Livingstone, D. R. and Peters, L. D. (2000). "Seasonal variation in mussel *Mytilus edulis* digestive gland cytochrome P4501A- and 2E-immunoidentified protein levels and DNA strand breaks (Comet assay)." Marine Environmental Research **50**(1-5): 405-409.
- Sibly, R. M., Akçakaya, H. R., Topping, C. J. and O'Connor, R. J. (2005). "Population-level assessment of risks of pesticides to birds and mammals in the UK." Ecotoxicology **14**(8): 863-876.
- Sibly, R. M., Nabe-Nielsen, J., Forchhammer, M. C., Forbes, V. E. and Topping, C. J. (2009). "The effects of spatial and temporal heterogeneity on the population dynamics of four animal species in a Danish landscape." BMC Ecology **9**(
- Sieratowicz, A., Stange, D., Schulte-Oehlmann, U. and Oehlmann, J. (2011). "Reproductive toxicity of bisphenol A and cadmium in *Potamopyrgus antipodarum* and modulation of bisphenol A effects by different test temperature." Environmental Pollution
- Simon, R., Jubeaux, G., Chaumot, A., Lemoine, J., Geffard, O. and Salvador, A. (2010). "Mass spectrometry assay as an alternative to the enzyme-linked immunosorbent assay test for biomarker quantitation in ecotoxicology: Application to vitellogenin in Crustacea (*Gammarus fossarum*)." Journal of Chromatography A **1217**(31): 5109-5115.
- Smaoui-Damak, W., Berthet, B. and Hamza-Chaffai, A. (2009). "*In situ* potential use of metallothionein as a biomarker of cadmium contamination in *Ruditapes decussatus*." Ecotoxicology and Environmental Safety **72**(5): 1489-1498.
- Smit, M. G. D., Kater, B. J., Jak, R. G. and van den Heuvel-Greve, M. J. (2006). "Translating bioassay results to field population responses using a Leslie-matrix model for the marine amphipod *Corophium volutator*." Ecological Modelling **196**(3-4): 515-526.
- Soares, S., Moreira, S., Andrade, S., Guilhermino, L. and Ribeiro, R. (2005). "Freshwater-saltwater interface and estuarine sediment *in situ* assays based on post-exposure feeding of chironomids and polychaetes." Estuaries **28**(2): 314-319.



- Spicer, J. I., Morritt, D. and Maltby, L. (1998). "Effect of water-borne zinc on osmoregulation in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) from the populations that differ in their sensitivity to metal stress." Functional Ecology **12**(2): 242-247.
- Spromberg, J. A. and Birge, W. J. (2005a). "Modeling the effects of chronic toxicity on fish populations: The influence of life-history strategies." Environmental Toxicology and Chemistry **24**(6): 1532-1540.
- Spromberg, J. A. and Birge, W. J. (2005b). "Population survivorship index for fish and amphibians: Application to criterion development and risk assessment." Environmental Toxicology and Chemistry **24**(6): 1541-1547.
- Städler, T., Frye, M., Neiman, M. and Lively, C. M. (2005). "Mitochondrial haplotypes and the New Zealand origin of clonal European *Potamopyrgus*, an invasive aquatic snail." Molecular Ecology **14**(8): 2465-2473.
- Stark, J. D., Banks, J. E. and 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 of the United States of America **101**(3): 732-736.
- Stark, J. D., Vargas, R. and Banks, J. E. (2007). "Incorporating ecologically relevant measures of pesticide effect for estimating the compatibility of pesticides and biocontrol agents." Journal of Economic Entomology **100**(4): 1027-1032.
- Steele, D. H. (1995). "Sexual dimorphism in mature gammaridean amphipods." Polskie Archiwum Hydrobiologii **42**(4): 303-317.
- Stelzer, R. S. and Joachim, B. L. (2009). "Effects of Elevated Nitrate Concentration on Mortality, Growth, and Egestion Rates of *Gammarus pseudolimnaeus* Amphipods." Archives of Environmental Contamination and Toxicology 1-6.
- Sternberg, R. M., Gooding, M. P., Hotchkiss, A. K. and LeBlanc, G. A. (2010). "Environmental-endocrine control of reproductive maturation in gastropods: Implications for the mechanism of tributyltin-induced imposex in prosobranchs." Ecotoxicology **19**(1): 4-23.
- Stige, L. C., Ottersen, G., Hjermann, D. T., Dalpadado, P., Jensen, L. K. and Stenseth, N. C. (2011). "Environmental toxicology: Population modeling of cod larvae shows high sensitivity to loss of zooplankton prey." Marine Pollution Bulletin **62**(2): 395-398.
- Stillman, R. A. (2008). "MORPH-An individual-based model to predict the effect of environmental change on foraging animal populations." Ecological Modelling **216**(3-4): 265-276.
- Sutcliffe, D. W. (1992). "Reproduction in *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda): basic processes." Freshwater Forum **2**(102-128):
- Sutcliffe, D. W., Carrick, T. R. and Willoughby, L. G. (1981). "Effects of diet, body size, age and temperature on growth rates in the amphipod *Gammarus pulex*." Freshwater Biology **11**(2): 183-214.
- Suter, G. W., Norton, S. B. and Fairbrother, A. (2005). "Individuals versus organisms versus populations in the definition of ecological assessment endpoints." Integrated Environmental Assessment and Management **1**(4): 397-400.
- Tachet, H., Bournaud, M., Richoux, P. and Usseglio-Polatera, P. (2000). "Invertébrés d'eau douce : Systématique, biologie, écologie." CNRS éditions.
- Taleb, Z. M., Benali, I., Gherras, H., Ykhlef-Allal, A., Bachir-Bouiadjra, B., Amiard, J. C. and Boutiba, Z. (2009). "Biomonitoring of environmental pollution on the Algerian west coast using caged mussels *Mytilus galloprovincialis*." Oceanologia **51**(1): 63-84.

- Tanaka, Y. (2003). "Ecological risk assessment of pollutant chemicals: Extinction risk based on population-level effects." Chemosphere **53**(4): 421-425.
- Tanaka, Y. and Nakanishi, J. (2000). "Mean extinction time of populations under toxicant stress and ecological risk assessment." Environmental Toxicology and Chemistry **19**(11): 2856-2862.
- Taylor, E. J., Jones, D. P., Maund, S. J. and Pascoe, D. (1993). "A new method for measuring the feeding activity of *Gammarus pulex* (L)." Chemosphere **26**(7): 1375-1381.
- Taylor, E. J., Maund, S. J., Bennett, D. and Pascoe, D. (1994). "Effects of 3,4-dichloroaniline on the growth of two freshwater macroinvertebrates in a stream mesocosm." Ecotoxicology and Environmental Safety **29**(1): 80-85.
- Thatje, S., Lovrich, G. A. and Anger, K. (2004). "Egg production, hatching rates, and abbreviated larval development of *Campylonotus vagans* Bate, 1888 (Crustacea: Decapoda: Caridea), in subantarctic waters." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **301**(1): 15-27.
- Thorbeck, P., Forbes, V. E. and Heimbach, F. (2009). "Ecological Models for Regulatory Risk Assessments of Pesticides: Developing a Strategy for the Future". CRC Press.
- Truhaut, R. (1977). "Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives." Ecotoxicology and Environmental Safety **1**(2): 151-173.
- Tuikka, A. I., Schmitt, C., Höss, S., Bandow, N., von der Ohe, P. C., de Zwart, D., de Deckere, E., Streck, G., Mothes, S., van Hattum, B., Kocan, A., Brix, R., Brack, W., Barceló, D., Sormunen, A. J. and Kukkonen, J. V. K. (2011). "Toxicity assessment of sediments from three European river basins using a sediment contact test battery." Ecotoxicology and Environmental Safety **74**(1): 123-131.
- Usher, M. B. (1966). "A Matrix Approach to the Management of Renewable Resources, with Special Reference to Selection Forests." Journal of Applied Ecology **3**(2): 355-367
- van den Heuvel-Greve, M., Postma, J., Jol, J., Kooman, H., Dubbeldam, M., Schipper, C. and Kater, B. (2007). "A chronic bioassay with the estuarine amphipod *Corophium volutator*: Test method description and confounding factors." Chemosphere **66**(7): 1301-1309.
- Van Nes, E. H., Lammens, E. H. R. R. and Scheffer, M. (2002). "Piscator, an individual-based model to analyze the dynamics of lake fish communities." Ecological Modelling **152**(2-3): 261-278.
- Van Nes, E. H., Scheffer, M., Van den Berg, M. S. and Coops, H. (2003). "Charisma: A spatial explicit simulation model of submerged macrophytes." Ecological Modelling **159**(2-3): 103-116.
- Van Straalen, N. M. (2003). "Ecotoxicology becomes stress ecology." Environmental Science and Technology **37**(17):
- Vanoverbeke, J. (2008). "Modeling individual and population dynamics in a consumer-resource system: Behavior under food limitation and crowding and the effect on population cycling in *Daphnia*." Ecological Modelling **216**(3-4): 385-401.
- Veerasingham, M. and Crane, M. (1992). "Impact of farm waste on freshwater invertebrate abundance and the feeding rate of *Gammarus pulex* L." Chemosphere **25**(6): 869-874.
- Verlecar, X. N., Jena, K. B. and Chainy, G. B. N. (2007). "Biochemical markers of oxidative stress in *Perna viridis* exposed to mercury and temperature." Chemico-Biological Interactions **167**(3): 219-226.

- Vidal, M. L., Bassères, A. and Narbonne, J. F. (2002a). "Influence of temperature, pH, oxygenation, water-type and substrate on biomarker responses in the freshwater clam *Corbicula fluminea* (Müller)." Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology **132**(1): 93-104.
- Vidal, M. L., Bassères, A. and Narbonne, J. F. (2002b). "Seasonal variations of pollution biomarkers in two populations of *Corbicula fluminea* (Müller)." Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology **131**(2): 133-151.
- von der Ohe, P. C. and Liess, M. (2004). "Relative sensitivity distribution of aquatic invertebrates to organic and metal compounds." Environmental Toxicology and Chemistry **23**(1): 150-156.
- Walters, C., Korman, J., Stevens, L. E. and Gold, B. (2000). "Ecosystem modeling for evaluation of adaptive management policies in the Grand Canyon." Ecology and Society **4**(2):
- Wang, M. and Grimm, V. (2010). "Population models in pesticide risk assessment: Lessons for assessing population-level effects, recovery, and alternative exposure scenarios from modeling a small mammal." Environmental Toxicology and Chemistry **29**(6): 1292-1300.
- Watton, A. J. and Hawkes, H. A. (1984a). "The acute toxicity of ammonia and copper to the gastropod *Potamopyrgus jenkinsi* (Smith)." Environmental Pollution Series A: Ecological and Biological **36**(1): 17-29.
- Watton, A. J. and Hawkes, H. A. (1984b). "Studies on the effects of sewage effluent on gastropod populations in experimental streams." Water Research **18**(10): 1235-1247.
- Watts, M. M., Pascoe, D. and Carroll, K. (2001). "Survival and precopulatory behaviour of *Gammarus pulex* (L.) exposed to two xenoestrogens." Water Research **35**(10): 2347-2352.
- Watts, M. M., Pascoe, D. and Carroll, K. (2002). "Population responses of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) to an environmental estrogen, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol." Environmental Toxicology and Chemistry **21**(2): 445-450.
- Welton, J. S. (1979). "Life-history and production of the amphipod *Gammarus pulex* in a Dorset chalk stream." Freshwater Biology **9**(3): 263-275.
- Wennergren, U. and Stark, J. (2000). "Modeling long-term effects of pesticides on populations: Beyond just counting dead animals." Ecological Applications **10**(1): 295-302.
- Werner, I. (2004). "The influence of salinity on the heat-shock protein response of *Potamocorbula amurensis* (Bivalvia)." Marine Environmental Research **58**(2-5): 803-807.
- Westram, A. M., Jokela, J., Baumgartner, C. and Keller, I. (2011). "Spatial Distribution of Cryptic Species Diversity in European Freshwater Amphipods (*Gammarus fossarum*) as Revealed by Pyrosequencing." PLoS ONE **6**(8): e23879.
- Widarto, T. H., Krogh, P. H. and Forbes, V. E. (2007). "Nonylphenol stimulates fecundity but not population growth rate ( $\lambda$ ) of *Folsomia candida*." Ecotoxicology and Environmental Safety **67**(3): 369-377.
- Wijnhoven, S., Van Riel, M. C. and Van Der Velde, G. (2003). "Exotic and indigenous freshwater gammarid species: Physiological tolerance to water temperature in relation to ionic content of the water." Aquatic Ecology **37**(2): 151-158.
- Wiklund, A. K. E. and Sundelin, B. (2004). "Biomarker sensitivity to temperature and hypoxia - A seven year field study." Marine Ecology Progress Series **274**(209-214).

- 
- Wilding, J. and Maltby, L. (2006). "Relative toxicological importance of aqueous and dietary metal exposure to a freshwater crustacean: Implications for risk assessment." Environmental Toxicology and Chemistry **25**(7): 1795-1801.
- Winkler, G. and Greve, W. (2002). "Laboratory studies of the effect of temperature on growth, moulting and reproduction in the co-occurring mysids *Neomysis integer* and *Praunus flexuosus*." Marine Ecology Progress Series **235**(177-188).
- Winterbourn, M. (1970). "The New Zealand species of *Potamopyrgus* (Gastropoda : Hydrobiidae)." Malacologia **10**(2): 283-321.
- Xuereb, B. (2009). "Développement de marqueurs de neurotoxicité et de perturbations endocrines chez l'amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum*." Université de Metz.
- Xuereb, B., Bezin, L., Chaumot, A., Budzinski, H., Augagneur, S., Tutundjian, R., Garric, J. and Geffard, O. (2011). "Vitellogenin-like gene expression in freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): functional characterization in females and potential for use as an endocrine disruption biomarker in males." Ecotoxicology 1-14.
- Xuereb, B., Chaumot, A., Mons, R., Garric, J. and Geffard, O. (2009a). "Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda). Intrinsic variability, reference levels, and a reliable tool for field surveys." Aquatic Toxicology **93**(4): 225-233.
- Xuereb, B., Lefèvre, E., Garric, J. and Geffard, O. (2009b). "Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration." Aquatic Toxicology **94**(2): 114-122.
- Xuereb, B., Noury, P., Felten, V., Garric, J. and Geffard, O. (2007). "Cholinesterase activity in *Gammarus pulex* (Crustacea Amphipoda): Characterization and effects of chlorpyrifos." Toxicology **236**(3): 178-189.
- Zaranko, D. T., Farara, D. G. and Thompson, F. G. (1997). "Another exotic mollusc in the laurentian great lakes: The new zealand native *Potamopyrgus antipodarum* (Gray 1843) (Gastropoda, Hydrobiidae)." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **54**(4): 809-814.
- Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J. and Jiang, G. (2008). "Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem." Analytica Chimica Acta **606**(2): 135-150.
- Živić, I. and Marković, Z. (2007). "Distribution of the species *Gammarus balcanicus* and *Gammarus fossarum* on the territory of Serbia (Central part of the Balkan peninsula)." Crustaceana **80**(1): 67-76.
- Zubrod, J. P., Bundschuh, M. and Schulz, R. (2010). "Effects of subchronic fungicide exposure on the energy processing of *Gammarus fossarum* (Crustacea; Amphipoda)." Ecotoxicology and Environmental Safety **73**(7): 1674-1680.
-



## ANNEXES



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/watres](http://www.elsevier.com/locate/watres)

# In situ feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): Modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring

Romain Coulaud<sup>a,b</sup>, Olivier Geffard<sup>a,\*</sup>, Benoît Xuereb<sup>a,1</sup>, Emilie Lacaze<sup>a</sup>, Hervé Quéau<sup>a</sup>, Jeanne Garric<sup>a</sup>, Sandrine Charles<sup>b</sup>, Arnaud Chaumot<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Cemagref, UR MALY, 3 bis quai Chauveau-CP 220, F-69336 Lyon, France

<sup>b</sup> Université de Lyon, F-69000, Lyon, Université Lyon 1, CNRS, UMR5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, F-69622 Villeurbanne, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 11 March 2011

Received in revised form

31 August 2011

Accepted 15 September 2011

Available online 22 September 2011

### Keywords:

In situ assay

Feeding rate

*Gammarus*

Temperature

Biomonitoring

Modelling

## ABSTRACT

In situ feeding assays implemented with transplanted crustacean gammarids have been claimed as promising tools for the diagnostic assessment of water quality. Nevertheless the implementation of such methodologies in biomonitoring programs is still limited. This is explained by the necessity to improve the reliability of these bioassays. The present study illustrates how modelling the influence of confounding factors could allow to improve the interpretation of in situ feeding assay with *Gammarus fossarum*. We proceeded in four steps: (i) we quantified the influence of body size, temperature and conductivity on feeding rate in laboratory conditions; (ii) based on these laboratory findings, we computed a feeding inhibition index, which proved to be robust to environmental conditions and allowed us to define a reference statistical distribution of feeding activity values through the data compilation of 24 in situ assays among diverse reference stations at different seasons; (iii) we tested the sensitivity of the feeding assay using this statistical framework by performing 41 in situ deployments in contaminated stations presenting a large range of contaminant profiles; and (iv) we illustrated in two site-specific studies how the proposed methodology improved the diagnosis of water quality by preventing false-positive and false-negative cases mainly induced by temperature confounding influence. Interestingly, the implementation of the developed protocol could permit to assess water quality without following an upstream/downstream procedure and to compare assays performed at different seasons as part of large-scale biomonitoring programs.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

In aquatic ecosystems, organisms are constantly exposed to different levels of physical and chemical stressors. To

estimate and predict their biological effects, the need for relevant tools has increased considerably in the last decades, which is of broad importance in the regulatory framework for the diagnosis of ecological impacts of chemicals (e.g. EU Water

Abbreviations: FR, feeding rate; FI, feeding inhibition index.

\* Corresponding authors. Tel.: +33 4 72208788; fax: +33 4 78477875.

E-mail addresses: [olivier.geffard@cemagref.fr](mailto:olivier.geffard@cemagref.fr) (O. Geffard), [arnaud.chaumot@cemagref.fr](mailto:arnaud.chaumot@cemagref.fr) (A. Chaumot).

<sup>1</sup> Present address: Laboratoire d'Ecotoxicologie - Milieux Aquatiques (LEMA: EA 3222), Université du Havre, 76058 Le Havre Cedex, France.

0043-1354/\$ – see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.watres.2011.09.035



Framework Directive, 2000/60/EC). Up to now, water quality has been monitored using both chemical and biological measures. Concerning biological measures, several biotic indices have been developed. Because these methods referred to changes in community structure, the established diagnosis of ecosystem quality reflects integrative effects from diverse sources of degradation. That is why the identification of pressure/impacts relationships, is often difficult. To disentangle the role of chemical contaminations in the degradation of environmental quality, a complementary approach consists of methods based on lower levels of biological organization for assessing biological impacts (Chapman, 2007; Dagnino et al., 2008; Damásio et al., 2008), e.g. measuring sublethal responses of single species (Maltby et al., 2002). These methods are expected to be more specific and sensitive to the toxic effects of contaminants, and thus to supply early warning indicators of pollution impacts. Nevertheless, the use of individual responses still remains limited because their interpretation under non-controlled environmental conditions often lacks the definition of relevant reference values (Maltby et al., 2002; Hagger et al., 2008).

Individual responses can supply ecologically relevant endpoints because some of them constitute or can at least be related to fitness traits (survival, reproduction, growth). In the diagnostic context, they are rarely used because the measurement of such physiological or demographic rates necessitates the adaptation of laboratory bioassay protocols to field exposure. Hence, protocols for post-exposure measurements with either indigenous or transplanted organisms (Soares et al., 2005; Galloway et al., 2006; Barata et al., 2007; Krell et al., 2011), and protocols for *in situ* measurements with caged organisms (Maltby and Crane, 1994; Dedourge-Geffard et al., 2009) are developed for physiological rate and life-history trait measurements. Among the individual responses which can be monitored, feeding inhibition is of great interest for multi-scale assessment of water quality. On one hand, it is an ecological concern because it can be related to alteration in life-history traits (Maltby, 1999; Baird et al., 2007; Barata et al., 2007) and because it can be correlated with ecosystem processes (Farrow and Maltby, 2000; Maltby et al., 2002). On the other hand, its interpretation can be linked with the modulation of molecular biomarkers of specific modes of action (Barata et al., 2007; Xuereb et al., 2009b). In aquatic invertebrates, feeding inhibition is in most cases one of the first observed responses to environmental pollution (Gerhardt, 1995; Macedo-Sousa et al., 2007; Alonso et al., 2009; Mouneyrac et al., 2010). Since the 1990s, several laboratory studies have shown that the feeding rate (FR) of amphipods (in particular freshwater gammarids) can be inhibited by a large range of chemical stressors (metals, insecticides, fungicides, herbicides, drugs, organic compounds... see Suppl. Table 1A). *Gammarus pulex* (Linnaeus) and *Gammarus fossarum* (Koch) are highly relevant as sentinel species to study feeding inhibition in streams. They are widespread in European ecosystems, where they play a key role in nutrient cycles as decomposers of coarse organic matter. By performing a short review of the literature since 1990, we noted that several studies showed *in situ* feeding inhibitions in gammarids in various contamination profiles (industrial wastes, acid mine drainage, agricultural

catchments... see Suppl. Table 1B). Consequently, FR assessment that can be easily measured *in situ* with caged gammarids (mainly by leaf-mass feeding assays), has been proposed as an ecologically relevant *in situ* indicator of water quality (Maltby et al., 2002).

The main limitation for the use of individual responses in monitoring programs is the difficulty to define baseline values due to spatial and seasonal variability related to the effects of biotic and abiotic factors (Hagger et al., 2008; Hanson et al., 2010). Such biotic and non-toxic environmental influences could lead to the misinterpretation of individual markers in water chemical quality assessment during *in situ* or post-exposure assays with caged organisms (Maltby et al., 2002; Moreira et al., 2006; Kater et al., 2001; Krell et al., 2011). Indeed, the inflated variability of responses in controls results in a decreased statistical power explaining a low sensitivity of bioassays (i.e. high rate of false negatives). In addition, confounding effects could give rise to false-positive cases, when deviation from controls is caused by a difference in the level of a non-toxic influential factor (i.e. low specificity). FR measurement in gammarids can be affected by many biotic and abiotic factors. Biotic factors include source population (Maltby and Crane, 1994; Veerasingham and Crane, 1992; Crane et al., 1995), parasite load (McCahon et al., 1988; Pascoe et al., 1995; Fielding et al., 2003; Lettini and Sukhdeo, 2010), or body size (Nilsson, 1974). With the aim to reduce the variability related to these biotic factors, the use of transplanted standard organisms is proposed for water quality assessment (Liber et al., 2007) because it allows to play down the impact of biotic factors (one population source, same physiological parameters such as size, sex, reproductive and energetic status).

The confounding effect of abiotic factors, which can not be controlled during *in situ* exposure, has limited the application of bioassays with transplanted organisms to paired comparisons between stations upstream/downstream from identified point-source pollutions. In this specific context, the assessment of chemical water quality strongly relies on a questionable experimental design which assumes that physicochemical conditions are similar between stations, excepted for levels of bioavailable toxic compounds (Liber et al., 2007). As an alternative, modelling the influence of confounding factors can make measurements comparable in space and time (Maltby et al., 2002; Moreira et al., 2006; Krell et al., 2011). This could allow to benefit from robust reference conditions defined at larger scales of space and time. For instance, through an empirical analysis of the influence of environmental conditions (temperature, alkalinity,...) on FRs in *Gammarus*, Maltby et al. (1990b, 2002) underlined that taking into consideration the most influential environmental conditions in order to define reference values of biological activities could improve the *in situ* approach for site-specific studies. Furthermore, such a methodological advance could permit the application of FR *in situ* bioassays to large scale and long-term biomonitoring programs.

The present study illustrates how modelling the influence of confounding factors allows to improve the interpretation of *in situ* feeding assays with the widespread keystone species *G. fossarum* as an indicator of water quality. We proceeded in four steps: (i) we quantified the influence of important



confounding factors in laboratory conditions; (ii) based on these laboratory results, we computed a feeding inhibition index (FI), which proved to be robust to environmental conditions and allowed us to define a reference statistical distribution of feeding activity values through the data compilation of 24 *in situ* assays among diverse reference stations at different seasons; (iii) we tested the sensitivity of the feeding assay using this statistical framework by performing 41 *in situ* deployments in contaminated stations presenting a large range of contaminant profiles; and (iv) we illustrated how the proposed methodology improved water quality diagnosis in two site-specific studies of impacted watersheds previously reported in the literature, which were focused on the development of biomarkers (Dedourge-Geffard et al., 2009; Lacaze et al., 2011).

## 2. Material and methods

### 2.1. Sampling and maintenance of transplanted *G. fossarum*

Organisms were collected by kick sampling at La Tour du Pin, upstream of the Bourbre River (France). This station displayed good water quality according to RNB data records (French Watershed Biomonitoring Network), and a high density of gammarids was found. The organisms were kept during a 15 days acclimatisation period in 30 L tanks under constant aeration. They were continuously supplied with groundwater mixed with osmosed water at constant conductivity, 200 or 600  $\mu\text{S cm}^{-1}$ , depending on the conductivity level of the subsequent experimental environment (water hardness: 88.2 or 223.0  $\text{mg L}^{-1}$  of  $\text{CaCO}_3$ , respectively). A 10/14 h light/dark photoperiod was maintained and the temperature was kept at 12 ( $\pm 1$ ) °C. Organisms were fed *ad libitum* with alder leaves (*Alnus glutinosa*), previously conditioned for at least 6 ( $\pm 1$ ) d in groundwater. Twice a week, freeze-dried *Tubifex* sp. worms were added as a dietary supplement.

### 2.2. FR assays

Analyses of water physicochemical parameters were performed for each experiment by a French accredited chemical analysis laboratory (Laboratoire d'analyses physicochimiques des milieux aquatiques, Cemagref, UR Milieux Aquatiques, Ecologie et Pollutions). Temperature was continuously measured using Tinytag temperature logger Aquatic 2<sup>®</sup>.

#### 2.2.1. Laboratory exposure

Because we chose to perform *in situ* FR assays through the transplantation of standard organisms, we tried to improve this methodology by analyzing, first, the influence of size of selected organisms on the FR, and second, the influence of main potential confounding environmental factors reported in the literature (temperature and conductivity). The body size of transplanted organisms was thereafter fixed for the *in situ* bioassay protocol used for field experiments (Section 2.2.2). During experiments 1 and 2, conductivity, temperature, pH, and dissolved oxygen were monitored daily.

**Experiment 1: Influence of body size on FR.** Three size classes of gammarids - 7.3 ( $\pm 0.5$ ), 10.6 ( $\pm 0.7$ ) and 12.8 ( $\pm 0.9$ ) mm - were considered for the experiment (water temperature: 12.1 ( $\pm 0.01$ ) °C; conductivity: 600  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ; water hardness: 88.2  $\text{mg L}^{-1}$  of  $\text{CaCO}_3$ ). Here the body size corresponded to the dorsal length between the start of the prosoma (at the base of the antenna) and the end of the metasoma (thus excluding urosoma and telson). For the first class, we selected juvenile gammarids, and for the two others, adult male gammarids were selected in order to exclude impacts of sex on the FR. Four replicates of 20 gammarids were studied for each condition. We used a flow-through system which consisted of 0.5 L glass beakers filled with continuously renewed water (four renewals per day), a continuous pumping system, and a 10/14 h light/dark photoperiod. 20 alder leaf discs (20 mm in diameter, without major veins) were supplied in each beaker. Two beakers, containing only leaf material, were deployed to control leaf weight gain or loss unrelated to gammarid feeding activity. After 7 days of exposure, gammarids were counted (for survival rate assessment), alder leaf discs were collected, and a new batch of leaf discs was placed in each beaker for the second period of 7 days. At the end of the experiment, gammarids were counted again. The methodology for FR computation is described in Section 2.3.

**Experiment 2: Influence of water temperature and conductivity on FR.** The influence of temperature and conductivity on FR was studied by exposing adult male gammarids (10.6  $\pm 0.7$  mm) to three temperatures: 6.9 ( $\pm 0.05$ ), 12.1 ( $\pm 0.01$ ) and 16.4 ( $\pm 0.4$ ) °C and two conductivity levels: 200 and 600  $\mu\text{S cm}^{-1}$  in a fully factorial design. These levels corresponded to the range of physicochemical characteristics usually encountered in the streams in Rhône-Alpes region. 24 h before initiating the experiment, gammarids were acclimatised to each water temperature and conductivity treatment. We used the same experimental design as for experiment 1 to conduct the exposure under the six treatments.

#### 2.2.2. *In situ* deployments

*In situ* feeding assays were adapted according to the method described by Maltby et al. (1990a,b). We deployed four replicates of 20 adult male gammarids with homogenous body size (10–11 mm) in stations presented in Tables 1A–D. As in experiment 2, we used a size class, which corresponds in mean to the first class of adults in experiment 1. This is because it is the more numerous in collected samples from the source population and thus it makes easier to constitute homogenous replicates. Organisms were placed in polypropylene cylinders (diameter 5 cm, length 10 cm) capped at their ends with pieces of net (mesh size: 1 mm). 20 alder leaf discs (20 mm in diameter, without major veins) were supplied in each container. Two containers with only leaf material, were deployed at each station as a control. After 7 days of exposure, the gammarids were counted (for survival rate assessment), and the alder leaf discs were collected. The methodology for FR computation is described in Section 2.3.

**Experiment 3: *In situ* characterisation of FR variability among reference stations.** 24 deployments in reference stations (detailed in Table 1A) were implemented during two



**Table 1A – Detailed information on *in situ* deployments for the different feeding assays considered in experiment 3: 24 deployments in reference stations in Rhône-Alpes region.**

Station	GPS coordinates	National grid reference	Deployment date (no.)	Water temperature (°C)	Conductivity ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	Hardness ( $\text{mg L}^{-1}$ of $\text{CaCO}_3$ )
River, location, (coding letter on Suppl. Fig. 1)						
Doux, Labatie d'Andaure (a)	04°29' 41.5" E 45°01' 23.6" N	6105568	10/2009 (R1) 06/2010 (R13)	14.8 13.4	64 55	20 <14
Cance, Saint Julien Vocance (b)	04°30' 11.9" E 45°10' 39.5" N	6101905	10/2009 (R2)	13.4	78	21
Gier, La Valla en Gier (c)	04°30' 36.4" E 45°26' 36.3" N	6820138	10/2009 (R3)	13.1	78	21
Ain, Saint Maurice de Gourdans (d)	05°11' 20.0" E 45°48' 27.5" N	6092000	10/2009 (R4)	15.0	394	266
Albarine, Chaley (e)	05°32' 31.8" E 45°57' 22.8" N	6300001	10/2009 (R5)	11.9	440	316
Mandorne, Oncieux (f)	05°28' 23.7" E 45°58' 36.1" N	6069650	10/2009 (R6) 06/2010 (R14, R20)	11.9 10.9, 11.9	380 415	245 238
Vareze, Cours et Buis (g)	04°58' 52.0" E 45°26' 15.3" N	6820073	10/2009 (R7) 06/2010 (R15, R21)	13.9 14.0, 15.0	411 325	288 168
Galavayson, Saint Clair sur Galaure (h)	05°07' 50.3" E 45°15' 26.5" N	6104900	10/2009 (R8) 06/2010 (R16, R22)	13.5 13.8, 15.1	292 130	260 55
Drevenne, Rovon (i)	05°27' 55.5" E 45°12' 11.6" N	6147220	10/2009 (R9)	13.9	323	242
Guiers Mort, Saint Laurent du Pont (j)	05°45' 17.4" E 45°21' 42.2" N	6078200	10/2009 (R10) 06/2010 (R17, R23)	10.7 9.2, 10.1	300 290	266 156
Boussuivre, Saint Marcel l'Eclairé (k)	04°23' 39.3" E 45°51' 52.7" N	6580673	06/2010 (R18, R24)	12.9, 13.6	245	72
Ardières, Les Ardillats (l)	04°31' 15.9" E 46°11' 11.8" N	6051375	10/2009 (R11)	12.8	295	60
Ergues, Poule les Echarmeaux (m)	04°26' 45.5" E 46°08' 21.2" N	6053830	10/2009 (R12) 06/2010 (R19)	12.6 14.2	150 110	75 28

campaigns in October 2009 (R1 to R12) and June 2010 (R13 to R24). These stations were chosen among the national reference network (WFD implementation) in collaboration with the regional public water agency, which built this network by expert judgement using data on land use, chemical monitoring (including micropollutants), and ecological diagnosis (<http://sierm.eaurmc.fr/eaux-superficielles>). For our study, stations were selected on rivers in Rhône-Alpes region, seeking to cover a large range of physicochemical characteristics and geographical locations (~20000 km<sup>2</sup>) (Suppl. Fig. 1A). Mean weekly water temperature ranged from 9.2 °C to 15.1 °C, and conductivity from 110  $\mu\text{S cm}^{-1}$  to 420  $\mu\text{S cm}^{-1}$  between the 24 deployments.

**Experiment 4 : *In situ* exposure at contaminated stations.** 41 deployments (detailed in Table 1B) were performed during the same two campaigns in the same region (Suppl. Fig. 1A) as experiment 3 in October 2009 (P1 to P15) and June 2010 (P16 to P41). These stations were chosen among the national control network (WFD implementation) in collaboration with the regional water agency. They displayed depreciated water chemical quality and faunistic indices and typology of micropollutant contamination (Table 1B) was previously established by the water agency (<http://sierm.eaurmc.fr/eaux-superficielles>). For our study, stations were selected in order to supply diverse contamination profiles (pesticides, metals, urban). Mean weekly water temperature varied between 11.8 °C and 20.7 °C, and conductivity between 80  $\mu\text{S cm}^{-1}$  and 868  $\mu\text{S cm}^{-1}$ .

**Experiment 5: The Lot watershed.** Four campaigns of *in situ* caging were performed from November 2009 to June 2010 on the Lot watershed in the Decazeville area. This river system has been intensively studied during different scientific programs (e.g. ANR 08-CES-014 RESYST) because of its polymetallic contamination due to former open-cast coal mining and zinc ore treatment. Experiments were performed in autumn, winter, spring and summer. Four stations were used (Suppl. Fig. 1B), for which chemical characterisation, survival and biomarker responses in caged *G. fossarum* were provided in a previous report (Lacaze et al., 2011): i) one station upstream of the Lot-Riou Mort confluence (Upstream Lot), considered as a reference site for the studied water system because of low metal concentrations in the water column; ii) one station downstream of the Lot-Riou Mort confluence (Downstream Lot); iii) one station on the Riou Mort river upstream of the polymetallic contamination (Decazeville) which was another metal-free site but located in an urban area, iv) the fourth station (Riou Viou) is on the Riou Viou river, a tributary of the Riou Mort river which presented significant metal concentrations in the water column. Mean water temperature varied between these 20 deployments from 6.2 to 17.4 °C, and mean conductivity from 135 to 1552  $\mu\text{S cm}^{-1}$  (detailed in Table 1C).

**Experiment 6: The Amous watershed.** *In situ* caging was performed in March 2008 in four stations on the Amous watershed (Suppl. Fig. 1C), a French river known to be highly contaminated by heavy metals originating mainly from acid

**Table 1B – Detailed information on in situ deployments for the different feeding assays considered in experiment 4: 41 deployments in contaminated stations in Rhône-Alpes region. Typology of contamination (+) established by the regional water agency for national control network (WFD implementation).**

Station	GPS coordinates	National grid reference	Deployment date (no.)	Metals	Pesticides	Other contaminants	Water temperature (°C)	Conductivity ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	Hardness ( $\text{mg L}^{-1}$ of $\text{CaCO}_3$ )
Doux, Saint Jean de Muzols (n)	04°49' 39.5" E	6106030	10/2009 (P1)	+	+	+	17.1	123	47
	45°04' 40.2" N		06/2010 (P16, P29)				18.0, 18.7	80	20
Cance, Sarras (o)	04°47' 47.6" E	6103500	10/2009 (P2)	+	+	+	14.8	613	173
	45°11' 30.9" N		06/2010 (P17, P30)				16.9, 17.3	160	36
Albarine, Saint Rambert (p)	05°26' 01.8" E	6300001	10/2009 (P3)				12.7	386	243
	45°56' 32.1" N								
Veyle, Lent (q)	05°11' 48.4" E	6048570	10/2009 (P4)		++		12.6	473	364
	46°06' 58.7" N		06/2010 (P18, P31)				15.6, 16.0	345	167
Veyle, Servas (r)	05°10' 31.3" E	6049550	10/2009 (P5)		+++		14.0	447	360
	46°07' 37.9" N		06/2010 (P19, P32)				17.3, 17.9	330	154
Ange, Brion (s)	05°33' 05.3" E	6086100	10/2009 (P6)	++		+++	12.7	602	289
	46°10' 12.3" N								
Drac, Fontaine (t)	05°42' 04.3" E	6146500	10/2009 (P7)	+++	+++	+++	15.1	317	191
	45°11' 36.6" N		06/2010 (P20, P33)				11.8, 12.1	240	118
Turdine, Arbresle (u)	04°36' 09.1" E	6057200	10/2009 (P8)	+		+	13.6	868	242
	45°50' 15.5" N		06/2010 (P21, P34)				17.2, 17.2	465	116
Azergues, Legny (v)	04°34' 21.4" E	6800009	10/2009 (P9)	+++	+		13.2	307	187
	45°54' 24.6" N		06/2010 (P22, P35)				15.3, 15.3	265	99
Azergues, Lucenay (w)	04°43' 33.1" E	6057700	10/2009 (P10)	+++	+++	+	15.8	664	364
	45°54' 41.5" N		06/2010 (P23, P36)				18.2, 17.6	430	151
Gier, Givors (x)	04°45' 42.3" E	6097000	10/2009 (P11)	++	+	++	16.1	377	275
	45°35' 15.4" N		06/2010 (P24, P37)				17.8, 17.0	240	75
Rhône, Givors (y)	04°47' 03.4" E	na	10/2009 (P12)	++	+	++	19.1	434	280
	45°35' 36.4" N		06/2010 (P25, P38)				17.4, 17.9	390	180
Bourbre, Pont de Cheruy (z)	05°10' 29.9" E	na	10/2009 (P13)	+	+	+	15.2	720	348
	45°04' 00.3" N		06/2010 (P26, P39)				16.6, 16.7	650	331
Saône, Ile Barbe (aa)	04°49' 57.3" E	6059500	10/2009 (P14)	++	+++	+	18.8	702	156
	45°47' 49.4" N		06/2010 (P27, P40)				20.7, 20.3	490	218
Ardières, Saint Jean (ab)	04°44' 00.9" E	6051550	10/2009 (P15)	+++	+++	+	14.3	270	153
	46°07' 18.4" N		06/2010 (P28, P41)				17.0, 16.6	160	53



**Table 1C – Detailed information on in situ deployments for the different feeding assays considered in experiment 5: Lot watershed (2009/2010).**

Season	Station	GPS coordinates	Water temperature (°C)	Conductivity ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	Hardness ( $\text{mg L}^{-1}$ of $\text{CaCO}_3$ )
Autumn	Upstream Lot	02° 14' 30.1" E 44° 35' 53.5" N	10.7	145	68
	Downstream Lot	02° 11' 51.5" E 44° 34' 49.7" N	10.6	158	77
	Decazeville	02° 14' 14.9" E 44° 33' 38.1" N	11.1	1180	485
	Riou Viou	02° 12' 44.6" E 44° 33' 10.1" N	9.2	270	120
Winter	Upstream Lot		6.4	162	75
	Downstream Lot		6.2	180	76
	Decazeville		8.2	717	256
	Riou Viou		7.7	215	88
Spring	Upstream Lot		12.1	135	38
	Downstream Lot		12.2	177	67
	Decazeville		15.8	1072	556
	Riou Viou		12.1	255	79
Summer	Upstream Lot		14.9	135	55
	Downstream Lot		15.2	155	67
	Decazeville		17.4	1530	894
	Riou Viou		15.6	207.5	85

mine drainage from the former lead and zinc mine at Carnoulès (Dedourge-Geffard et al., 2009). Four stations were studied: three stations along the Amous river: Upstream –1500 m, Downstream +1200 m and Downstream +3500 m, with different levels of metallic contamination (with a maximum in Downstream +1200 m); and a fourth reference station on a tributary from the same river system (Tributary) that is not impacted by metal-loaded mine leachates (see Dedourge-Geffard et al., 2009 for chemical characterisation data). Mean water temperature varied between stations from 9.5 to 11.8 °C and mean water conductivity from 520 to 600  $\mu\text{S cm}^{-1}$  (detailed in Table 1D).

### 2.3. FR computation

Leaf discs were numerically scanned using an Epson perfection 3490 PHOTO ® scanner after 7 d of exposure. The surfaces of the discs were measured using SigmaScan ® Pro v5.0 imaging software (Systat Software). FR, expressed as

a consumed surface per day per gammarid ( $\text{mm}^2 \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{organism}^{-1}$ ), was calculated for each replicate as follows:

$$FR_i = \frac{(S_{\text{control}} - S_i)}{((l_{i,0} + l_{i,t})/2) \times t} \quad (1)$$

where  $FR_i$  is the feeding rate of replicate  $i$ ;  $S_{\text{control}}$  the total surface of leaf discs present at the end of experiment in the control without gammarids;  $S_i$  the total surface of leaf discs present at the end of the experiment in replicate  $i$ ;  $t$  is the duration in days of the experiment (here  $t = 7$  days for all assays);  $l_{i,0}$  and  $l_{i,t}$  are the number of living gammarids at the start and at the end of experiment (here  $l_{i,0} = 20$ ). We reported on Suppl. Fig. 2 the relationship between surface and mass of leaf discs after different levels of consumption to allow the comparison with FR from the literature expressed as mg consumed per day and per gammarid. In order to propose a sufficiently reliable measure of FR for all the experiments (in the laboratory or *in situ*), we decided to only consider situations when gammarid survival remained higher than 75%.

**Table 1D – Detailed information on in situ deployments for the different feeding assays considered in experiment 6: Amous watershed (March 2008).**

Station	GPS coordinates	Water temperature (°C)	Conductivity ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	Hardness ( $\text{mg L}^{-1}$ of $\text{CaCO}_3$ )
Tributary	03° 59' 51.9" E 44° 06' 13.1" N	9.45	520	308
Upstream-1500 m	03° 59' 17.2" E 44° 06' 35.5" N	11.80	525	311
Downstream +1200 m	03° 59' 43.2" E 44° 05' 57.7" N	10.25	590	347
Downstream +3500 m	03° 58' 57.8" E 44° 04' 30.6" N	11.65	600	351



## 2.4. Statistical analyses

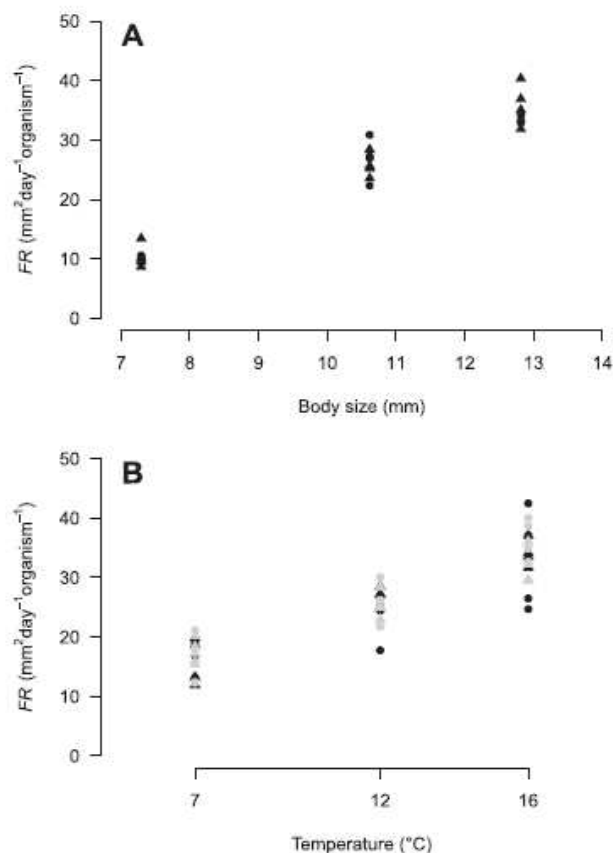
Statistical procedures were carried out with the R software (R Development Core Team, 2008). Normality and homoscedasticity were checked using Shapiro–Wilk test and Bartlett test, respectively. The influence of body size and exposure week on FRs in experiment 1, and the influence of temperature, conductivity and exposure week on FRs in experiment 2 were tested using linear modelling (ANCOVA procedure) including the interaction terms in full models. Among explanatory variables, body size and temperature were included as continuous, conductivity and exposure week as categorical. In experiment 3, the between-deployment variability was also tested by linear modelling (ANOVA test). To compare FR measurement between deployments during experiments 4, 5 and 6, non-parametric testing was used because of heteroscedasticity in FR distributions observed between deployments in contaminated contexts. Furthermore, as in biomarker studies reported in Xuereb et al. (2009a, 2011), we built a reference distribution of in situ feeding levels based on the measurements in the reference stations (experiment 3). This was possible after removing the between-deployment variability in FR measurements in reference stations, by means of the computation of a feeding inhibition index (FI) (see Section 3.2). A normal distribution was fitted to FI values from reference stations thanks to the *fitdistr* function in the MASS R-package. Such a distribution allowed us: (i) to compute a 5% confidence interval of FI values expected in reference conditions; and (ii) to calculate the likelihood that the replication of FI values measured in a given in situ deployment could be observed under reference conditions. A *p*-value associated to this likelihood was calculated using an empirical null distribution built by computing the likelihoods of replications of FI values in  $10^5$  theoretical deployments simulated from the reference distribution.

## 3. Results

### 3.1. Influence of body size, temperature and conductivity on FRs in the laboratory

In experiment 1 (Fig. 1A), we did not observe any significant differences in FR between the two successive weeks of experiments (ANCOVA test: interaction term  $p = 0.53$ , week effect  $p = 0.68$ ). We noted that the feeding activity of gammarids increases with body size (ANOVA test,  $p < 10^{-14}$ ). This influence was strong considering for instance that a deviation from 10 to 11 mm in the mean body size of the 20 selected organisms would give rise to a relative increase of 20% in FR level.

In experiment 2 (Fig. 1B), no effect of conductivity and exposure week on FR was detected (ANCOVA test: interaction terms  $p > 0.10$ , week effect  $p = 0.99$ , conductivity effect  $p = 0.80$ ). We noted that the FR increases with temperature (ANOVA test,  $p < 10^{-15}$ ). Therefore, for male gammarids measuring  $10.6 \pm 0.7$  mm, we related FR, expressed as a consumed surface per gammarid per day ( $\text{mm}^2 \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{organism}^{-1}$ ), to temperature  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) with a linear regression model ( $r^2 = 0.79$ ,  $n = 48$ ):



**Fig. 1 – Effects of body size, temperature and conductivity on feeding rates (FR) in laboratory conditions: (A) FRs for three body size classes of gammarids (7.3 ( $\pm 0.5$ ), 10.6 ( $\pm 0.7$ ) and 12.8 ( $\pm 0.9$ ) mm); (B) FRs for three water temperatures (6.9 ( $\pm 0.05$ ), 12.1 ( $\pm 0.01$ ) and 16.4 ( $\pm 0.4$ )  $^{\circ}\text{C}$ ) and two levels of conductivity (200  $\mu\text{S cm}^{-1}$  in black and 600  $\mu\text{S cm}^{-1}$  in grey). Circle and triangle symbols correspond to first and second weeks of experiment, respectively.**

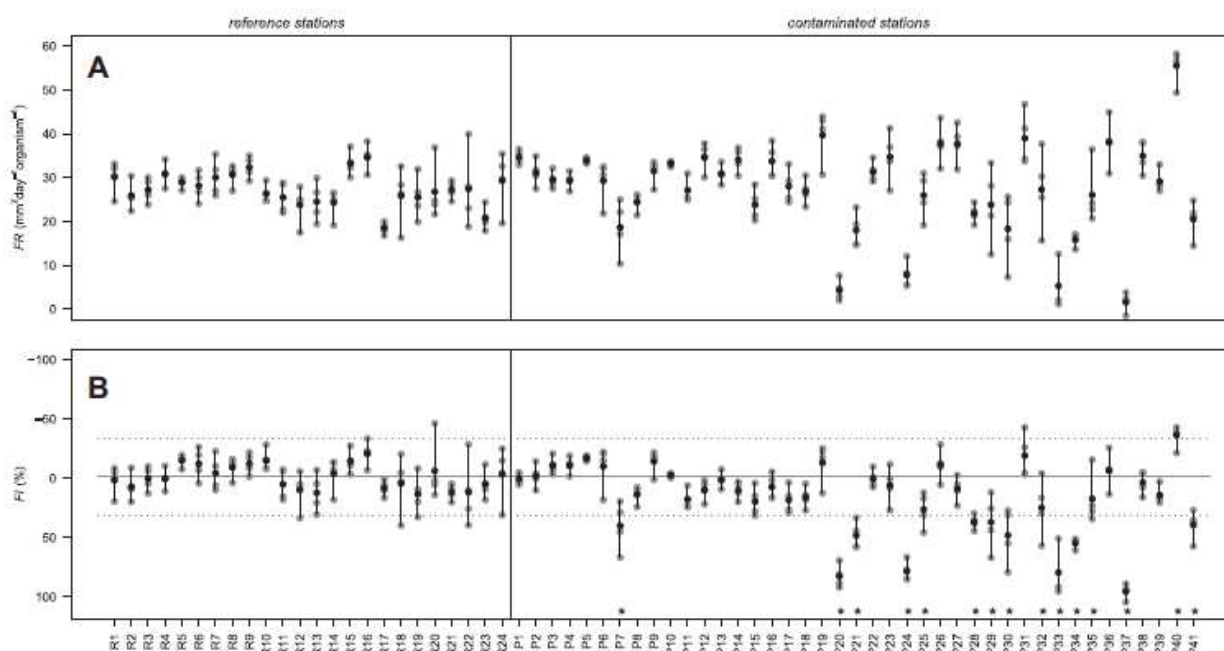
$$\text{FR} = 1.85 \times T + 3.14 \quad (2)$$

From this equation, it appeared for instance that an increase in mean temperature from  $12^{\circ}\text{C}$  to  $13^{\circ}\text{C}$  would result in an augmentation of 7.3% in FR.

### 3.2. Modelling the in situ variability of FR measurements among reference stations

Important physicochemical differences were observed between the 24 deployments, concerning mean water temperature (from  $9.2$  to  $15.1^{\circ}\text{C}$ ) or conductivity (from  $110$  to  $420 \mu\text{S cm}^{-1}$ ) (details in Table 1A). We observed significant differences for FR measurements between deployments (ANOVA test,  $p = 0.04$ ) (Fig. 2A). Considering the findings from laboratory experiment 2, we assumed that temperature was the main determinant of this variability. This was also confirmed *a posteriori* by the analysis of FR variance among the 24 deployments fitting conductivity and temperature as





**Fig. 2** – *In situ* feeding assays in reference and contaminated stations in October 2009 (deployments R1–R12 and P1–P15) and June 2010 (deployments R13–R24 and P16–P41): (A) Raw measurement of feeding rates (FR) (black points: mean for each deployment; grey points: four replicates per deployment; segments: min-max range); (B) Temperature correction via the computation of the feeding inhibition index (FI) (see Eq. (3) in the text). The solid and dotted lines represent the mean and the 95% confidence interval of the distribution of FI values assessed in deployments within reference stations. The deployments with a significant deviation of FI values from this reference distribution are marked with stars (see Section 2.4 for the calculation of likelihood and *p*-value).

explaining factors (ANOVA test: conductivity effect  $p = 0.49$ ; temperature effect  $p < 10^{-7}$ ). In order to take into account the influence of temperature on FR, we calculated a feeding inhibition index (FI) which was calculated as:

$$FI = \frac{(FR_{\text{pred}} - FR_{\text{obs}})}{FR_{\text{pred}}} \times 100 \quad (3)$$

where  $FR_{\text{obs}}$  is the feeding rate measured during the *in situ* experiment, and  $FR_{\text{pred}}$  is the feeding rate predicted with Eq. (2) at the mean temperature during the *in situ* exposure. With this index, we no longer detected significant differences in feeding activity between the different deployments in reference stations (ANOVA test,  $p = 0.12$ ) (Fig. 2B). Fitting a normal distribution to the calculated FI values led to a mean value of FI, which is not significantly different from zero (Student test,  $p = 0.52$ ). This demonstrates congruence between the *in situ* measurements and the predicted values from the laboratory experiments. This finding validated the assumption that temperature was the main determinant of FR variability between deployments. In addition, the robustness of FR measurement was reinforced since we observed that not only the mean value of FR was unchanged between laboratory and *in situ* measurements, but also that the variability of FR was not affected (see Suppl. Fig. 3). Using the normal distribution of FI in the reference stations, we confirmed the good replicability between the stations and the seasons. Indeed data

invariably fitted the reference distribution when the likelihood of observed replicated FI values for each deployment ( $p > 0.5$  for all deployments, Fig. 2B) was tested. From these findings, FI can be interpreted as a feeding inhibition index, because it contrasts a given observed FR in one assay with the expected value of feeding activity in a non-contaminated context for the same temperature.

### 3.3. Sensitivity of the FR assay during *in situ* exposure at contaminated stations

Important physicochemical differences were observed between the 41 deployments: mean temperature ranged from 11.8 to 20.7 °C, conductivity from 80 to 868  $\mu\text{S cm}^{-1}$  (details in Table 1B). We observed significant differences between the FR (Fig. 2A, Kruskal & Wallis rank sum test,  $p < 10^{-10}$ ) and greater variability compared to reference stations (experiment 3). We assumed that this increase in the range of observed FRs was due on one hand to the possible influence of higher temperatures, and on the other hand, to possible inhibitions. In order to remove temperature-induced variability in feeding activity, notably for the comparison of contaminated and reference stations (experiment 3), we calculated FI for all deployments (Fig. 2B). This revealed significant feeding inhibitions ( $p < 0.05$ ) for 14 deployments (P7, P20, P21, P24, P25, P28, P29, P30, P32, P33, P34, P37 and P41). We observed feeding

inhibition in 7% of the deployments in October 2009, and 54% in June 2010. In addition, FI values did not exceed the upper limit of the reference confidence interval, implying that the higher values of the FR were mainly explained by higher exposure temperatures.

3.4. Case studies

*The Lot watershed.* We first performed a paired comparison (within each season) between FR measurements in contaminated stations and the reference station Upstream Lot

(Fig. 3A). Significantly lower FR values were observed from the Decazeville station in winter, spring and summer, from the Riou Viou station in autumn and from the Downstream lot station in spring (unilateral Wilcoxon rank sum tests,  $p < 0.05$ ). The Riou Viou station also presented higher FR values than the reference station in winter (unilateral Wilcoxon rank sum tests,  $p < 0.05$ ). The computation of FI values (Fig. 3B) confirmed the significant feeding inhibition at the Decazeville station in winter, spring and summer, and at the Downstream lot station in spring when compared to the reference distribution from experiment 3 ( $p < 0.05$ ). In

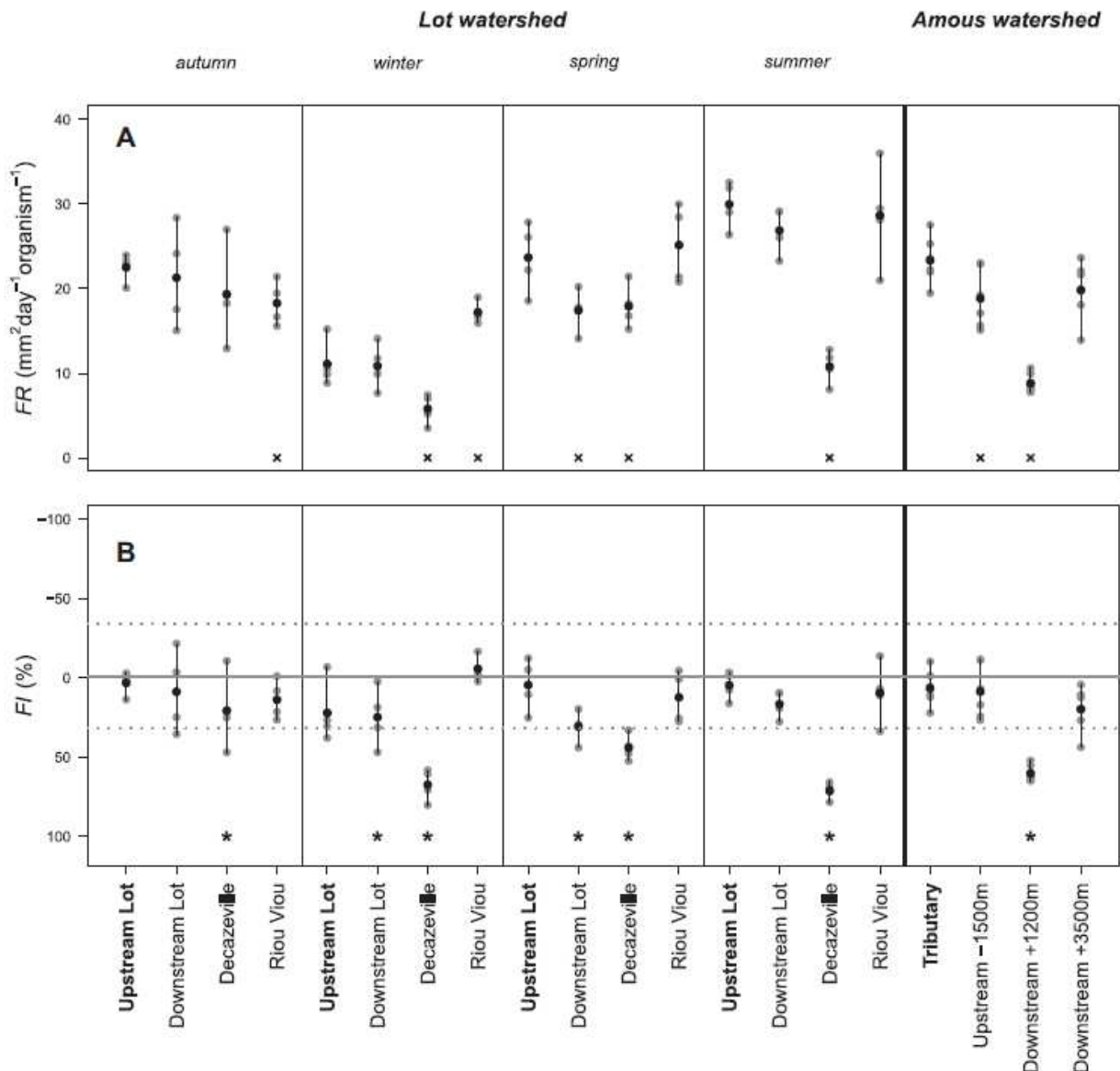


Fig. 3 – Site-specific surveys of Lot (four seasons) and Amous (spring) watersheds (reference stations are in bold): (A) Raw measurement of feeding rates (FR) (same conventions as Fig. 2). Crosses represent stations with significant differences in FRs in comparison with the reference station; (B) Temperature correction via the computation of the feeding inhibition index (FI) (see Eq. (3) in the text). The solid and dotted lines represent the mean and the 95% confidence interval of the distribution of FI values assessed in deployments within reference stations from Fig. 2. The deployments with significant deviation of FI values from this reference distribution are marked with stars (see Section 2.4 for the calculation of likelihood and  $p$ -value).



addition, *FI* values revealed significant feeding inhibitions at the Decazeville station in autumn, as well as at the Downstream Lot station in winter. This constituted two false-negative cases, i.e. inhibitions not detected with the *FR*. These false-negatives would not have been uncovered if we had simply compared *FI* to values from the only reference station (Upstream Lot) for the same season (unilateral Wilcoxon rank sum tests,  $p > 0.05$ ). The computation of *FI* values also revealed false-positive cases: the decrease of *FR* values from the Riou Viou station in autumn and the increase in winter were masked once temperature heterogeneity influence was taken into account with *FIs*. These false-positives were eliminated either by the comparison with the reference station or by the comparison with the reference distribution from experiment 3. In addition, we observed that the *FI* values from the reference Upstream Lot station corresponded well with the reference distribution, and that the significant seasonal variability in *FR* values for this station (Kruskal Wallis rank sum test,  $p < 0.05$ ) was negated once the *FIs* which integrated temperature influence were considered (Kruskal Wallis rank sum test,  $p = 0.68$ ).

*The Amous watershed.* Considering *FR* values (Fig. 3A), we observed significantly lower feeding activities from the two stations Upstream  $-1500$  m and Downstream  $+1200$  m in comparison to *FR* measurements from the reference station (Tributary) (unilateral Wilcoxon rank sum test,  $p < 0.05$ ). Using *FI* values (i.e. temperature corrected) (Fig. 3B), we still detected significant feeding inhibition but only at the Downstream  $+1200$  m station (unilateral Wilcoxon rank sum test,  $p < 0.05$ ). This pattern was supported when comparing the *FIs* with either the measurements from the reference station (Tributary) or with the reference distribution of *FI* values (experiment 3).

## 4. Discussion

### 4.1. Identification of influential factors on *FR* in caged *G. fossarum*

Despite their recognized importance, the influence of biotic (including body size, source population or parasite load) and abiotic (including dissolved oxygen concentration, alkalinity, temperature or pH) factors on feeding activity of gammarids has rarely been scrutinized. The influence of parasitism is one of the most described biotic factor (McCahon et al., 1988; Pascoe et al., 1995; Fielding et al., 2003; Lettini and Sukhdeo, 2010). For other factors, quantitative studies are scarcer. Here, we showed a significant linear positive relationship between *FR* values and organism size (Fig. 1A), agreeing with the study of Nilsson (1974) on *G. pulex*. Blockwell et al. (1998), on the contrary, did not find any significant differences in feeding activity of *G. pulex* between juveniles of 5.1 and 7.0 mm. However, they measured feeding activity through the consumption of *Artemia salina* eggs, which makes the comparison with our results difficult, and their methodology may have been less sensitive than leaf consumption methods. The linear relationship reported on Fig. 1A contradicts the theoretical prediction, which states that *FR* should be proportional to length squared due to allometric constraints

(Kooijman, 2000). Such a parabolic relationship may be concealed because we tested a too narrow range of body sizes. Nevertheless, considering that the weight of organisms is proportional to the length cubed, the positive relationship between *FR* and length is consistent with negative correlations reported for amphipods between weight-specific consumption and body weight (Nilsson, 1974; Sutcliffe et al., 1981; Lozano et al., 2003). Furthermore, in *Diporeia*, the coefficient of this exponential decrease has been quantified as  $-0.84 \pm 0.08$  (Lozano et al., 2003) which is closer to our finding ( $-2/3$  is expected) than to a parabolic pattern ( $-1/3$  is expected). The possible interaction between the effect of body size on *FR* and abiotic factors such as temperature is reported in some studies (Nilsson, 1974) but not in others (Lozano et al., 2003). In our study, we did not test such an interaction because we chose to control the variability induced by biotic factors thanks to the transplantation of standard organisms, using male gammarids from a unique population, with no visible parasites, with homogenous body size, and acclimatized in the laboratory before *in situ* transplantation.

Regarding the influence of environmental conditions (abiotic factors) with caged gammarids, Maltby et al. (2002) showed that temperature heterogeneity explained 76% of the between-deployment *FR* variation in reference stations. Taking into account additional physicochemical variability did not strongly increase the amount of explained variance (less than 8%). Our results confirmed these findings. We described a significant linear influence of temperature on feeding activity (Fig. 1B), with a 50% reduction of the *FR* at  $7^\circ\text{C}$  compared to  $16^\circ\text{C}$ . This was consistent with results on *G. pulex* (Nilsson, 1974) where the *FR* was dropped by 90% at  $2^\circ\text{C}$  compared to  $15^\circ\text{C}$  under laboratory conditions. According to the theoretical model of Arrhenius, we could expect an exponential relationship between temperature and *FR*, because it is a physiological rate (Kooijman, 2000). This pattern could have been described more precisely if we had extended the range and the number of tested temperatures. Nevertheless, considering the residual variability of *FR* values (Fig. 1B), the minor difference which could be detected between linear and exponential model should not improve our prediction of temperature effect within the range of the temperatures considered in our study, which already constitutes a large range of conditions for *in situ* biotests with *G. fossarum*. We did not detect any influence of conductivity on *FRs* in the laboratory. This pattern of a major influence of temperature on the *FR* was supported by *in situ* results in different rivers, and during different seasons, with highly contrasting physicochemical characteristics and geographical locations. Indeed, removing temperature effects, erased spatial and seasonal differences in measurements under reference conditions (during experiment 3 and for the two case studies, Figs. 2 and 3) and we observed an important decrease in the variability of feeding activity in contaminated stations (Fig. 2).

### 4.2. Definition of reference values and accuracy of *in situ FR* assay

In order to limit false positives induced by confounding environmental factors, one approach - implemented for some



biomarkers (Xuereb et al., 2009a; Hanson et al., 2010) - would consist in defining a range of reference values by including the whole annual and spatial variability observed in reference stations (Hagger et al., 2008). This appears problematic for individual responses such as FR, because of their high natural variability (induced by temperature) which would lead to a lack of statistical power and thus to difficulties in discriminating feeding inhibitions related to contaminations (Fig. 2A). A current practical solution consists in using only local/seasonal controls. As exemplified in our two case-studies (Fig. 3), this is questionable since it does not fully prevent confounding effects of temperature occurring even at small spatial scales. In the Lot case-study, the deviation of the FR between the Riou Viou and the reference station was entirely explained by temperature heterogeneity within the watershed. In the Amous case-study, the same pattern was observed between the Upstream –1500 m and Tributary stations. In addition, it appears that the interpretation of bioassays according to local controls does not solve the problematic lack of statistical power, not because of significant variability in controls but due to the reduced number of available control measurements (Hanson et al., 2010). For example, in the Lot case-study, FI values measured from Decazeville station in autumn and from the Downstream Lot station in winter showed inhibition of feeding activity (as during other seasons), but this was not revealed by the simple comparison to the reference Upstream Lot station (Fig. 3).

As an alternative, modelling the influence of confounding factors permits to correct observed FR and supplies comparable feeding activities even in variable environmental conditions (Maltby et al., 2002; Moreira et al., 2006; Krell et al., 2011). We show here that this allows to take advantage of robust reference conditions defined at large scale of space and time. This permits a gain in the statistical power for the detection of impacted feeding activities because of the reduced variability of FI in controls, and because of the large set of reference measurements which could be compiled to define the distribution of reference values (Hanson et al., 2010). Following the same approach as Moreira et al. (2006) and Krell et al. (2011), we chose to model the influence of temperature and conductivity in preliminary experiments under controlled laboratory conditions. Maltby et al. (2002) modelled the influence of temperature and other environmental factors on gammarids FR through the statistical analysis of results from a set of *in situ* bioassays in reference conditions. In our case, we observed similar results with the two approaches (Suppl. Fig. 3). Nevertheless, when the measurements of individual responses are comparable between laboratory and *in situ* conditions, the first approach would be preferred because it should be more predictive (between regional contexts for instance). Indeed, the latter data-driven approach may confound the influences of environmental factors which could be correlated only in the specific reference dataset.

For the assessment of the impact of an identified point-source pollution, the definition of baseline values robust to environmental variability also permits to qualify the value of a local reference. For instance, in the Lot study, the Decazeville station was first considered as a reference location to evaluate the impact of the past mining activity because of its metal-free water chemistry. But, it appears that urban

effluents highly impact FR in this station, consistent with the alteration of water chemical quality revealed by the induction of biomarkers of genotoxicity in this station (Lacaze et al., 2011). Thus, as already proposed with laboratory controls for post-exposure FR bioassays in *Daphnia* (Barata et al., 2007), in such comparative approaches (e.g. upstream/downstream), the use of independent reference benchmarks for feeding activity could help to accurately assess any alteration of chemical water quality.

#### 4.3. Relevance of the *in situ* FR bioassay with *G. fossarum*

With the aim to integrate the complexity of field exposure to contaminants in water quality assessment, bioassays with gammarids appear as promising tools because leaf-mass consumption methodology permits *in situ* measurements of FR, while the majority of protocols with invertebrates are only achievable by post-exposure measurement in laboratory conditions: bivalves (Hagger et al., 2008), gastropods (Krell et al., 2011), daphnids (Barata et al., 2007; Damásio et al., 2008), decapods (Moreira et al., 2006), chironomids and annelids (Soares et al., 2005). In addition, these assays are not less influenced by environmental conditions during exposure than *in situ* FR measurements. The feeding assay with *Gammarus* appeared sensitive to contaminants in multiple contexts (agricultural, industrial, mining...): in experiment 4, 37% of the contaminated stations showed significant feeding inhibitions. These results supported findings from previous laboratory or field studies (Suppl. Table 1) that demonstrated feeding inhibition with gammarids in response to a large variety of environmental contaminants. The FI index allowed us to compare impacts of contamination at different times. We observed important seasonal variations of *in situ* impacts on feeding activity. For instance in experiment 4, only 7% of the stations showed significant feeding inhibitions in autumn, whereas 54% of the stations were impacted in summer. Such a seasonal variation is also reported by Maltby et al. (2002), who explained this pattern by variation in waterflow. Complementary hypotheses are variation in run-off and more specifically seasonal treatments (pesticides) in agricultural contexts. Because we used standard organisms, such variation in individual responses could not be understood by variation in susceptibility due to changes in the biological status of tested organisms, as in the proposed interpretation of bioassays performed with indigenous organisms (Hagger et al., 2008). Thus, our approach, which makes short-term tests comparable in time would facilitate the inclusion of the seasonality of *in situ* toxicity for water quality assessment.

The transplantation of standard organisms only supplies partial information to understand long-term chronic impacts of contamination on higher integration levels of biological organization (Liber et al., 2007). Nevertheless, feeding inhibition is of great interest for such multi-scale assessment. On one hand FR is recognized as an ecologically relevant endpoint because it can be related to alteration in life-history traits, and mechanistic modelling is proposed to fill the gap between feeding inhibition and drop in population dynamics in particular with *Gammarus* (Baird et al., 2007). Because they are keystone species in freshwater ecosystems, alteration in



population dynamics of *Gammarus* sp could be interpreted in terms of alteration of ecosystem functioning (e.g. leaf decomposition). On the other hand, feeding inhibition has been correlated with the impact of contaminants with diverse modes of actions traced by the modulation of specific molecular biomarkers (Barata et al., 2007; Xuereb et al., 2009b). This position of FR between biomarkers and fitness traits offers the opportunity to describe adverse outcome pathways in multi-scale assessment schemes (Kramer et al., 2011), which could reinforce weight of evidence approaches for the diagnostic of contaminant impacts on ecosystems (Damásio et al., 2008). It is illusory to think that all sources of uncertainty (standard vs indigenous organisms, within-population, between-populations, or between-species variability, intra and interspecies interactions, food availability, ...) could be taken into account mechanistically in such a scheme which is based on information obtained with standard organisms in specific experimental conditions. Yet, it has already been shown that reduction of feeding activities of transplanted *Gammarus* can be correlated to reduction in leaf decomposition efficiency in streams, regardless of the presence of *Gammarus* in indigenous communities (Forrow and Maltby, 2000). This underlines the strong potential of FR *in situ* bioassay with *Gammarus* as an ecologically relevant indicator of water quality.

## 5. Conclusions

We proposed an innovative protocol for an *in situ* feeding assay based on the standardisation of FR measurements through the combination of experimental and computational methodologies (caging and statistical modelling). As it corrected the confounding influence of temperature, which appeared as the main environmental influence on *in situ* FR values, our protocol permitted a more accurate assessment of the alteration of feeding activity when between-station comparisons in space and time were performed. A reliable interpretation of our bioassay results was made feasible via the comparison to a distribution of reference values. Such a methodology increased the specificity and the sensitivity of the assay in multiple contaminant, geographical, and seasonal contexts. It also enhanced the relevance of toxicity assessment in site-specific studies by validating reference station measurements. Lastly it could offer the possibility to assess water quality in isolated stations as part of large scale surveys, notably in non-point-source pollution contexts.

Further research will focus on the influence of source population for FR measurements (within and between-species variability), which could limit the development of such bioassays for large scale (national, continental) biomonitoring programs. Modelling approaches will also be developed with *G. fossarum* to extrapolate such assessments of feeding inhibitions to the potential impacts on population dynamics.

## Acknowledgements

RC received financial grants from the Cluster Environnement Région Rhône-Alpes. The present work was partially funded

by the programs ANR 08-CES-014 RESYST, ANR ECCO-ECODYN convention # 06CV050, and the French national agency for water and aquatic ecosystems (ONEMA). We are grateful to T. Pelte (Regional water agency Rhône-Méditerranée-Corse) and A. Tilghman (Cemagref) for providing information from national river reference/control networks for the selection of deployment stations. The authors thank A. Tilghman for her critical reading of the English of the MS.

## Appendix. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.watres.2011.09.035.

## REFERENCES

- Alonso, A., De Lange, H.J., Peeters, E.T.H.M., 2009. Development of a feeding behavioural bioassay using the freshwater amphipod *Gammarus pulex* and the multispecies freshwater biomonitor. *Chemosphere* 75 (3), 341–346.
- Baird, D.J., Brown, S.S., Lagadic, L., Liess, M., Maltby, L., Moreira-Santos, M., Schulz, R., Scott, G.I., 2007. *In situ*-based effects measures: determining the ecological relevance of measured responses. *Integrated Environmental Assessment and Management* 3 (2), 259–267.
- Barata, C., Damasio, J., Lopez, M.A., Kuster, M., de Alda, M.L., Barcelo, D., Riva, M.C., Raldua, D., 2007. Combined use of biomarkers and *in situ* bioassays in *daphnia magna* to monitor environmental hazards of pesticides in the field. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26 (2), 370–379.
- Blockwell, S.J., Taylor, E.J., Jones, I., Pascoe, D., 1998. The influence of fresh water pollutants and interaction with *Asellus aquaticus* (L.) on the feeding activity of *Gammarus pulex* (L.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 34 (1), 41–47.
- Chapman, P.M., 2007. Determining when contamination is pollution-weight of evidence determinations for sediments and effluents. *Environment International* 33 (4), 492–501.
- Crane, M., Delaney, P., Mainstone, C., Clarke, S., 1995. Measurement by *in situ* bioassay of water quality in an agricultural catchment. *Water Research* 29 (11), 2441–2448.
- Dagnino, A., Sforzini, S., Dondero, F., Fenoglio, S., Bona, E., Jensen, J., Viarengo, A., 2008. A "Weight-of-Evidence" approach for the integration of environmental "Triad" data to assess ecological risk and biological vulnerability. *Integrated Environmental Assessment and Management* 4 (3), 314–326.
- Damásio, J., Tauler, R., Teixidó, E., Rieradevall, M., Prat, N., Riva, M.C., Soares, A.M.V.M., Barata, C., 2008. Combined use of *Daphnia magna* *in situ* bioassays, biomarkers and biological indices to diagnose and identify environmental pressures on invertebrate communities in two Mediterranean urbanized and industrialized rivers (NE Spain). *Aquatic Toxicology* 87 (4), 310–320.
- DeDourge-Geffard, O., Palais, F., Biagianni-Risbourg, S., Geffard, O., Geffard, A., 2009. Effects of metals on feeding rate and digestive enzymes in *Gammarus fossarum*: an *in situ* experiment. *Chemosphere* 77 (11), 1569–1576.
- Fielding, N.J., MacNeil, C., Dick, J.T.A., Elwood, R.W., Riddell, G.E., Dunn, A.M., 2003. Effects of the acanthocephalan parasite *Echinorhynchus truttae* on the feeding ecology of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *Journal of Zoology* 261 (3), 321–325.
- Forrow, D.M., Maltby, L., 2000. Toward a mechanistic understanding of contaminant-induced changes in detritus



- processing in streams: Direct and indirect effects on detritivore feeding. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19 (8), 2100–2106.
- Galloway, T.S., Brown, R.J., Browne, M.A., Dissanayake, A., Lowe, D., Depledge, M.H., Jones, M.B., 2006. The ECOMAN project: a novel approach to defining sustainable ecosystem function. *Marine Pollution Bulletin* 53 (1–4), 186–194.
- Gerhardt, A., 1995. *Effect of Metals on Stream Invertebrates*. Lund University.
- Hagger, J.A., Jones, M.B., Lowe, D., Leonard, D.R.P., Owen, R., Galloway, T.S., 2008. Application of biomarkers for improving risk assessments of chemicals under the water framework directive: a case study. *Marine Pollution Bulletin* 56 (6), 1111–1118.
- Hanson, N., Förlin, L., Larsson, Å., 2010. Spatial and annual variation to define the normal range of biological endpoints: an example with biomarkers in perch. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29 (11), 2616–2624.
- Kater, B.J., Postma, J.F., Dubbeldam, M., Prins, J.T.H.J., 2001. Comparison of laboratory and in situ sediment bioassays using *Corophium volutator*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (6), 1291–1295.
- Kooijman, S.A.L.M., 2000. *Dynamic Energy and Mass Budgets in Biological Systems*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kramer, V.J., Etterson, M.A., Hecker, M., Murphy, C.A., Roesijadi, G., Spade, D.J., Spromberg, J.A., Wang, M., Ankley, G.T., 2011. Adverse outcome pathways and ecological risk assessment: Bridging to population-level effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30 (1), 64–76.
- Krell, B., Moreira-Santos, M., Ribeiro, R., 2011. An estuarine mudsnail in situ toxicity assay based on post-exposure feeding. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30 (8), 1935–1942.
- Lacaze, E., Devaux, A., Mons, R., Bony, S., Garric, J., Geffard, A., Geffard, O., 2011. DNA damage in caged amphipods *Gammarus fossarum*: a tool for freshwater quality assessment. *Environmental Pollution* 159 (6), 1682–1691.
- Letini, S.E., Sukhdeo, M.V.K., 2010. The energetic cost of parasitism in isopods. *Ecoscience* 17 (1), 1–8.
- Liber, K., Goodfellow, W., den Besten, P., Clements, W., Galloway, T., Gerhardt, A., Green, A., Simpson, S., 2007. In situ-based effects measures: considerations for improving methods and approaches. *Integrated Environmental Assessment and Management* 3 (2), 246–258.
- Lozano, S.J., Gedeon, M.L., Landrum, P.F., 2003. The effects of temperature and organism size on the feeding rate and modeled chemical accumulation in *Diporeia* spp. for Lake Michigan sediments. *Journal of Great Lakes Research* 29 (1), 79–88.
- Macedo-Sousa, J.A., Pestana, J.L.T., Gerhardt, A., Nogueira, A.J.A., Soares, A.M.V.M., 2007. Behavioural and feeding responses of *Echinogammarus meridionalis* (Crustacea, Amphipoda) to acid mine drainage. *Chemosphere* 67 (8), 1663–1670.
- Maltby, L., 1999. Studying stress: the importance of organism-level responses. *Ecological Applications* 9 (2), 431–440.
- Maltby, L., Clayton, S.A., Wood, R.M., McLoughlin, N., 2002. Evaluation of the *Gammarus pulex* in situ feeding assay as a biomonitor of water quality: robustness, responsiveness, and relevance. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21 (2), 361–368.
- Maltby, L., Crane, M., 1994. Responses of *Gammarus pulex* (Amphipoda, crustacea) to metalliferous effluents: identification of toxic components and the importance of interpopulation variation. *Environmental Pollution* 84 (1), 45–52.
- Maltby, L., Naylor, C., Calow, P., 1990a. Effect of stress on a freshwater benthic detritivore: scope for growth in *Gammarus pulex*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 19 (3), 285–291.
- Maltby, L., Naylor, C., Calow, P., 1990b. Field deployment of a scope for growth assay involving *Gammarus pulex*, a freshwater benthic invertebrate. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 19 (3), 292–300.
- McCahon, C.P., Brown, A.F., Pascoe, D., 1988. The effect of the acanthocephalan *Pomphorhynchus laevis* (Muller 1776) on the acute toxicity of cadmium to its intermediate host, the amphipod *Gammarus pulex* (L.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 17 (2), 239–243.
- Moreira, S.M., Moreira-Santos, M., Guilhemino, L., Ribeiro, R., 2006. An in situ postexposure feeding assay with *Carcinus maenas* for estuarine sediment-overlying water toxicity evaluations. *Environmental Pollution* 139 (2), 318–329.
- Mouneyrac, C., Perrein-Ettajani, H., Amiard-Triquet, C., 2010. Influence of anthropogenic stress on fitness and behaviour of a key-species of estuarine ecosystems, the ragworm *Nereis diversicolor*. *Environmental Pollution* 158 (1), 121–128.
- Nilsson, L.M., 1974. Energy budget of a laboratory population of *Gammarus pulex* (Amphipoda). *Oikos* 25 (1), 35–42.
- Pascoe, D., Kedwards, T.J., Blockwell, S.J., Taylor, E.J., 1995. *Gammarus pulex* (L.) feeding bioassay - Effects of parasitism. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 55 (4), 629–632.
- R Development Core Team, 2008. *R: a Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing.
- Soares, S., Moreira, S., Andrade, S., Guilhemino, L., Ribeiro, R., 2005. Freshwater-saltwater interface and estuarine sediment in situ assays based on post-exposure feeding of chironomids and polychaetes. *Estuaries* 28 (2), 314–319.
- Sutcliffe, D.W., Carrick, T.R., Willoughby, L.G., 1981. Effects of diet, body size, age and temperature on growth rates in the amphipod *Gammarus pulex*. *Freshwater Biology* 11 (2), 183–214.
- Veerasingham, M., Crane, M., 1992. Impact of farm waste on freshwater invertebrate abundance and the feeding rate of *Gammarus pulex* L. *Chemosphere* 25 (6), 869–874.
- Xuereb, B., Bezin, L., Chaumot, A., Budzinski, H., Tutundjian, R., Garric, J., Geffard, O., 2011. Vitellogenin-like gene expression in freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): Characterization and potential of use as endocrine disruption biomarker in males. *Ecotoxicology* 20 (6), 1286–1299.
- Xuereb, B., Chaumot, A., Mons, R., Garric, J., Geffard, O., 2009a. Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda). Intrinsic variability, reference levels, and a liable tool for field surveys. *Aquatic Toxicology* 93 (4), 225–233.
- Xuereb, B., Lefèvre, E., Garric, J., Geffard, O., 2009b. Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration. *Aquatic Toxicology* 94 (2), 114–122.





## **Résumé**

Les réglementations conduisent à multiplier les évaluations du risque écologique lié au rejet des substances chimiques dans les milieux aquatiques avec pour objectif de protéger les populations naturelles. Cependant, ce niveau de protection visé ne peut être utilisé facilement pour établir un lien direct entre une contamination et ses effets. Pour palier à cette difficulté, les approches multi-échelles basées sur l'étude des effets des contaminations sur des marqueurs individuels puis sur l'extrapolation de ces effets au niveau des populations à partir de modèles de dynamique de population représentent des démarches prometteuses et commencent à être bien acceptées dans les démarches prédictives. Cependant, leur utilisation pour le diagnostic de la qualité des milieux aquatiques reste pour le moment très rare, d'une part en raison de la forte variabilité des réponses des marqueurs individuels *in situ* liée à l'influence de divers facteurs environnementaux confondants pour l'évaluation de la toxicité et d'autre part à cause du manque de pertinence environnementale des modèles actuellement proposés.

Centré sur l'utilisation de deux espèces couramment observées dans les cours d'eau européens et présentant des caractéristiques écologiques et phylogénétiques contrastées : le crustacé *Gammarus fossarum* et le mollusque *Potamopyrgus antipodarum*, ce travail doctoral a pour objectif : 1- de proposer une méthodologie pour prendre en compte l'influence des facteurs de confusion dans le but d'améliorer la lecture des bioessais *in situ* basés sur la mesure de marqueurs individuels sur des organismes engagés et 2- de développer des modèles de dynamique de population écologiquement pertinents. Ainsi, nos travaux ont permis, pour différents tests *in situ* basés sur la mesure de marqueurs individuels sur des organismes engagés, de souligner l'importance de la prise en compte des facteurs de confusion (*i.e.*, température). De plus, nous avons paramétré des modèles de dynamique de population pour les deux espèces dans le but de tester l'influence des histoires de vie et des variations saisonnières sur la sensibilité démographique des populations.

**Mots clés :** *G. fossarum*, *P. antipodarum*, modélisation, engagement *in situ*, dynamique de population, variabilité saisonnière, facteurs de confusion.

## **Abstract**

The regulatory framework lead to increase the assessments of the ecological risk linked to the discharge of chemical substances in aquatic environment with the aim to protect natural populations. However, this targeted level of protection cannot be used so easily to establish a direct link between a contamination and its effects. In order to overcome this difficulty, the multi-scale approaches based on the study of the effects of the contaminations on individual markers and then on the extrapolation of these effects at the population level with population dynamic models represent promising tools and start to be well accepted in predictive processes. Yet, their use for the diagnosis of water quality remains rare for the moment, on the one hand, because of the important variability of answers of individual markers *in situ* linked to the influence of diverse confounding environmental factors for the assessment of toxicity and, on the other hand, because of the lack of environmental relevance of models currently proposed.

Focused on the use of 2 species widely observed in European rivers and presenting contrasting ecological and phylogenetic characteristics: the *Gammarus fossarum* crustacean and the *Potamopyrgus antipodarum* mollusc, this doctoral degree aims to first propose a methodology to consider the influence of confounding factors in order to improve the reading of biological *in situ* tests based on the measurement of individual markers on caged organisms and second, to develop ecologically relevant population models. Thus, this works allowed to underline the importance of the consideration of confounding factors (*i.e.*, temperature), in different *in situ* tests based on the measurement of individual markers on caged organisms. Moreover, population models for both species have been defined in order to test the influence of life histories and seasonal variations on demographic sensitivity of populations.

**Keywords:** *G. fossarum*, *P. antipodarum*, modelling, *in situ* caging, population dynamic, seasonal variability, confounding factors