

# Évaluation du risque écotoxicologique dans les milieux aquatiques à partir d'expérimentations de laboratoire. Perspectives offertes par la modélisation

■ A. PERY<sup>1</sup>

Mots-clés : écotoxicologie, modélisation, changement d'échelle, laboratoire-terrain

Keywords: ecotoxicology, modelling, scale change, laboratory-field

## Introduction

Pour des raisons pratiques, l'écotoxicologie s'est d'abord centrée sur l'étude de l'effet des polluants sur les organismes via des bioessais réalisés en laboratoire (survie, reproduction), avec une démarche proche de la toxicologie. En effet, ces bioessais sont réalisés avec une espèce, exposée à une gamme de concentrations toxiques, et l'effet n'est recherché la plupart du temps que sur un paramètre biologique unique (survie, croissance, comportement...). En conséquence, ils ne permettent pas d'appréhender directement la complexité du terrain où des populations d'organismes de diverses espèces sont exposées à des mélanges de contaminants et où interfèrent les différents effets observés, mais pas nécessairement de manière additive.

En outre, les tests actuels sont inadaptés pour une extrapolation convaincante des résultats obtenus au laboratoire. D'une part, les espèces testées sont celles qui se prêtent le plus facilement à la manipulation, dans un temps relativement court. La pertinence écologique n'intervient que trop rarement dans ce choix. D'autre part, le traitement des données s'effectue soit à partir de courbes *ad hoc* servant à estimer des concentrations donnant lieu à 50 % d'effet, soit à partir de tests d'hypothèse pour déterminer des concentrations sans effet significatif. Ces approches sont peu satisfaisantes, dans la mesure où le résultat est dépendant du temps d'exposition, ce qui ne

permet aucune extrapolation. De plus, les paramètres estimés n'ont aucune signification, ni biologique, ni toxicologique [KOOIJMAN et BEDAUX, 1996]. De manière plus générale, les modèles statistiques ou mécanistiques cherchant à établir des liens directs entre la concentration d'exposition et les effets sont à rejeter lorsque l'on s'intéresse à des situations environnementales pour lesquelles les concentrations d'exposition peuvent varier au cours du temps.

Les connaissances biologiques, écologiques et toxicologiques disponibles peuvent guider la mise en place d'outils de sélection des espèces les plus pertinentes et permettre une démarche de modélisation complète pour relier les effets au niveau de cibles biologiques, les effets au niveau des individus et les conséquences projetées sur des populations.

## 1. Sélection d'une batterie d'espèces

Un problème crucial en écotoxicologie concerne la représentativité des espèces testées. Les tests de toxicité sont généralement réalisés pour les espèces qui composent le jeu de données standard : une algue, la daphnie et un poisson. Cependant, [SLOOFF *et al.*, 1983] ont montré que ces espèces ne sont pas représentatives de la gamme de sensibilité de 22 espèces aquatiques exposées à 15 contaminants différents. La batterie de tests standards ne permet donc pas de protéger efficacement la communauté pour l'ensemble des produits existants. Le problème de la représentativité des espèces choisies pour les tests, par rapport aux espèces composant la communauté, a par ailleurs été soulevé dans le cadre des SSD (*Species Sensitivity*

<sup>1</sup> Ineris – Parc Alata BP2 – 60550 Verneuil-en-Halatte.  
Cemagref – Groupement de Lyon – 69009 Lyon.

*Distribution*) qui visent à rendre compte de la distribution de sensibilité, supposée normale, au sein d'une communauté d'espèces. En effet, la forme des courbes obtenues dépend des groupes taxonomiques pris en compte. Par exemple, lors de leur étude de la toxicité du fenitrothion (herbicide), [VAN DEN BRINK *et al.*, 2005] ont montré que la concentration susceptible d'avoir un effet sur 5 % des espèces peut varier d'un facteur 1 000 en fonction des espèces prises en compte dans la distribution. Ceci s'explique par le fait que les effets d'une substance chez les différents groupes taxonomiques varient en fonction du temps d'exposition des organismes, ainsi que du mode d'action du produit. Ainsi, l'évaluation des effets par l'approche SSD est actuellement réalisée en prenant en compte au moins huit groupes taxonomiques différents. Outre les critères taxonomiques, les lignes directrices soulignent la nécessité de tenir compte de la diversité des espèces aquatiques concernant les caractéristiques du cycle de vie, les modes d'alimentation, l'habitat des organismes et les niveaux trophiques lors du choix des espèces à inclure dans les SSD. Cependant, il n'existe actuellement pas de méthode qui permette de s'assurer que cette exigence soit bien remplie.

Nous proposons une démarche de sélection de quelques espèces afin d'une part, de réaliser des tests de laboratoire et d'autre part, de représenter la biodiversité d'une communauté naturelle de façon simplifiée, mais pertinente d'un point de vue écotoxicologique.

### 1.1. Sélection des espèces testées [DUCROT *et al.*, 2005]

La sélection a été réalisée en deux étapes. Premièrement, les taxa<sup>1</sup> appartenant à la communauté étudiée (communauté benthique du sud-est de la France) ont été regroupés sur la base de la similarité de leurs combinaisons de traits biologiques et écologiques. Ainsi, la diversité fonctionnelle de la communauté a été résumée par les caractéristiques biologiques et écologiques moyennes de chaque groupe fonctionnel.

<sup>1</sup> Entités conceptuelles regroupant tous les organismes vivants possédant en commun certains caractères bien définis en vue de leur classification (taxonomie).

Dans un second temps, et pour chaque groupe fonctionnel, une seule espèce a été sélectionnée afin de représenter les caractéristiques moyennes de son groupe.

Les caractéristiques biologiques et écologiques des espèces aquatiques ont été obtenues à partir de la base proposée par [USSEGLIO-POLATERA, 1994] et enrichie par [TACHET *et al.*, 2000], car elle contient une grande quantité d'informations (22 variables biologiques et écologiques pour 479 taxa observables en Europe de l'Ouest, identifiés majoritairement au genre) et parce que cette information est pertinente par rapport à nos objectifs. En effet, la combinaison de neuf des onze traits écologiques renseignés dans cette base permet de décrire de façon pertinente les relations entre les traits biologiques et écologiques des taxa et les caractéristiques de leur habitat [USSEGLIO-POLATERA, 1994]. Les traits biologiques étudiés décrivent l'histoire de vie des taxa (taille maximale, durée du cycle de vie, nombre de générations par an, stades aquatiques durant le cycle de vie), les capacités de résilience du taxon (formes de résistance, capacité et mode de dispersion) et les caractéristiques liées à l'exposition du taxon, définie par son comportement dans le milieu (mode de reproduction, mode d'alimentation, type de nourriture ingérée, mode de locomotion et relation au substrat) et son anatomie (mode de respiration). Les traits écologiques étudiés décrivent la distribution longitudinale et altitudinale des taxa, leurs degrés de trophie et de saprobie, leurs préférences de salinité, de température, de vitesse de courant et de substrat. Chacun des traits étudiés se décline en différentes modalités. Concrètement, une modalité correspond à une classe de la variable « trait » (par exemple : broyeur, filtreur, détritivore, etc., pour la variable « mode d'alimentation »).

La construction des groupes fonctionnels repose sur l'analyse statistique des traits biologiques et écologiques des taxa, ainsi que des relations existant entre ces traits. Dans le cadre de notre communauté benthique d'aval des cours d'eau, nous avons choisi de nous limiter à six groupes pour les 109 taxa étudiés. Le groupe fonctionnel 1 est constitué d'« outliers » : aucun représentant de ce groupe ne sera inclus dans la batterie de tests. Les groupes 2 et 4 présentent de

larges effectifs. Ils rassemblent les organismes itéro-pares à cycle de vie long ( $> 1$  an), sans diapause. Ces groupes comprennent principalement des Oligochètes, le groupe 2 comportant l'ensemble de la famille des Tubificidae et le groupe 4 comportant l'ensemble des Lumbriculidae et de nombreux représentants de la famille des Naididae. Les groupes 3 et 5 rassemblent les organismes semelpares à cycle de vie court ( $\leq 1$  an), épibenthiques ou fousseurs. Ces groupes sont principalement représentés par des mollusques (43 % et 39 % respectivement), les bivalves étant rassemblés dans le groupe 3 et les gastéropodes dans le groupe 5. Le groupe 6 présente la plus grande diversité spécifique. Il rassemble principalement des insectes : trichoptères (31 %), éphéméroptères (14 %), odonates (9 %) et diptères (9 %).

Pour chaque groupe, nous avons choisi le représentant le plus proche du barycentre du groupe, qui permette la mise en place de tests de laboratoire. Finalement, notre sélection regroupe les taxa suivants : *Branchiura sowerbyi*, *Chironomus riparius*, *Lumbriculus variegatus*, *Valvata piscinalis* et *Sericostoma personatum*. *B. sowerbyi*, *V. piscinalis* et *S. personatum* ne sont pas communément utilisées en écotoxicologie.

## 1.2. Validation de la sélection

Nous avons utilisé partiellement la batterie d'espèces définie précédemment, avec trois des espèces issues de notre sélection (*B. sowerbyi*, *V. piscinalis* et *C. riparius*), pour des raisons pratiques (une thèse, en l'occurrence celle de Virginie Ducrot, ne dure que trois ans...). Nous avons appliqué la démarche de changement d'échelle présentée dans le chapitre 2 pour déterminer des concentrations sans effet du zinc au niveau des populations (CSESP).

D'après ces seuils, l'espèce la plus sensible au zinc parmi les trois espèces que nous avons étudiées est *V. piscinalis*. D'après notre étude, les populations de laboratoire de *V. piscinalis* sont significativement perturbées par la présence de zinc lorsque sa concentration dans le sédiment dépasse 259 mg/kg. Cette valeur constitue donc une base pour évaluer notre concentration sans effet du zinc sur la communauté théorique d'invertébrés benthiques dans nos conditions expérimentales (en particulier, avec le sédiment naturel que nous avons sélectionné).

Nous avons comparé cette valeur avec les résultats d'une étude *in situ*, réalisée par [BURTON *et al.*, 2005]. Cette étude était destinée à valider, sur le terrain, les valeurs de concentrations sans effet du zinc sur les communautés benthiques prédites par le modèle AVS-SEM (modèle qui permet de prendre en compte la biodisponibilité du zinc lors de la prédiction de ses effets toxiques). Dans cette étude, des sédiments naturels provenant de quatre stations différentes ont été enrichis en zinc au laboratoire (concentrations nominales testées : 0, 400 et 1 200 mg/kg), puis re-transférés sur le terrain. Les auteurs ont ensuite suivi la colonisation des sédiments par les invertébrés benthiques, puis l'évolution de la structure taxonomique de la communauté en neuf mois (trois dates d'échantillonnage), en fonction de la concentration en zinc. Cette étude a montré que dans un sédiment dont les caractéristiques physico-chimiques (en particulier le taux de carbone organique et la granulométrie) sont proches de celles du sédiment que nous avons utilisé pour réaliser nos tests de toxicité, la présence de zinc à hauteur de 358 mg/kg n'affecte pas significativement la structure de la communauté benthique. Par ailleurs, la concentration sans effet du zinc sur la communauté benthique prévue à partir du modèle AVS-SEM pour le sédiment que nous avons enrichi pour nos tests au laboratoire (caractérisé par un taux de carbone organique de l'ordre de 3 %) est supérieure ou égale à 218 mg/kg.

Ces résultats montrent que notre approche nous permet d'estimer au laboratoire une concentration sans effet du zinc sur les communautés benthiques relativement fiable, et pour une charge de travail a priori moindre que dans l'expérience entreprise par [BURTON *et al.*, 2005] sur le terrain.

## 2. Modèles d'effets pour les individus et les populations

Nous allons nous intéresser à plusieurs types de modèles, les modèles d'effets à fondement énergétique, pour relier perturbation de l'acquisition et de l'utilisation de l'énergie et effets sur la croissance et la reproduction, et deux types de modèles de changement d'échelle de l'individu à la population, le premier se

focalisant sur le taux d'accroissement, le deuxième s'intéressant à la biomasse.

## 2.1. Modèles d'effets à fondement énergétique

### 2.1.1. Modélisation de la cinétique

Pour obtenir une certaine pertinence toxicologique, il s'agit d'abord de s'intéresser aux relations entre l'accumulation d'un composé et ses effets. Cette accumulation peut être reliée à la concentration dans le milieu. Généralement, on utilise un modèle toxicocinétique simple, dit modèle linéaire à un compartiment, réaliste du point de vue biologique. L'absorption du composé est supposée proportionnelle à sa concentration en solution, et son élimination proportionnelle à sa concentration interne. On obtient alors l'équation suivante :

$$\frac{dC_i}{dt}(t) = k_a \times c_c(t) - k_e \times C_i(t),$$

où  $C_i$  est la concentration interne du composé,  $c_c$  sa concentration en solution,  $k_a$  et  $k_e$  respectivement son taux d'absorption et d'élimination par l'organisme. Ce modèle cinétique est commun à la plupart des approches de modélisation des effets. Il a l'avantage d'être le plus simple des modèles de cinétique de contamination, et de disposer de méthodes classiques d'estimation des paramètres. Cette simplicité peut constituer une faiblesse substantielle de l'approche modélisation des effets si le composé est métabolisé ou si la cinétique de contamination met en jeu plusieurs compartiments biologiques au sein d'un organisme. Il faut alors soit revoir le modèle de cinétique en ajoutant des paramètres supplémentaires, ce qui rend l'analyse des données moins précises, soit effectuer, en parallèle des tests de toxicité, des mesures de bioaccumulation destinées à établir une courbe de cinétique.

La prise en compte de la cinétique des composés présente néanmoins l'avantage de rendre compte des aspects temporels de l'exposition. Dans les modèles d'effet, l'effet est directement relié à la concentration interne, sans autre intervention du facteur temps que la détermination de cette concentration grâce au modèle de cinétique. Ceci permet de déterminer des paramètres d'effet indépendants du temps. D'autre

part, le modèle de cinétique pouvant prendre en compte des variations de la concentration dans le milieu, les effets peuvent être analysés, même en cas d'expositions variables [PÉRY *et al.*, 2001].

### 2.1.2. Bases biologiques pour les modèles d'effets

Pour mettre au point des modèles pertinents d'analyse des effets, il est crucial de disposer d'un modèle rendant compte de la biologie des organismes étudiés, en particulier de la reproduction et de la croissance. Cela permet de cibler les paramètres dont une perturbation est susceptible d'affecter les grandes fonctions biologiques et de quantifier la façon dont cette perturbation va se transmettre. Il peut s'agir, par exemple, du taux d'assimilation de la nourriture ou du coût de fonctionnement d'une cellule. Les modèles d'effets actuellement disponibles sont relatifs à une perturbation de la gestion de l'énergie par les organismes, et reposent tous sur la théorie DEB (*Dynamic Energy Budgets*), développée par [KOOIJMAN, 2000].

Cette théorie a pour objectif de décrire quantitativement, par des modèles mathématiques réalistes, les grandes fonctions biologiques des organismes (nutrition, digestion, croissance, reproduction, maintenance et vieillissement). La représentation schématique de la théorie est présentée par la figure 1. L'énergie de l'organisme provient de la nourriture qui est absorbée à une vitesse proportionnelle à la surface du tube digestif de l'organisme, chaque unité de surface étant considérée comme homogène dans le temps et dans l'espace. La théorie DEB suppose ensuite l'exis-

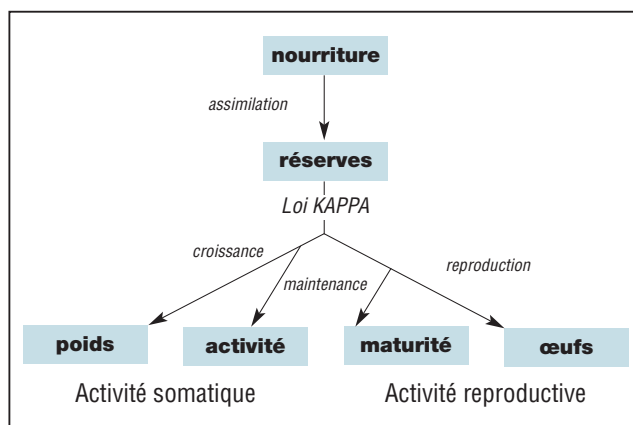


Figure 1. Représentation schématique de la répartition de l'énergie dans la théorie DEB

tence d'une loi, dite loi Kappa, qui répartit l'énergie entre la part somatique et la part reproductive. De la part somatique, une portion est allouée à la maintenance des fonctions vitales, le reste étant consacré à la croissance du volume.

Les applications de la théorie DEB sont multiples, par exemple en cancérologie, en théorie de l'évolution et même en paléontologie. En écotoxicologie, domaine qui intéresse au plus haut point notre laboratoire, la théorie DEB a donné naissance aux modèles à fondement énergétique que nous présentons dans le sous-chapitre suivant.

### 2.1.3. Modèles à fondement énergétique

Dans le cadre de ces modèles, nous supposons l'existence d'une concentration seuil sans effet (CSE). Ainsi, nous considérons que l'organisme peut supporter une certaine concentration en xénobiotiques, soit en les inhibant par différents mécanismes de pièges, soit parce que suffisamment de fonctions sont valides pour un fonctionnement normal de l'individu. Une fois l'organisme incapable de supporter la quantité de toxique accumulée, il y a proportionnalité entre l'effet observé et l'excès de toxique, et nous appellerons « taux de toxicité », le facteur de proportionnalité  $ki$  entre effets et dépassement du seuil.

$$\text{Effet} = ki(Ci - \text{CSE})$$

Dans le cadre des modèles d'effets à fondement énergétique, l'effet est une perturbation des paramètres de la théorie DEB que nous avons décrits dans le sous-chapitre précédent. Le mode d'action physiologique du toxique correspond au paramètre affecté. Plus précisément, pour la survie, l'effet est une augmentation du taux de mortalité. Pour la croissance, il s'agit, ou bien d'une augmentation du coût de la maintenance, d'une augmentation du coût de construction de nouveaux tissus, ou bien de la diminution du taux de nutrition. Pour la reproduction, il s'agit, soit d'un effet sur la croissance qui réduirait la reproduction, soit d'une réduction directe de la fécondité. La qualité de la description des données peut théoriquement permettre de déterminer le mode d'action des toxiques si celui-ci est inconnu au moment du test. Cette détermination est cependant délicate et réclame généralement la mise en place d'un nouveau test de toxicité. Au cours de ce second test, pour chaque mode d'action possible, les prédic-

tions du modèle, calibré avec les données du premier test, sont comparées aux données mesurées. Les conditions expérimentales du second test (durée, quantités de nourriture) sont à choisir de manière à ce que les prédictions diffèrent de manière substantielle, ce qui permet de mettre en évidence un mode d'action.

À titre d'exemple, nous avons cherché à connaître le mode d'action d'un anti-parasite connu sur la daphnie *Daphnia magna*. Pour cela, nous avons réalisé des tests standards, en conditions de nourriture *ad libitum*. Nous avons pu mettre en évidence des effets sur la croissance et sur la survie en 21 jours dès la concentration 0.001 µg/l, ce qui est extrêmement faible, à la limite des possibilités de mesures chimiques. Deux tests, réalisés à quelques mois d'intervalle, ont montré des effets sur la croissance de l'ordre de 25 % pour cette concentration sur l'ensemble du test. Nous avons analysé les données avec nos modèles d'effets fondés sur l'énergie, pour trois modes d'action (effet sur l'assimilation de nourriture, sur le coût de croissance et sur le coût de maintenance). Une expérience en conditions nutritives restrictives (4 fois inférieures au niveau optimal) a ensuite été réalisée. Nous avons alors comparé les données obtenues aux prévisions basées sur les différents modèles de croissance, adaptés aux conditions restrictives (figure 2). Les prédictions sont présentées en fonction du mode d'action.

Il apparaît ainsi que le meilleur ajustement est obtenu avec la courbe correspondant à un effet sur la vitesse d'assimilation de la nourriture. Ceci est cohérent avec des informations d'atteinte des fonctions nutritives obtenues au laboratoire du Cemagref de Lyon sur d'autres organismes (gammarets).

Nous avons montré, en outre, au cours de nos différentes analyses de données d'écotoxicologie, la robustesse des paramètres estimés, en particulier vis-à-vis du temps. Non seulement les estimations sont stables pour des tests de durées croissantes, mais nous avons aussi montré que nous pouvions estimer de manière fiable les paramètres, même pour des concentrations d'exposition variables au cours du temps. De la sorte, les modèles que nous avons développés ont une très bonne capacité de prédiction, même pour des conditions éloignées de celles des tests [PÉRY *et al.*, 2002].

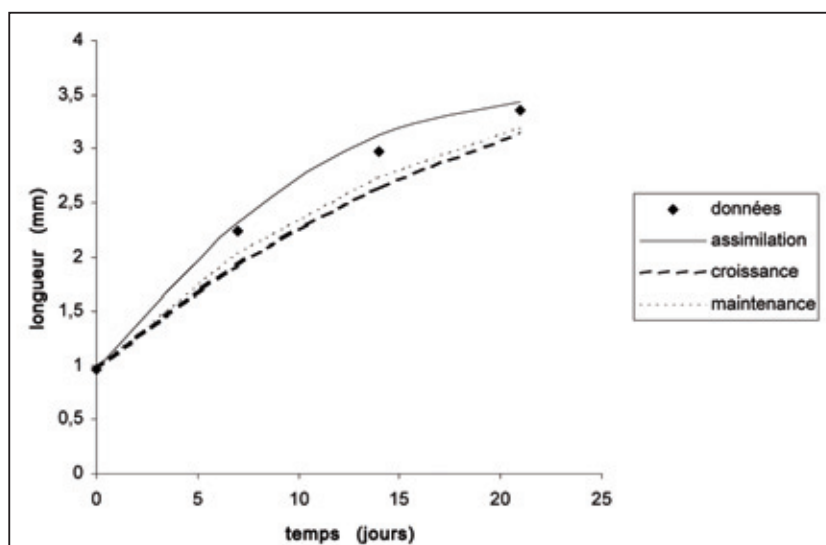


Figure 2. Croissance de daphnies exposées à une concentration de 0.001 ng/l d'anti-parasite en conditions de nutrition restrictives

Ceci est la garantie de pertinence du changement d'échelle de l'individu à la population, qui se doit de rendre compte des effets sur de longues périodes (au moins une génération).

## 2.2. Changement d'échelle de l'individu à la population

### 2.2.1. Étude de la densité des populations

Les notions de perturbation de la biomasse et de la densité n'ont quasiment jamais été abordées par la modélisation. Or, il s'agit de concepts pour lesquels l'étude expérimentale est longue (typiquement plusieurs générations), et donc où la modélisation peut permettre de gagner du temps. En outre, nos modèles au niveau individuel sont particulièrement adaptés à ce type d'étude dans la mesure où ils rendent compte de l'utilisation de l'énergie au niveau d'un individu. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement au chironome. Ce dernier est, en effet, la source de nourriture de nombreux oiseaux et poissons, d'où l'intérêt de préserver son niveau de biomasse. Nous nous focalisons sur les individus du deuxième stade et les adultes. En effet, certains oiseaux, comme les jeunes canards Col-Vert se nourrissent en majorité de chironomes adultes. Les chironomes adultes contribuent aussi à nourrir araignées, scarabées, mouches et fourmis. De même, les salmonidés ont développé des capacités de visions dans des conditions de luminosité faible et exploitent ainsi le stade nymphe (qui

est surtout nocturne) pour se nourrir. En ce qui concerne l'intérêt porté au deuxième stade, il faut savoir que certains poissons se nourrissent plus de petits chironomes que de grands chironomes, qui sont mieux protégés dans leurs fourreaux.

Nous avons étudié, à l'équilibre de la dynamique de population, le nombre d'individus du deuxième stade et le nombre d'adultes produits par génération. La population étudiée se limite à une cohorte, ce qui est cohérent par rapport à l'écologie du chironome, puisqu'il y a synchronisation des individus au cours de l'hiver. L'équilibre s'obtient, pour des conditions données de toxicité (écart à l'émergence, mortalité, diminution du nombre d'œufs par femelle), en ajustant la quantité de nourriture par larve et par jour, pour amener le taux d'accroissement de la population à 1. Des simulations effectuées sur plusieurs générations ont montré que cet équilibre est rarement atteint, mais que d'une génération à l'autre, la population fluctue autour de cet équilibre. L'introduction d'un seuil maximum de densité, préconisé pour l'étude des chironomes, permet en outre de limiter les variations de la densité de population autour de l'équilibre défini. Un effet sur le nombre de chironomes à cet équilibre nous semble une bonne mesure d'un effet sur la densité moyenne.

Nous avons effectué une étude de sensibilité du modèle par rapport aux effets individuels. L'effet sur la reproduction se transmet peu au niveau de la

population. De la même manière, la mortalité du deuxième stade n'a d'impact réel que si la mortalité quotidienne est supérieure à 35 %. En revanche, l'impact d'une augmentation de l'écart à l'émergence entre mâles et femelles (corrélé à une atteinte du développement ou de la croissance) est plus fort. Le paramètre ayant le plus de répercussions au niveau population est la mortalité sur l'ensemble des stades, une mortalité quotidienne de 2 % (équivalent à 18 % sur 10 jours) et une mortalité quotidienne de 5 % (équivalent à 40 % sur 10 jours) entraînant respectivement une réduction d'un tiers et de plus de la moitié de la densité d'adultes.

Nous avons appliqué le changement d'échelle proposé à partir de données d'effets sur des chironomes exposés à des sédiments enrichis en cuivre. Les paramètres du cycle de vie, dont le poids sur la dynamique de population est le plus important, sont ceux qui sont les moins sensibles au cuivre. Ainsi, la population disparaît, même en cas d'absence d'effets létaux aux troisième et quatrième stades. Dans le même ordre d'idées, les effets sur la reproduction, dont le seuil d'apparition de la toxicité est très faible, ne produisent pas d'effet notable sur la population. D'où l'intérêt, pour l'évaluation du risque, d'intégrer les données individuelles au niveau de la population. Sans surprise, les effets d'un contaminant à l'échelle de la population correspondent à l'interaction entre la sensibilité du paramètre descriptif de la population à une modification des paramètres du cycle de vie et de la sensibilité de ces paramètres au contaminant.

### 2.2.2. Étude du taux d'accroissement des populations

Pour passer de l'échelle des individus à celle de la population et déterminer le taux d'accroissement de la population, nous avons choisi d'utiliser des modèles matriciels de dynamique des populations. Il s'agit de modèles en temps discret, où la population est découpée en classes d'âge. Les individus passent d'une classe à une autre à chaque pas de temps selon des taux vitaux (survie, fécondité). Ce type de modèle fournit de nombreux outils démographiques, dont le taux d'accroissement de la population.

Les taux de survie ( $P_i$ ) sont reportés sur la sous-diagonale d'une matrice carrée  $L$  et les taux de fécon-

dité ( $F_i$ ) sur sa première ligne. Si  $N(t)$  est un vecteur dont les composantes sont les effectifs des différentes classes, la dynamique de la population est modélisée par l'équation matricielle  $N(t+1) = L N(t)$ . La figure 3 donne un exemple de graphe de cycle de vie avec la matrice de Leslie associée.

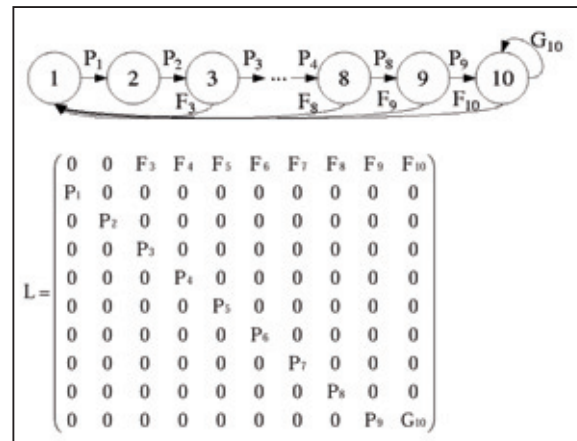


Figure 3. Exemple de graphe de cycle de vie et matrice de Leslie correspondante

Les modèles d'effets nous fournissent une expression du taux de reproduction et de la fonction de survie en fonction du temps et de la concentration en polluant. Cela permet de calculer les taux vitaux en fonction de la concentration d'exposition. À partir de ces taux vitaux, nous pouvons calculer les différentes caractéristiques démographiques comme des fonctions continues de la concentration d'exposition. Nous avons montré qu'il est possible d'utiliser un modèle partiel pour réduire le nombre de paramètres en perdant peu d'information. Le principe est de calculer un  $P_j$ , taux de survie pour tous les individus juvéniles, et un  $P_a$  pour les adultes. La fécondité est, de même, réduite à un seul paramètre  $F$  (moyenne discrète des fécondités pondérée par la distribution d'âge stable). La matrice partielle  $L_p$  est alors :

$$L_p = \begin{pmatrix} 0 & 0 & F & F & F & F & F & F & F & F \\ P_j & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & P_j & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & P_j & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & P_j & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & P_j & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & P_j & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & P_j & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & P_j & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & P_j & G_j \end{pmatrix}$$

Outre sa simplicité, le modèle partiel offre la possibilité de calculer la sensibilité du taux d'accroissement de la population à l'âge de première reproduction, un paramètre démographique clé, en complément de l'analyse de sensibilité du taux d'accroissement de la population par rapport aux autres paramètres étudiés de manière plus courante (survie et reproduction).

### 2.2.3. Détermination de seuils d'effets au niveau des populations

Nous avons décidé de comparer, pour un test donné, nos données de toxicité, non pas au témoin de ce test, mais à la distribution de témoins obtenus au cours de tous les tests réalisés au laboratoire dans les mêmes conditions expérimentales. Ceci permet de s'abstraire de la qualité du témoin associé pour apprécier la toxicité d'un échantillon.

Nous avons donc réalisé pour nos deux paramètres, à l'échelle de la population (densité à l'équilibre asymptotique et taux d'accroissement), des simulations de type Monte Carlo (1 000 simulations), en choisissant chacun des paramètres aléatoirement dans l'intervalle de variation des valeurs de croissance, de survie et de reproduction chez les témoins de notre base de données. Pour le taux d'accroissement de la population de chironomes, nous avons ainsi obtenu une distribution normale. Un échantillon donnant lieu à un taux d'accroissement différent de plus de 10 % de la moyenne de cette distribution est significativement en dehors de cette distribution. Pour la densité à l'équilibre chez le chironome, nous n'avons pas mis en évidence de type connu de distribution. La valeur médiane de cette distribution est de 13 % inférieure par rapport au meilleur témoin possible. Et les 5 % les plus faibles se situent au-delà de 24 % d'effet par rapport au meilleur témoin possible. Ces seuils permettent ensuite de déterminer soit, pour un contaminant donné, une concentration sans effet significatif sur les populations (CSESP), soit, pour un échantillon du terrain, son degré de toxicité.

Cette méthode de détermination de seuils a été appliquée avec succès pour plusieurs espèces et le zinc (voir chapitre 1). Elle a aussi permis d'établir des seuils efficaces pour les concentrations en métaux. En effet, dans le cadre des modèles d'effets sur les individus, les intervalles de confiance des seuils

estimés peuvent contenir 0, ce qui pose des difficultés en termes d'évaluation du risque si l'on se fonde sur ces seuils. Or, ces effets sans seuil significatif se retrouvent souvent pour des paramètres du cycle de vie qui interviennent de manière marginale sur la dynamique de population. Notre méthode d'évaluation de seuils au niveau des populations permet d'éviter de surprotéger en pondérant les effets sur les individus par leur importance pour cette dynamique. Inversement, nous avons montré que l'utilisation de NOECs (*No Observed Effect Concentrations*) pouvait conduire à sous-estimer les effets attendus au niveau des populations, dans la mesure où la résultante au niveau des populations de plusieurs effets non significatifs au niveau des individus peut s'avérer très éloignée des conditions de contrôle.

### 2.2.4. Application de la modélisation pour améliorer les capacités statistiques des études en cosmes [BEAUDOUIN, 2007]

La variabilité entre cosmes<sup>2</sup> des variables descriptives des populations est importante, estimée autour de 51 %. La puissance statistique de la comparaison entre les populations témoins exposées est faible, et seuls des effets importants sont détectables. Accroître le nombre de réplicats est rarement réaliste dans le contexte des cosmes. Une solution envisageable revient à généraliser ce qui vient d'être présenté au paragraphe 2.2.3. : il s'agit de modéliser le comportement d'une population témoin pour diminuer le nombre de réplicats mis en jeu par le contrôle et accroître le nombre de réplicats pour les populations exposées. Un modèle individu-centré a été construit, de manière à prendre en compte différentes densités et différentes températures. Il a ensuite été calibré grâce à deux ans de données et validé sur une autre année. Une plus grande capacité statistique a effectivement été démontrée, en plus d'une aide accrue à l'interprétation des résultats, dans le cadre de différentes études de cas où des populations perturbées étaient comparées à des populations de témoins. La modélisation devrait ainsi contribuer à rendre beaucoup plus pertinente les études en cosmes.

<sup>2</sup> Dispositifs expérimentaux clos, destinés à étudier les effets des polluants sur le milieu.



### 3. Développement de biomarqueurs informatifs

Nous avons montré, au cours du chapitre 2, que les modèles d'effets au niveau de l'individu et le changement d'échelle permettaient de dériver des seuils d'effet significatifs à différents niveaux d'organisation biologique. Cependant, ces seuils sont définis en termes de concentrations d'exposition dans les tests de toxicité, et il est donc crucial de développer des outils pour relier l'évaluation du risque dans les milieux aquatiques et ces résultats de laboratoire. Pour y parvenir, nous avons cherché à développer des biomarqueurs capables de rendre compte d'effets et capables de s'intégrer comme variable d'entrée de nos modèles. L'objectif était donc de déduire, uniquement à partir de mesures biochimiques sur des individus exposés à des échantillons du terrain, les conséquences attendues sur les individus et les populations d'une exposition longue à ces échantillons pour proposer par la suite une évaluation du risque.

#### 3.1. Essai de développement de biomarqueurs de l'énergie

Dans un premier temps, nos modèles étant fondés sur la gestion de l'énergie par les organismes, nous avons cherché à mettre en relation les effets avec les réserves lipidiques et glucidiques des organismes, en collaboration avec l'INRA de Rennes. Nous nous sommes intéressés au chironome, pour lequel nous disposions de l'ensemble des modèles mathématiques présents au cours du chapitre 2. Les larves de chironomes du dernier stade ont été sexées puis triées en fonction de leur phase de développement, en ne conservant que celles pour lesquelles la variabilité de la mesure est la plus faible (phases 4 à 8). L'hémolymphe et le corps gras ont été recueillis pour effectuer les dosages de biomarqueurs (glycogène, glucose et tréhalose, en ce qui concerne les glucides, et triglycérides et glycérol libre en ce qui concerne les lipides).

Les chironomes ont été exposés à des sédiments enrichis en cuivre à des concentrations pour lesquelles des effets sur la croissance et sur la reproduction ont été observés. La comparaison des larves

témoins et exposées montre que les concentrations en sucres ne varient pas significativement en fonction de la concentration en cuivre. Ainsi, les mesures de sucres ne rendent pas compte du retard de développement dû à la toxicité du cuivre. Les mesures de lipides ont été plus informatives. Les teneurs en triglycérides décroissent en fonction de la concentration en cuivre dans les sédiments après sept jours d'exposition. Cette décroissance est du même ordre de grandeur (en pourcentage) que la décroissance du nombre d'œufs par femelle modélisée au cours du test de reproduction. Il y a aussi un effet significatif du cuivre sur la concentration en glycérol libre dans les tissus. Cependant, pour ce marqueur, les mesures, exprimées en pourcentage, ne sont pas corrélées aux résultats obtenus en matière de fécondité des femelles. En particulier, le seuil d'apparition des effets est élevé pour l'induction de glycérol libre par rapport à l'inhibition de la reproduction.

Nous avons aussi cherché à connaître l'influence de la nourriture et des caractéristiques physico-chimiques des sédiments naturels sur les mesures de biomarqueurs énergétiques. L'étude de la variabilité des biomarqueurs par rapport aux conditions du terrain est un préalable indispensable pour investir le terrain. Nous ne nous sommes intéressés qu'à la mesure de lipides, dans la mesure où nous avons montré le faible intérêt des mesures de sucres. Nous avons effectué les mêmes expériences que précédemment, en conditions *ad libitum*, avec comme supports sédimentaires un sédiment provenant du lac d'Aiguebelette et un sédiment provenant d'un bras de l'Ain (Port-Galland). Ces deux sédiments sont non contaminés (suivi chimique effectué régulièrement). Tous les deux permettent une amélioration de la fécondité des femelles. Les dosages dans les organismes ont montré que les écarts entre les mesures de glycérol libre pour les sédiments naturels et la silice sont significatifs. Les organismes ayant été exposés à des sédiments naturels présentent, en effet, des concentrations en glycérol libre deux fois plus importantes que celles observées avec une exposition à la silice. Surtout, le sédiment de Port-Galland donne lieu à des niveaux de triglycérides significativement inférieurs

à ceux obtenus sur silice. Le niveau de triglycérides des organismes exposés à Port-Galland, dont la reproduction est de 25 % supérieure à celle obtenue sur la silice, est ainsi du même ordre que celui des organismes exposés à 50 mg/kg de cuivre dans la silice dans l'expérience précédente, ce qui est un niveau léthal, lié à une reproduction réduite d'un tiers. Il y a donc là une incohérence, si l'on considère le niveau en triglycérides comme informatif sur la fécondité. En conclusion de cette expérimentation, le transfert sur le terrain des mesures de marqueurs énergétiques paraît délicat, sinon compromis.

### 3.2. Utilisation des données d'accumulation cytosolique

Dans la mesure où nos modèles d'effets sont en relation avec la concentration accumulée, les mesures d'accumulation en composés doivent pouvoir permettre d'évaluer le risque lié à l'accumulation d'une substance, à partir du moment où les modèles d'effets liés à cette substance ont été calibrés. En outre, pour un même effet, nous attendons moins de variabilité pour la concentration accumulée par rapport à la concentration d'exposition, dans la mesure où les écarts de biodisponibilité sont en grande partie occultés dans les mesures d'accumulation.

C'est ce que nous avons vérifié expérimentalement en exposant des chironomes à différents sédiments (deux sédiments artificiels, deux sédiments naturels) enrichis en cuivre [PÉRY *et al.*, 2005]. Au cours de ces tests, nous avons effectué des mesures de croissance pour analyser ces données à l'aide de nos modèles et déterminer des seuils d'effet, et des mesures d'accumulation pour exprimer ces seuils en concentrations accumulées. Les résultats exprimés en concentration dans les sédiments sont peu homogènes (divergences pouvant aller jusqu'à un facteur 10), alors que, lorsqu'ils sont exprimés en concentration dans les tissus, ils ne diffèrent que d'un facteur 1,8. Nous avons réalisé la même expérimentation avec deux sédiments enrichis en zinc et nous avons obtenu des résultats similaires pour les seuils de toxicité. Ces études rendent donc compte de la pertinence de l'approche concentration interne et modélisation des effets qui permet de s'affranchir en

partie de l'aspect biodisponibilité en termes d'interactions chimiques entre le support sédimentaire et les contaminants.

En revanche, la mesure de concentration internalisée totale nous a posé problème lorsque nous avons cherché à l'appliquer à des sédiments contaminés sur le terrain, et non plus artificiellement contaminés au laboratoire. Nous avons ainsi testé la toxicité d'un sédiment provenant d'un site particulièrement contaminé en métaux. Nous avons mis en évidence une accumulation de cuivre de l'ordre de 750 mg/kg, sans que le moindre effet sur la croissance et la survie n'apparaisse. Or, nous sommes plus de deux fois au-dessus des seuils de concentration interne déterminés au laboratoire. Nous avons alors remis en question la pertinence de la concentration internalisée totale, et recherché une mesure plus fiable.

Au sein de la charge toxique globale d'un organe ou organisme, seule une fraction est toxicologiquement active [RAINBOW, 2000]. Chez les invertébrés, pour les métaux, deux principaux modes de détoxification sont connus : l'insolubilisation des métaux, sous formes de concrétions minérales, et la liaison de ces derniers à des protéines de détoxification du type des métallothionéines [ROESIJADI, 1992]. Dans l'étude de la répartition des métaux, plusieurs auteurs définissent différentes fractions, représentées par une fraction insoluble (incluant les concrétions minérales) et une fraction cytosolique comprenant d'une part, les protéines de détoxification (MT) et d'autre part, les molécules cibles (incluant les enzymes). Cette fraction cytosolique est reconnue comme ayant un rôle important dans la séquestration, l'élimination et la toxicologie des métaux.

La concentration interne totale rend compte de manière très imparfaite de la concentration cytosolique. En effet, la répartition métallique entre la fraction insoluble et la fraction cytosolique peut varier en fonction du métal considéré et des conditions de contamination. Ces variations peuvent biaiser de manière substantielle les relations entre concentration mesurée et effets, ainsi que les comparaisons entre expériences. Il apparaît donc nécessaire, dans le cadre des modèles d'effets, de prendre en compte non plus

la teneur métallique interne globale de l'individu, mais la teneur métallique cytosolique. C'est ce que nous avons réalisé chez le chironome et la daphnie, pour trois métaux, le zinc, le cuivre et le cadmium, dans le cadre du projet PNETOX EMMCC, en reliant effets et concentrations cytosoliques afin d'une part, de confronter nos seuils de concentrations cytosoliques à des observations de terrain et d'autre part, d'aborder la question des effets des mélanges.

Ainsi, nous avons réalisé des mesures de répartition du cuivre entre fraction cytosolique et fraction insoluble pour des chironomes exposés à de la silice enrichie en cuivre. Il est apparu qu'en moyenne, 76 % du cuivre internalisé est sous forme soluble. Cela signifie que la concentration interne cytosolique sans effet sur la silice est de 116 mg/kg. Nous avons de nouveau réalisé un test de toxicité et d'accumulation pour le sédiment très contaminé qui nous avait posé problème précédemment quant au lien entre accumulation totale en cuivre et effets. Nous avons mis en évidence un effet significatif de 12 % de réduction de la croissance (équivalent à 194 mg/kg en cuivre total et 153 mg/kg en cuivre cytosolique dans nos tests sur silice), et une accumulation totale de cuivre de 463 mg/kg. En termes de concentration totale, l'accumulation est 2,4 fois supérieure à ce qui est attendu au vu des effets mesurés. Or, il est apparu que seuls 47 % du cuivre internalisé étaient sous forme soluble, ce qui signifie que la concentration cytosolique de nos individus exposés à ce sédiment était de 216 mg/kg, soit dans un rapport de 1,4 par rapport à une concentration donnant lieu au même effet sur la silice.

Nos expérimentations sur les interactions entre métaux dans les sédiments ont aussi démontré tout l'intérêt de travailler au niveau de l'organisme sur les concentrations accumulées. Nous avons mis en parallèle les accumulations en cuivre, zinc et cadmium pour chaque couple de métaux et les effets observés sur la croissance de chironomes au laboratoire. Les effets de chacun des métaux, isolément, sur le cycle de vie avaient été, au préalable, mesurés expérimentalement et modélisés, en fonction des concentrations cytosoliques mesurées. Il est apparu que l'accumulation en cuivre est plus faible lorsque celui-ci est en présence d'autres métaux. Inverse-

ment, le cadmium et le zinc bénéficient fortement de la présence de cuivre qui accroît leur potentiel toxique par une plus forte accumulation. En termes d'effets, nous avons obtenu des résultats très cohérents entre observations et prédictions en fonction du niveau d'accumulation, avec l'hypothèse de l'indépendance des effets sur les différentes cibles. La forte synergie observée est ainsi entièrement due à des suraccumulations cytosoliques du zinc et du cadmium en présence d'autres métaux.

Nous pouvons donc considérer que le passage à la concentration cytosolique est un succès en termes de compréhension de la toxicité et de lien entre une mesure biochimique et un effet.

## Conclusion

La revisite de l'écotoxicologie par la modélisation nous a valu plusieurs avancées notables. Dans le domaine de l'analyse des tests de toxicité, nos modèles d'effets ont démontré leur robustesse et leur capacité à rendre compte d'un mode d'action physiologique. Le changement d'échelle de l'individu à la population s'est avéré un outil indispensable à l'évaluation du risque, de par ses capacités d'intégration de l'information. Un nouveau paramètre d'intérêt à ce niveau d'organisation biologique, la densité à l'équilibre, qui a été introduit naturellement par l'incorporation de la dynamique énergétique dans le changement d'échelle, apparaît comme prometteur et complémentaire du taux d'accroissement asymptotique de la population. Enfin, le développement de mesures d'accumulation en lien avec les effets a pu rebondir grâce à la mise en relation des mesures de cinétique cytosolique et de nos modèles d'effets et de changement d'échelle. Nous disposons donc d'un outil d'évaluation du risque efficace qui nous permet de faire le lien, pour plusieurs contaminants, entre des mesures biochimiques, qui peuvent se réaliser en routine, et un risque pour des individus, des populations et des communautés d'organismes sur le terrain. Il s'agit à présent d'étendre les modèles d'effets pour prendre en compte d'autres effets que la perturbation énergétique. En particulier, les phénomènes de perturbation endocrinienne réclament le développement de modèles mathématiques qui leur soient spécifiques.

## Bibliographie

- BEAUDOUIN 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 ». Thèse soutenue à l'Université de Rennes.
- BURTON G.A., NGUYEN L.T.H., JANSSEN C., BAUDO R., Mc WILLIAM R., BOSSUYT B., BELTRAMI M., GREEN A., 2005 : « Field validation of sediment zinc toxicity », *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 541-553.
- DUCROT V., USSEGLIO-POLATERA P., PERY A.R.R., MOUTHON J., LAFFONT M., ROGER M.-C., GARRIC J. FERARD J.F., 2005 : « Using aquatic macroinvertebrate species traits to build test batteries for sediment toxicity assessment: accounting for the diversity of potential biological responses to toxicants ». *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 2306-2315.
- KOOIJMAN S.A.L.M., BEDAUX J.J.M., 1996 : The analysis of aquatic toxicity data. *VU University Press, Amsterdam*, 149 pages.
- KOOIJMAN S.A.L.M., 2000 : Dynamic energy and mass budgets in biological systems. *Cambridge University Press*, 423 pages.
- PERY A.R.R., BEDAUX J.J.M., ZONNEVELD C., KOOIJMAN S.A.L.M., 2001 : « Analysis of bioassays with time-varying concentrations ». *Water Research*, 35, 3825-3832.
- PERY A.R.R., FLAMMARION P., VOLLAT B., BEDAUX J.J.M., KOOIJMAN S.A.L.M., GARRIC J., 2002 : « Using a biology-based model (DEBtox) to analyse bioassays in ecotoxicology: opportunities and recommendations ». *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 459-465.
- PERY A.R.R., BÉTHUNE A., GAHOU J., MONS R., GARRIC J., 2005 : « Body residues: a key variable to analyse toxicity tests with *Chironomus riparius* exposed to copper-spiked sediments ». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61, 160-167.
- RAINBOW PS., 2002 : « Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what ? ». *Environmental Pollution*, 120, 497-507.
- ROESIJADI G., 1992 : « Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals ». *Aquatic Toxicology*, 22, 81-114.
- SLOOF W., CANTON J.H., HERMENS J.L.M., 1983 : « Comparison of the susceptibility of 22 freshwater species to 15 chemical compounds. I. (sub)acute toxicity tests ». *Aquatic Toxicology*, 4, 113-128.
- TACHET H., RICHOUX P., BOURNAUD M., USSEGLIO-POLATERA P., 2000 : Invertébrés d'eau douce – Systématique, biologie, écologie. *CNRS éditions (Ed.)*, Paris, 588 pp.
- USSEGLIO-POLATERA P., 1994 : « Theoretical habitat templates, species traits and species richness – Aquatic insects in the Upper Rhône River and its floodplain ». *Freshwater Biology*, 31, 417-437.
- VAN DEN BRINK P.J., MALBY L., PIETERS B.J., BLAKE N., BROCK T.C.M., 2005 : « Addressing interspecific variation in sensitivity and the potential to reduce this source of uncertainty in ecotoxicological assessments ». *Communication affichée. 15<sup>th</sup> annual meeting of SETAC-Europe, Lille, France.*

## Résumé

A. PERY

**Évaluation du risque écotoxicologique dans les milieux aquatiques à partir d'expérimentations de laboratoire. Perspectives offertes par la modélisation.**

L'écotoxicologie est toujours confrontée au même dilemme. D'un côté, son objet d'étude se situe sur le terrain, où ce sont des écosystèmes complexes qu'il s'agit de protéger des diverses contaminations. D'un autre côté, nous ne disposons, pour évaluer le risque, que de données obtenues, pour l'essentiel, au laboratoire sur quelques espèces. La modélisation est un outil essentiel pour réussir au mieux cette extrapolation extrême. Elle permet aux expérimentations de laboratoires de bénéficier des connaissances écologiques acquises sur le terrain afin que le choix des espèces testées soit

le plus représentatif possible. En retour, elle ouvre la voie au développement de modèles permettant le changement d'échelle pour évaluer le risque pour les populations dans des situations de terrain, à partir de données obtenues au laboratoire sur des individus. En outre, elle peut contribuer avantageusement au développement de biomarqueurs efficaces, dont la mesure permet de rendre compte d'un risque pour les populations, en relation avec les modèles de changement d'échelle. Ce sont ces trois aspects que nous développons ici.

## Summary

### A. PERY

#### Ecotoxicological risk assessment in freshwater systems and laboratory testing.

#### Prospects offered by modelling

Ecotoxicology is still facing the same paradox. On the one hand, it aims at studying field situations in which complex ecosystems have to be protected from diverse contaminations. On the other hand, as far as risk assessment is concerned, we only have at our disposal a few laboratory data obtained on a few species. Modelling is crucial to enable such an extrapolation to be undertaken, from individual in the laboratory to

population in the field. It allows one to integrate field relevant knowledge in order to select the most representative test species. In return, it permits to develop models, which are able to assess ecotoxicological risk for populations based on data obtained on individuals. Moreover, modelling can contribute to efficient biomarkers development.