



HAL
open science

Développement d'un bioessai de toxicité chronique en microcosme aquatique de laboratoire et évaluation de l'outil au travers de l'étude des effets du cadmium

Hélène Delhayé

► **To cite this version:**

Hélène Delhayé. Développement d'un bioessai de toxicité chronique en microcosme aquatique de laboratoire et évaluation de l'outil au travers de l'étude des effets du cadmium. Autre. INSA de Lyon, 2012. Français. NNT : 2012ISAL0090 . tel-00814732

HAL Id: tel-00814732

<https://theses.hal.science/tel-00814732>

Submitted on 17 Apr 2013

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.

Thèse

Développement d'un bioessai de toxicité
chronique en microcosme aquatique de laboratoire
et évaluation de l'outil au travers de l'étude des
effets du cadmium

présentée devant
L'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon

pour obtenir
le grade de docteur

Ecole doctorale : Ecole Doctorale de Chimie de Lyon
Spécialité : Environnement

par
Hélène Delhaye

Soutenue le 28 septembre 2012 devant le jury suivant :

Bayard Rémy, Maître de Conférences à l'INSA de Lyon

Charles Sandrine, Professeur à l'Université Lyon 1

Clément Bernard, Professeur à l'ENTPE

Gauthier Laury, Maître de Conférences à l'INP-ENSAT

Lagadic Laurent, Directeur de recherche à l'INRA

Perrodin Yves, Directeur de recherche au LEHNA

Triffault-Bouchet Gaëlle, Docteur au CEAEQ

Directeur

Rapporteur

Rapporteur

Cette thèse a été effectuée au Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés à l'Ecole Nationale des Travaux Publics de l'Etat et au Centre d'expertise et d'analyse environnementale du Québec

INSA Direction de la Recherche - Ecoles Doctorales – Quinquennal 2011-2015

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE
CHIMIE	CHIMIE DE LYON http://www.edchimie-lyon.fr Insa : R. GOURDON	M. Jean Marc LANCELIN Université de Lyon – Collège Doctoral Bât ESCPE 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72.43 13 95 directeur@edchimie-lyon.fr
E.E.A.	ELECTRONIQUE, ELECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE http://eedea.ec-lyon.fr Secrétariat : M.C. HAVGOUDOUKIAN eea@ec-lyon.fr	M. Gérard SCORLETTI Ecole Centrale de Lyon 36 avenue Guy de Collongue 69134 ECULLY Tél : 04.72.18 60 97 Fax : 04 78 43 37 17 Gerard.scorletti@ec-lyon.fr
E2M2	EVOLUTION, ECOSYSTEME, MICROBIOLOGIE, MODELISATION http://e2m2.universite-lyon.fr Insa : H. CHARLES	Mme Gudrun BORNETTE CNRS UMR 5023 LEHNA Université Claude Bernard Lyon 1 Bât Forel 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cédex Tél : 04.72.43.12.94 e2m2@biomserv.univ-lyon1.fr
EDISS	INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE http://ww2.ibcp.fr/ediss Sec : Safia AIT CHALAL Insa : M. LAGARDE	M. Didier REVEL Hôpital Louis Pradel Bâtiment Central 28 Avenue Doyen Lépine 69677 BRON Tél : 04.72.68 49 09 Fax : 04 72 35 49 16 Didier.revel@creatis.uni-lyon1.fr
INFOMATHS	INFORMATIQUE ET MATHEMATIQUES http://infomaths.univ-lyon1.fr	M. Johannes KELLENDONK Université Claude Bernard Lyon 1 INFOMATHS Bâtiment Braconnier 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72. 44.82.94 Fax 04 72 43 16 87 infomaths@univ-lyon1.fr
Matériaux	MATERIAUX DE LYON Secrétariat : M. LABOUNE PM : 71.70 –Fax : 87.12 Bat. Saint Exupéry Ed.materiaux@insa-lyon.fr	M. Jean-Yves BUFFIERE INSA de Lyon MATEIS Bâtiment Saint Exupéry 7 avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cédex Tél : 04.72.43 83 18 Fax 04 72 43 85 28 Jean-yves.buffiere@insa-lyon.fr
MEGA	MECANIQUE, ENERGETIQUE, GENIE CIVIL, ACOUSTIQUE Secrétariat : M. LABOUNE PM : 71.70 –Fax : 87.12 Bat. Saint Exupéry mega@insa-lyon.fr	M. Philippe BOISSE INSA de Lyon Laboratoire LAMCOS Bâtiment Jacquard 25 bis avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72.43.71.70 Fax : 04 72 43 72 37 Philippe.boisse@insa-lyon.fr
ScSo	ScSo* M. OBADIA Lionel Sec : Viviane POLSINELLI Insa : J.Y. TOUSSAINT	M. OBADIA Lionel Université Lyon 2 86 rue Pasteur 69365 LYON Cedex 07 Tél : 04.78.69.72.76 Fax : 04.37.28.04.48 Lionel.Obadia@univ-lyon2.fr

*ScSo : Histoire, Géographie, Aménagement, Urbanisme, Archéologie, Science politique, Sociologie, Anthropologie

Résumé

Les approches physico-chimiques étant insuffisantes pour évaluer l'impact de la pollution sur les écosystèmes, de nombreux bioessais, variant de par le niveau d'organisation représenté, ont été développés. Parmi ces essais, on trouve les essais en microcosme aquatique de laboratoire qui sont un compromis entre (1) les essais mono-spécifiques standards de laboratoires, méthodes couramment employées mais très simplifiées et peu représentatives sur le plan écologique et (2) les essais en mésocosme extérieurs, plus représentatifs mais coûteux, lourds à mettre en oeuvre, moins répliquables et plus difficile à interpréter.

Dans ce travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'essai initialement développé par Clément et Cadier (1998). Cet outil permet d'évaluer l'effet de substances ou de matrices potentiellement contaminées sur un écosystème artificiel composé d'eau et de sédiment, dans lesquels sont introduites simultanément 5 espèces aquatiques d'eau douce usuellement employées dans des essais de toxicité mono-spécifiques : l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata*, la lentille d'eau *Lemna minor*, la daphnie *Daphnia magna*, l'amphipode *Hyalella azteca* et l'insecte *Chironomus riparius*.

Cet essai en microcosme a été utilisé dans de nombreux projets depuis sa conception mais sa variabilité demeurait la principale limite malgré les améliorations successives. Le principal objectif de ce travail était donc d'optimiser l'essai. La principale amélioration testée a été le renouvellement continu de l'eau du système qui a permis de stabiliser les paramètres physico-chimiques de la colonne d'eau des microcosmes et la densité algale, et ainsi d'améliorer le développement des organismes et la répliquabilité de l'essai. Le cadmium a été utilisé comme contaminant modèle afin d'évaluer les développements méthodologiques proposés. La diminution de la variabilité en présence de renouvellement d'eau augmente la capacité à détecter des effets sublétaux sur les organismes pélagiques avec des tests statistiques classiques. Le développement d'un cadre de modélisation dynamique a permis de comparer la sensibilité des daphnies au cadmium dans des expériences aux profils d'exposition différents.

Mots clés : microcosme, optimisation, variabilité, renouvellement d'eau, cadmium.

Table des matières

1	Introduction	4
1.1	Contexte	4
1.2	Objectifs	6
1.3	Méthodologie	7
1.4	Organisation du document	8
2	Bibliographie	10
2.1	Renouvellement de l'eau des bioessais	10
2.1.1	Essais statiques	10
2.1.2	Essais avec renouvellement d'eau	11
2.2	Développement de l'essai LAMs	12
2.2.1	Présentation synthétique de l'essai	12
2.2.2	Déroulement de l'essai	12
2.2.3	Eau	14
2.2.4	Sédiment	16
2.2.5	Organismes	19
2.3	Exposition et effet du cadmium	24
2.3.1	Le cadmium dans l'environnement et son utilisation	24
2.3.2	De l'exposition aux effets	24
2.3.3	Effet du cadmium sur les organismes du LAM	28
3	Matériels et méthodes	33
3.1	Protocoles expérimentaux	33
3.1.1	Photographies et schémas expérimentaux	33
3.1.2	Conditions environnementales	37
3.1.3	Milieux abiotiques	37
3.1.4	Organismes	48
3.2	Traitement de données	57
3.2.1	Logiciel R	57
3.2.2	Préparation des données	58
3.2.3	Représentations graphiques	58
3.2.4	Statistiques descriptives	60

3.2.5	Analyses en composante principale	60
3.2.6	Comparaison de traitements	60
3.2.7	Courbes dose-réponse	64
3.2.8	Ajustement d'un modèle à des données	65
3.2.9	Cadre de modélisation dynamique	65
3.2.10	Dynamique des systèmes	65
4	Résultats et discussions	67
4.1	Paramètres abiotiques de la colonne d'eau	67
4.1.1	Cadmium	67
4.1.2	Eclairement	75
4.1.3	Température	75
4.1.4	pH	77
4.1.5	Oxygène dissous	79
4.1.6	Conductivité	80
4.1.7	Dureté	87
4.1.8	Orthophosphate	89
4.1.9	Ammoniaque	91
4.2	Paramètres biotiques	95
4.2.1	Algues	95
4.2.2	Lentilles d'eau	104
4.2.3	Daphnies	113
4.2.4	Hyaelles	124
4.2.5	Chironomes	127
5	Conclusion	130
	Bibliographie	134

Abréviations

C	Concentration en cadmium nominale dans l'eau
C_{kj}	Concentration en cadmium moyenne mesurée au temps j dans le compartiment k (j = i : initial, j = 0 : jour d'introduction des organismes, j = f : final, j = m : moyenne sur la période d'exposition (entre 0 et f) ; k = s : sédiment, k = w : eau)
CEAEQ	centre d'expertise et d'analyse environnementale du Québec
CV	coefficient de variation
D	essai LAMd réalisé au LEHNA avec du Cd (aussi noté ECd5)
ECx	Concentration d'un contaminant entraînant x% d'effet
EM	eau microcosme
ENTPE	Ecole Nationale des Travaux Publics de l'Etat
Jx	x jours après le jour d'introduction des organismes (ou premier jour de l'expérience si aucun organisme n'a été introduit)
LAM	Laboratory Aquatic Microcosm = microcosme aquatique de laboratoire
LAMd	microcosme aquatique de laboratoire dynamique - avec renouvellement d'eau
LAMs	microcosme aquatique de laboratoire statique - sans renouvellement d'eau
LBBE	Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive
LEHNA	Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés
LOEC	plus petite concentration du plan expérimental pour laquelle un effet significatif est mis en évidence grâce à des tests d'hypothèses appropriés
LSE	Laboratoire des Sciences de l'Environnement (ancien nom du LEHNA)
NOEC	première concentration nominale du plan expérimental sous la LOEC
S	essai LAMs réalisé au LEHNA avec du Cd (aussi noté ECd4)

Glossaire

Ce glossaire précise le sens donné à certains mots dans ce manuscrit.

Paramètre Le mot paramètre est utilisé dans 2 sens dans ce manuscrit : il peut désigner d'un côté, les paramètres d'un modèle et d'un autre côté, les paramètres biologiques ou physico-chimiques mesurés au cours des expériences.

Répétabilité *Pour un paramètre* : niveau de similarité de la réponse d'un paramètre, pour un traitement et un temps expérimental donné, entre différentes expériences réalisées à des moments ou en lieux différents au sein d'un même laboratoire [78]. *Pour une expérience* : la répétabilité d'une expérience est fonction de la répétabilité de l'ensemble des paramètres mesurés au cours des différentes expériences. La reproductibilité, correspondant au niveau de similarité des résultats provenant d'expériences similaires conduites par différents chercheurs dans différents laboratoires [78], n'est pas étudiée dans ce travail.

Répliquabilité *Pour un paramètre* : niveau de similarité de la réponse d'un paramètre à l'intérieur d'un traitement, à un instant donné, dans une expérience donnée [78, 148]. Statistiquement, plus la variance intra-traitement (et intra-expérience) d'un paramètre à un instant donné est faible, plus sa répliquabilité est grande. *Pour une expérience* : la répliquabilité d'une expérience est fonction de la répliquabilité de l'ensemble des paramètres mesurés au cours de l'expérience.

En hommage à tous les êtres sacrifiés

Chapitre 1

Introduction

1.1 Contexte

Augmentation de la pression anthropique sur les écosystèmes

L'espèce humaine exerce une pression croissante sur la biosphère. Cette pression est devenue problématique au cours du siècle dernier avec notamment l'explosion démographique humaine, l'urbanisation massive, l'industrialisation de tous les secteurs de production, la mondialisation et le développement de la société de consommation. La situation est d'autant plus critique que tous ces mouvements s'accélèrent. La destruction des habitats, l'introduction d'espèces invasives, la surexploitation des milieux naturels, la pollution des milieux sont des exemples d'actions d'origine anthropique qui viennent menacer la survie de nombreuses espèces (dont l'espèce humaine) et perturber le fonctionnement des écosystèmes.

L'écotoxicologie : étude du devenir et de l'impact des contaminants sur les écosystèmes

L'écotoxicologie est une discipline qui apparait au milieu du vingtième siècle avec les premières prises de conscience de la contamination environnementale naissante. Un ouvrage comme "Printemps silencieux", publié par Rachel Carson en 1962 et révélant le scandale des pesticides, participe largement à cette prise de conscience.

L'écotoxicologie, créée par Truhaut en 1969 à partir des mots "écologie" et "toxicologie" [177], a pour objet d'étudier le devenir et l'impact de substances ou matrices contaminées sur les écosystèmes. Les approches physico-chimiques étant insuffisantes, des méthodes biologiques ont été développées, comme par exemple les bioessais de toxicité. Ces derniers varient de par le niveau d'organisation représenté (allant du niveau sub-cellulaire à l'écosystème) et donc par leur taille, leur durée (quelques heures à plusieurs mois), leur complexité et leur représentativité (allant des essais de laboratoire en conditions très contrôlées jusqu'aux mesures sur le terrain).

Nécessité de développer les essais en microcosme

Néanmoins, une grande partie des écotoxicologues travaillent aujourd'hui seulement au niveau cellulaire ou individuel. Si les bioessais de toxicité monospécifiques ont été largement développés et normalisés, les expériences réalisées en tenant compte de niveaux supérieurs d'organisation tels que des expériences en microcosme, en mésocosme ou sur les écosystèmes naturels sont beaucoup moins courantes.

A partir d'une recherche bibliographique, Clément [53] estime que, durant les quarante dernières années, moins de 6% des travaux publiés en écotoxicologie aquatique concernaient le thème "microcosme de laboratoire simulant des milieux aquatiques lenticules d'eau douce". Convaincu qu'il est nécessaire de développer des essais intégrant un plus grand nombre d'interactions que les essais monospécifiques et n'ayant pas les moyens de lancer des expérimentations en mésocosme extérieur ou sur le terrain, expériences plus coûteuses, difficiles à mettre en oeuvre et à interpréter, Clément développe un essai en microcosme de laboratoire [54], suivant l'exemple de Taub [157].

Présentation de l'essai LAM

Dans la suite de ce travail, nous appellerons LAM (Laboratory Aquatic Microcosm) ce modèle de microcosme et nous parlerons d'essai LAM pour désigner les essais en microcosme développés par Clément.

L'essai LAM permet d'évaluer l'effet de substances ou de matrices potentiellement contaminées sur un écosystème composé d'eau et de sédiment artificiels, dans lesquels sont introduites simultanément 5 espèces d'organismes d'eau douce, usuellement employées dans des essais de toxicité mono-spécifiques : l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata*, la lentille d'eau *Lemna minor*, la daphnie *Daphnia magna*, l'amphipode *Hyalella azteca* et l'insecte *Chironomus riparius*.

Utilisation des LAM

Les LAM ont été utilisés dans de nombreux projets de recherche et développés simultanément. Les études concernaient notamment la biodisponibilité d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), la toxicité de la 6PPD (substance industrielle), l'écocompatibilité de mâchefers d'incinération d'ordures ménagères (MIOM) valorisés en technique routière, l'impact de l'immersion de sédiments de dragage, la toxicité de lixiviats de résidus d'assainissement routier ou encore de sédiments de dragage traités [173, 160, 53, 41, 132, 134].

Avantages de l'essai LAM

Voici certains avantages de l'essai LAM par rapport aux essais mono-spécifiques standards :

- il permet d'exposer les différents organismes aux contaminants dans les mêmes conditions et de manière simultanée [53],
- la présence du sédiment et de différents niveaux trophiques améliore la représentativité écologique de la répartition des polluants entre les différentes phases (dissoute, colloïdale, particulaire et solide) ainsi que celle des voies d'expositions des organismes aux polluants [53],

- il permet d'éviter les modifications de matrices étudiées (filtrations, ajustement de pH, ...) indispensables au cours de certains essais mono-spécifiques [160].

Limites de l'essai LAM

Cependant, un certain nombre de limites freinent le développement de ce type d'essai comme :

- l'investissement financier et humain nécessaire,
- la faible répliquabilité et répétabilité des essais [57, 53],
- la difficulté d'interprétation des résultats, liée au niveau de complexité modélisé,
- le manque de représentativité, dû principalement aux conditions artificielles de l'essai en laboratoire.

Ces limites entraînent un manque de prédictibilité de l'essai à mettre en regard de l'énergie fournie pour la réalisation de l'essai.

1.2 Objectifs

Objectif principal : améliorer l'essai LAM en réduisant la variabilité

Ce travail, dirigé par Bernard Clément et Gaëlle Triffault-Bouchet, s'inscrit dans la continuité de leurs recherches précédentes respectives, basées sur le LAM. Il a été réalisé au centre d'expertise et d'analyse environnementale du Québec (CEAEQ) et au Laboratoire des Sciences de l'Environnement (LSE), aujourd'hui intégré au Laboratoire d'Écologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés (LEHNA). En perspective de son rapport d'HDR, Clément [53], qui s'appuie notamment sur les travaux de thèse de Triffault-Bouchet [160], préconise de s'intéresser prioritairement à l'optimisation de l'essai LAM. Clément [53] propose d'optimiser les élevages, les milieux abiotiques du LAM et de réduire la variabilité de l'essai.

Le principal objectif de cette thèse était donc d'améliorer l'essai LAM. Il s'agissait principalement d'augmenter la capacité de l'essai à mettre en évidence l'impact d'une substance sur le fonctionnement d'un écosystème reconstitué, en réduisant la variabilité de l'essai. Le système étant très artificiel, l'expérimentateur peut contrôler de nombreuses sources de variabilité. Nous avons donc cherché à améliorer la répliquabilité des microcosmes, c'est à dire réduire l'écart entre les réponses de microcosmes faisant partie d'un même traitement à un instant donné. Comme schématisé sur la figure 1.1, l'écart - pour un paramètre donné - résulte de :

- la variabilité initiale, intrinsèque aux éléments assemblés pour former les systèmes expérimentaux ou introduite lors de la constitution de ces systèmes,
- la variabilité additionnelle, introduite en cours d'expérience, notamment par la manipulation, des changements dans les conditions environnementales, l'introduction ou le retrait d'éléments au système,
- l'évolution, qui est liée au fonctionnement de chaque système, aux interactions avec les autres paramètres et est influencée par la variabilité des autres paramètres.

Nos sous-objectifs étaient donc de mieux connaître et maîtriser les conditions initiales, les modifications apportées en cours d'essai ainsi que le fonctionnement et l'évolution du système.

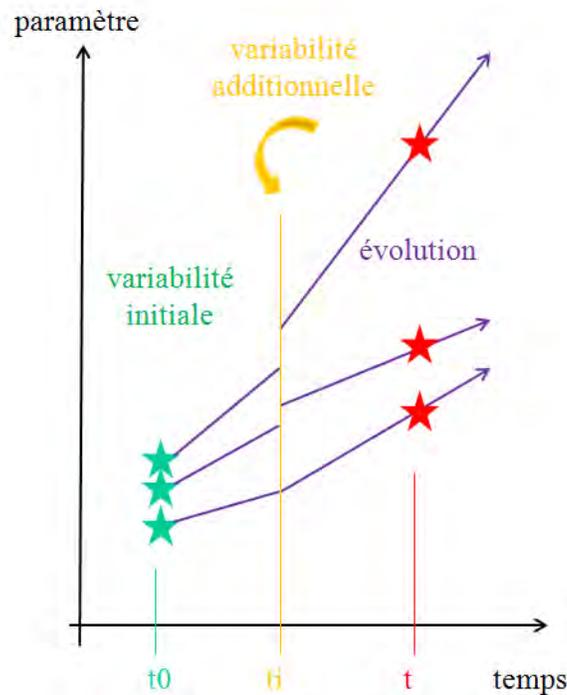


FIGURE 1.1 – Principaux facteurs de variabilité entre 3 systèmes : variabilité initiale, variabilité additionnelle et évolution

1.3 Méthodologie

Développement de l'essai statique LAMs

Par microcosme statique, nous entendons des microcosmes sans renouvellement d'eau. Afin de poursuivre les travaux d'optimisation de l'essai statique LAMs initiés par Triffault-Bouchet au CEAEQ, nous avons tout d'abord réalisé des essais préliminaires afin d'évaluer l'influence de différents paramètres, principalement abiotiques, sur le développement des organismes utilisés dans le LAM et sur la réplicabilité de l'essai. Nous avons notamment étudié l'influence de différentes eaux naturelles (réseau, nappe) et reconstituées (en regardant en particulier les effets de l'EDTA et de différentes solutions d'oligoéléments), du pourcentage de kaolin dans le sédiment artificiel, de différents apports de nourriture, de différentes concentrations initiales d'algues, de différents mode de constitution ou manipulation des systèmes, comme le mode d'introduction de l'eau sur le sédiment (tableau 5.1). Nous nous sommes parallèlement attachés à mieux contrôler les conditions d'élevage des organismes en nous basant sur l'expérience des techniciens du CEAEQ. Ces expériences préliminaires ne seront pas présentées dans ce manuscrit, mais elles sont la base des travaux suivants. Nous avons retenu le protocole final d'essai en microcosme statique LAMs présenté dans le chapitre 3.

Développement de l'essai dynamique LAMd

Le développement des essais LAMs ne permettant pas de réduire de manière suffisante la variabilité, nous avons décidé, en nous basant sur la littérature (chapitre 2), de développer un essai en microcosme dynamique LAMd, dans lequel l'eau des microcosmes est renouvelée en continu.

Dans ce travail, nous avons fait l'hypothèse que l'introduction d'un flux continu d'eau dans les microcosmes stabiliserait les paramètres bio-physico-chimiques du compartiment pélagique, notamment la teneur en ions majeurs et oligoéléments, la teneur en carbone organique dissous, la concentration des particules en suspension et colloïdes, dont la densité algale. Tout cela améliorerait la santé des organismes (au moins pélagiques) du microcosme ainsi que la réplicabilité et la répétabilité des essais.

Nous avons donc mis en place un renouvellement continu de la colonne d'eau des microcosmes. Les résultats de la phase préliminaire de mise au point du protocole d'essai LAMd ne seront pas présentés dans ce manuscrit. Lors de ce travail de conception, nous nous sommes basés sur l'expérimentation et la modélisation (dynamique des systèmes) pour choisir différents paramètres expérimentaux (eau, le débit de renouvellement, mode et fréquence d'apport des algues,...). Le protocole retenu est présenté dans le chapitre 3.

Comparaisons des essais LAMs et LAMd avec le cadmium

Les principales questions auxquelles nous avons cherché à apporter une réponse étaient :

- Le renouvellement d'eau permet-il de stabiliser les paramètres abiotiques au cours de l'essai ?
- Permet-il de stabiliser la densité algale au cours de l'essai ?
- Favorise-t-il le développement des organismes du microcosme ?
- Améliore-t-il la réplicabilité de l'essai ?
- Influence-t-il la sensibilité des organismes à un contaminant ?

Pour répondre à ces questions, nous avons réalisé un essai LAMs (noté S) et un essai LAMd (noté D) avec un polluant modèle. Le cadmium a été retenu comme polluant modèle car :

- c'est un métal d'intérêt prioritaire (chapitre 2),
- le suivi analytique est facilité par les possibilités d'analyse en interne et par celle d'utiliser à terme des isotopes radioactifs,
- de nombreuses données concernant la spéciation et la toxicité sont présentes dans la littérature, ce qui facilite la préparation des expériences et la compréhension des résultats.

Nous avons analysé nos données avec des outils classiques. Mais un cadre de modélisation dynamique a également été développé par des collègues du LBBE afin d'analyser plus finement certaines des données collectées lors des expériences.

1.4 Organisation du document

Après avoir présenté quelques unes des données bibliographiques sur lesquelles ce travail s'appuie (partie 2), nous détaillerons les matériels et méthodes utilisés pour réaliser les essais et traiter les données recueillies (chapitre 3). Puis nous présenterons et discuterons les résultats des deux essais finaux (S et D) présentés dans ce manuscrit (chapitre 4). Dans ce chapitre, nous nous intéresserons à la stabilité et la réplicabilité des différents paramètres mesurés dans les microcosmes en condition témoin et contaminée. Nous regarderons l'impact des développements expérimentaux sur cette stabilité et cette réplicabilité. Nous présenterons également le développement des organismes en condition témoin avec et sans renouvellement d'eau ainsi que l'impact du cadmium sur ce développement. En-

fin, l'étude de la variabilité nous permettra de formuler des hypothèses sur le fonctionnement du microcosme.

Chapitre 2

Bibliographie

2.1 Renouvellement de l'eau des bioessais

2.1.1 Essais statiques

L'adjectif statique est couramment employé dans la littérature scientifique en écotoxicologie aquatique pour désigner les essais dans lesquels il n'y a aucun flux d'eau [18, 28, 55, 81, 122, 181]. Le terme statique s'oppose donc à l'aspect dynamique du renouvellement continu de l'eau. Mais il existe une dynamique écosystémique dans les systèmes que nous qualifierons de statiques. Les essais statiques sont généralement proches des essais clos décrit par Beyers et Odum [19], excepté qu'il y a généralement transfert de matière via l'air et des éventuels apports de nourriture.

Dans les essais statiques, il y a des échanges d'énergie entre les systèmes constitués et leur environnement (énergie lumineuse, énergie thermique), mais les échanges de matière avec l'extérieur du système ne se font que par l'air si les systèmes ne sont pas fermés hermétiquement (figure 2.1). Les échanges gazeux peuvent entraîner des déplacements d'équilibre à l'intérieur du système à l'interface air/eau et ceci peut en entraîner à l'interface eau/sédiment et à l'interface eau/organisme, mais ces échanges restent lents et limités. Du fait des échanges internes, on observe deux phénomènes au niveau de la colonne d'eau dans les essais statiques :

1. d'un côté, des molécules, particules ou colloïdes (inertes ou vivants) relargués par le sédiment, par les organismes ou qui diffusent par l'air peuvent s'accumuler dans l'eau,
2. d'un autre côté, l'eau s'épuise en certaines molécules, particules ou colloïdes (inertes ou vivants) qui sont consommés par les organismes, s'adsorbent sur le sédiment ou qui diffusent par l'air.

Les paramètres bio-physico-chimiques de la colonne d'eau sont donc instables dans les systèmes statiques [101]. Des conséquences du premier point sont par exemple l'accumulation de substances nocives pour le développement des organismes pélagiques [24, 53, 101] ou l'accumulation de polluants relargués par un sédiment contaminé [124]. Des conséquences du second point sont par exemple la nécessité d'introduire initialement une forte concentration en nutriments pour assurer la croissance des producteurs primaires [22] ou l'impossibilité de maintenir une concentration en contaminant constante dans la colonne d'eau en présence de sédiment [22, 101].

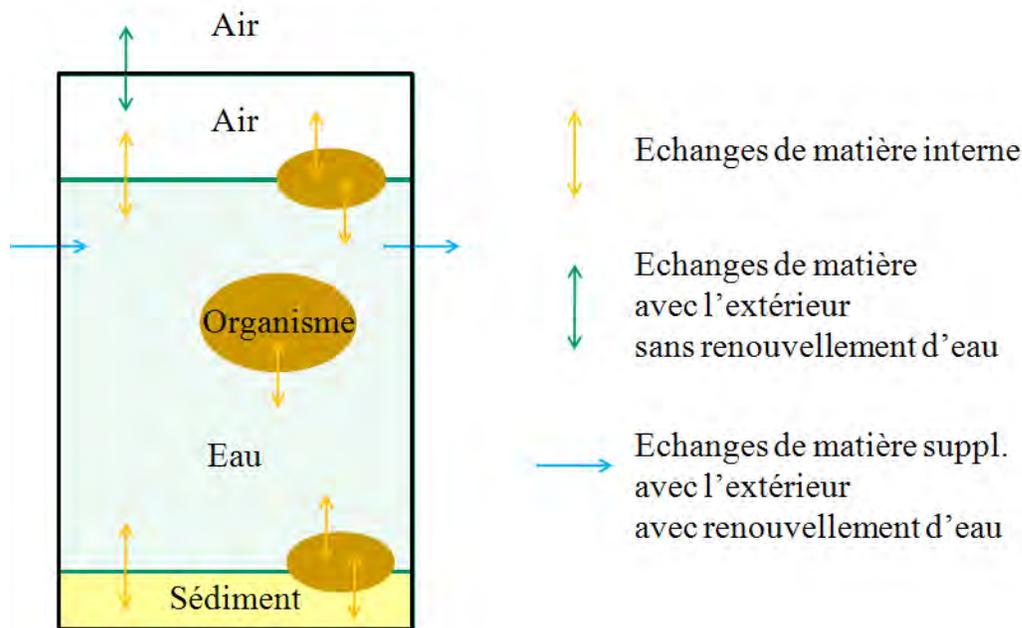


FIGURE 2.1 – Echanges de matière dans les microcosmes et avec l'environnement extérieur

2.1.2 Essais avec renouvellement d'eau

Pour pallier ces inconvénients certains auteurs ont donc mis en place des renouvellements d'eau périodiques (discontinus) [160, 130, 137, 181, 50] ou continus [28, 176, 22, 153, 124, 116, 123, 7, 118, 109, 44, 71, 24, 102, 100, 112, 96, 141]. En renouvelant l'eau des systèmes, en plus des échanges d'énergie et des échanges gazeux avec l'environnement extérieur, ces auteurs ajoutent des échanges de matière directs entre le compartiment eau et l'extérieur (figure 2.1).

Le but initial de la mise en place du renouvellement de l'eau varie selon les auteurs. Kottelat [101], par exemple, constate que les conditions physico-chimiques dans ses microcosmes statiques sont très variables et souhaite les stabiliser afin d'étudier et de modéliser l'exposition des daphnies aux métaux via l'eau, les colloïdes et le sédiment, dans des conditions réalistes.

Parallèlement aux inconvénients de l'essai statique énoncés précédemment, le renouvellement de l'eau permet de stabiliser les conditions bio-physico-chimiques de la colonne d'eau en :

1. évacuant les molécules, particules ou colloïdes accumulées au niveau de la colonne d'eau (par exemple relargués par le sédiment ou issus de la décomposition de la matière organique par les bactéries) [24, 53, 101],
2. et apportant les molécules, particules ou colloïdes dont le milieu est épuisé suite à des prélèvements, ingestion, dégradation, volatilisation, adsorption, ... [109, 22, 53, 101].

En particulier, un flux continu d'eau permet de stabiliser la concentration en contaminant dans la colonne d'eau [22, 124, 109, 101].

D'après la littérature, un renouvellement hebdomadaire de la colonne d'eau (partiel [160] ou complet [27]) permet de favoriser la survie et la reproduction des daphnies [27, 160] et dans certaines expériences des hyalelles [160] ou des lentilles d'eau [27].

2.2 Développement de l'essai LAMs

Nous présenterons, dans cette section, quelques éléments du développement de l'essai LAMs initialement mis au point par Clément et Cadier en 1998 [54]. Les lecteurs intéressés par un état de l'art général sur les essais en microcosme sont invités à se référer aux travaux de Triffault-Bouchet [164], Cauzzi [41] et Clément [53].

2.2.1 Présentation synthétique de l'essai



FIGURE 2.2 – Photographie d'un essai en microcosme réalisé dans la chambre environnementale du CEAEQ

La figure 2.2 est une photographie d'un essai en microcosme statique réalisé dans la chambre environnementale du CEAEQ. La figure 2.3 schématise le dispositif expérimental de l'essai en microcosme statique. L'essai consiste à évaluer l'impact de substances ou de matrices sur l'évolution de micro-écosystèmes aquatiques artificiels. Ces microcosmes sont reconstitués à partir d'eau douce, de sédiment et de 5 espèces d'organismes aquatiques : les producteurs primaires *Pseudokirchneriella subcapitata* et *Lemna minor* ainsi que les consommateurs primaires *Daphnia magna*, *Hyaella azteca* et *Chironomus riparius*. Les organismes sont issus d'élevages en laboratoire. L'eau et le sédiment peuvent être naturels ou artificiels. Les milieux artificiels ont fait l'objet de nombreuses évolutions.

2.2.2 Déroulement de l'essai

L'essai en microcosme se déroule en 2 ou éventuellement 3 phases : une phase de maturation du sédiment, une phase d'exposition et une éventuelle phase de suivi de la reproduction des organismes benthiques (figure 2.4).

2.2.2.1 Maturation du sédiment

Au jour initial (J_i), les compartiments abiotiques (eau et sédiment) sont mis en place dans les récipients d'essai. Puis une phase de maturation du sédiment ($J_i - J_0$) permet le développement de

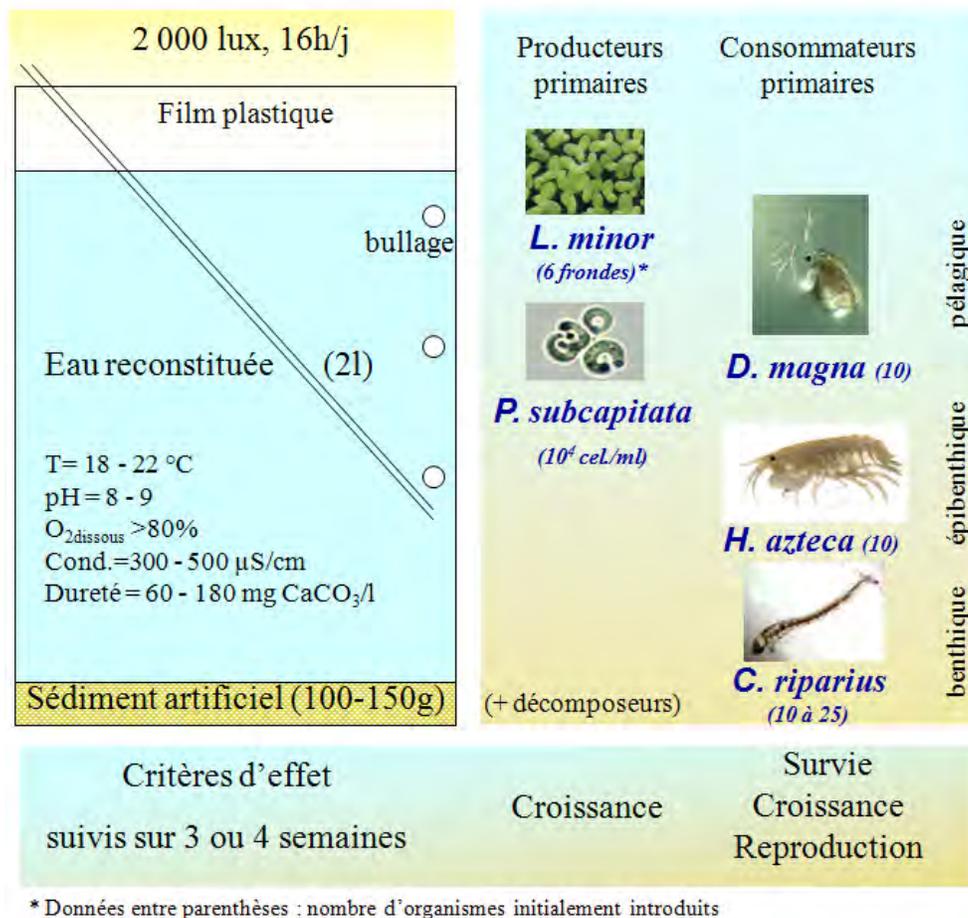


FIGURE 2.3 – Représentation schématique du dispositif expérimental d'un essai en microcosme statique LAMs

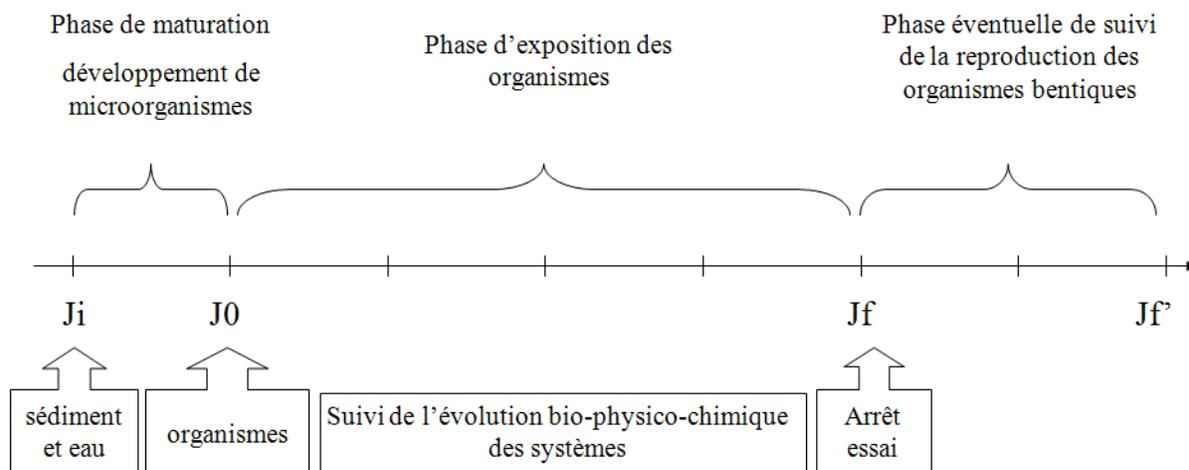


FIGURE 2.4 – Déroulement schématique d'un essai en microcosme (Ji : jour initial; J0 : jour d'introduction des organismes; Jf : fin de la préperiode d'exposition des organismes; Jf' : fin de l'essai (Jf'=Jf en l'absence de suivi de la reproduction des organismes benthiques))

populations de micro-organismes et la stabilisation de plusieurs paramètres physico-chimiques (pH, le potentiel d'oxydo-réduction, ...) et microbiologiques [150, 32, 94, 24, 175].

2.2.2.2 Phase d'exposition

Ensuite vient la phase principale : la phase d'exposition (J0 - Jf) des organismes aux substances ou matrices testées et de suivi de leur développement ainsi que de l'évolution globale du système. Cette phase était de 28 jours dans l'ensemble des travaux précédents cette thèse, comme dans les essais de toxicité chroniques standards réalisés avec les hyalles et les chironomes. Cette durée permet l'émergence de l'ensemble des chironomes dans nos conditions témoins.

Sacrifices

Initialement, des microcosmes étaient retirés durant la phase d'exposition afin de suivre des paramètres nécessitant la destruction des systèmes. Clément et Cadier [54] sacrifiaient leur microcosme chaque semaine (J8, J15, J22, J30), Triffault-Bouchet [160] sacrifiait 3 systèmes à J10, 3 à J21 et 3 à J30 et Cauzzi [41] sacrifiait 1 microcosme à J0, 5 à J10, 4 à J21 et 5 à J30. Cependant, afin d'augmenter le nombre de réplicats en fin d'essai et/ou le nombre de traitements testés simultanément, il a été décidé de ne plus faire de sacrifices (Triffault-Bouchet 2005, non publié).

2.2.2.3 Phase de suivi de la reproduction des organismes benthiques

La phase d'exposition est éventuellement complétée par une phase de suivi de la reproduction des organismes benthiques (Jf - Jf'), car leur cycle de vie est plus long que celui des organismes pélagiques sélectionnés. Ce suivi s'effectue après avoir transféré les organismes dans un milieu non contaminé. Le suivi de la reproduction des hyalles sur 15 jours (J28 - J42) a été effectué dans certains essais au CEAEQ.

2.2.3 Eau

2.2.3.1 Eau naturelle ou reconstituée

Les essais en microcosme de laboratoire peuvent être réalisés avec des eaux naturelles [28, 143, 102], éventuellement filtrées et enrichies, ou reconstituées [156, 152]. Clément et ses collaborateurs ont généralement travaillé avec des eaux reconstituées [54, 174, 55, 162], aussi appelées eaux artificielles ou synthétiques.

2.2.3.2 Composition de l'eau reconstituée

De nombreuses eaux reconstituées ont été développées pour réaliser des élevages ou des essais de toxicité avec des algues, des lentilles d'eau ou des daphnies. D'autres milieux, comme le milieu COMBO [95], ont été développés afin de favoriser aussi bien le développement des algues que des daphnies et permettre ainsi de réaliser des expériences sur les interactions entre producteurs et consommateurs primaires.

L'eau microcosme (EM) est reconstituée à partir de solutions mères contenant les macroéléments, oligoéléments et vitamines nécessaires au développement des organismes. Lors du choix de

l'eau reconstituée utilisée dans les essais en microcosme, Clément et Cadier ont “voulu privilégier les producteurs primaires en tant que niveau trophique à la base du développement des autres niveaux” [53]. Taub avait fait le même choix pour le milieu T82MV utilisé dans les Standardized Aquatic Microcosms (SAM) [53]. Clément et Cadier [54] sont donc partis du milieu préconisé pour les cultures d'algues par l'organisation pour la coopération et le développement économique (OCDE) [126, 127]. Ces solutions ont été par la suite plusieurs fois amendées et modifiées par Clément et ses collaborateurs.

Azote et Phosphore

Les solutions de macroéléments (C, N, P, Mg, Ca) sont donc issues du milieu pour algues OCDE. Les teneurs en azote et phosphore ont été initialement diminuées respectivement à $654 \mu\text{g.l}^{-1}$ et $50 \mu\text{g.l}^{-1}$ par Clément et Cadier [54] afin d'approcher des teneurs représentatives des milieux mésoeutrophes à eutrophes. Cependant, au CEAEQ, le choix a été fait en 2006 de multiplier par deux les teneurs en azote et phosphore afin de favoriser la croissance des producteurs primaires (Triffault-Bouchet, non publié). En effet, il avait été observé que la population algale était rapidement contrôlée par les daphnies, qui venaient à manquer de nourriture en fin d'expérience. De plus, la croissance des lentilles d'eau était décrite comme linéaire dans les essais LAM contrairement aux essais mono-spécifiques standards, réalisés avec des milieux plus riches en nutriments, où elle était exponentielle [160, 53]. En fait, la croissance logistique des lentilles d'eau était fortement limitée par le manque de nutriments dans l'essai LAM et seul le tout début de la phase exponentielle était observé. De plus, les lentilles d'eau montraient des signes de carence (décoloration, désolidarisation des frondes) [160]. Le phosphore est également un élément nécessaire à la croissance des daphnies [167].

Calcium et magnésium

Les ions calcium et magnésium participent à de nombreux processus biologiques et sont essentiels pour le développement des invertébrés. En particulier, Hessen [88] montre qu'une carence en calcium affecte le taux de croissance et la reproduction des daphnies. Triffault-Bouchet [160] souligne que la concentration en ions calcium dans le milieu microcosme était trop faible pour permettre le bon développement des hyalelles et surtout des daphnies. Le calcium fait notamment partie de la composition de la cuticule de ces invertébrés. Au CEAEQ, la dureté de l'eau microcosme (30 mg.l^{-1} de CaCO_3) a donc été doublée et le rapport Ca/Mg a été ajusté à 4 afin d'être plus représentatif de la dureté moyenne d'une eau du Québec. Dans une expérience spécifique, la dureté et le rapport Ca/Mg peuvent être ajustés pour que l'eau reconstituée soit plus représentative d'un milieu naturel donné.

Oligoéléments

Tout comme les vitamines, les oligoéléments jouent un rôle fondamental dans les processus de développement des organismes. Les vitamines, précurseurs des co-enzymes, et les minéraux sont des

facteurs indispensables à l'activité enzymatique. En effet, les cations tels que Mg^{2+} et Ca^{2+} mais aussi Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} et Se^{2+} favorisent la bonne conformation de l'enzyme, la fixation du substrat sur l'enzyme ou participent directement à la catalyse. Elendt [64] a montré l'importance des oligoéléments pour le développement des daphnies. L'absence de sélénium, notamment, entraîne des dommages aux antennes des cladocères. Cependant, il convient de bien choisir les quantités introduites pour chaque élément car ces éléments deviennent toxiques à des concentrations trop importantes. Elendt et Bias [65] ont comparé de nombreuses solutions d'oligoéléments en faisant varier les constituants et leur proportion et montrent que les oligoéléments du milieu M4 permettent un bon développement des daphnies. De plus, des conditions pauvres sont souvent accompagnées d'une importante variabilité des résultats dans les essais témoins et d'une répétabilité faible [65]. On peut supposer que le mauvais état de santé de certains organismes, dû à un manque en éléments essentiels, augmente la variabilité.

Le milieu M4 a été utilisé pour l'élevage des daphnies, des hyalines et des chironomes et montre qu'il permet un bon développement de ces organismes. Triffault-Bouchet *et al.* [163] ont introduit la solution de vitamines du milieu M4 (Elendt, 1990) dans l'eau reconstituée du microcosme (EM) pour pallier le manque de vitamines.

EDTA

L'EDTA est une molécule chimique comportant 4 fonctions acides carboxyliques et 2 fonctions amines. Cet agent chélatant a la capacité de former des complexes stables avec des ions majeurs comme le calcium et le magnésium ou des ions traces métalliques comme le cuivre, le zinc, le plomb ou le cadmium [76, 103]. Il est fréquemment utilisé dans les milieux de culture artificiels (APP medium, M4) car il permet de maintenir des oligoéléments en solution et augmente ainsi leur disponibilité pour les organismes, en particulier le fer [65, 103]. D'autres composés chélatants sont parfois ajoutés comme des acides humiques [26].

Cependant, de nombreuses études ont montré que l'EDTA réduisait la sensibilité des bioessais de toxicité sur les métaux ([92], [147], [84]). En effet, la toxicité des métaux est fonction de la concentration en ions libres en solution. En présence d'EDTA, la proportion de métaux sous forme libre diminue, ce qui peut conduire à une sous estimation de la toxicité d'une matrice contenant des métaux. Guilhermino déconseille l'utilisation de milieu d'essai contenant de l'EDTA dans le cas d'évaluation de la toxicité de matrice de composition inconnue [84]. Lors de sa thèse, Triffault-Bouchet a diminué la concentration en EDTA dans l'eau reconstituée des microcosmes [160]. Au CEAEQ, le choix a ensuite été fait de retirer complètement l'EDTA des milieux d'essai.

2.2.4 Sédiment

2.2.4.1 Intérêt du compartiment sédimentaire

La présence d'un compartiment sédimentaire dans l'essai permet d'évaluer la toxicité de sédiments naturels potentiellement contaminés ou de sédiments contaminés artificiellement sur les organismes aquatiques pélagiques et benthiques [54, 173, 162, 41].

Mais le sédiment permet également de prendre en compte le rôle du compartiment sédimentaire des écosystèmes aquatiques dans la spéciation des contaminants introduits via l'eau et dans l'exposition des organismes à ces contaminants [179, 101].

Le sédiment favorise aussi le développement de microorganismes ainsi que la constitution de biofilm qui jouent un rôle important dans le cycle des éléments, la chaîne alimentaire et la spéciation des polluants.

2.2.4.2 Sédiment naturel ou artificiel

Tout comme pour l'eau, il est possible de travailler avec un sédiment naturel ou artificiel. Ce choix est largement discuté dans la littérature [150, 32, 53, 137]. Un mélange de sédiment naturel et artificiel est parfois utilisé [138].

2.2.4.3 Composition du sédiment artificiel

La composition des sédiments artificiels n'est pas standardisée. Cependant, ces sédiments comportent généralement du sable, de l'argile, du carbonate de calcium (rôle tampon) et une source de nourriture (matière organique) pour les organismes se développant dans le sédiment [41]. Les sources de matière organique retenues sont l' α -cellulose et le Tétramin®[®], un aliment pour poisson.

Le tableau 2.1 présente la composition des sédiments utilisés lors d'expériences en microcosme menées au LEHNA et au CEAEQ.

Sables

Dans la plupart des essais LAMs réalisés, la phase sableuse est constituée de sable fin (sable de Fontainebleau). Au CEAEQ, en 2005, il a été décidé de complexifier la partie sableuse en mélangeant 3 sables de granulométries différentes (S4, tableau 2.1). Ce choix avait été fait en vue d'améliorer le réalisme environnemental et de favoriser le développement des organismes benthiques.

Argile

L'argile est un constituant majeur des sédiments, souvent ajouté dans les sédiments artificiels. Clément et Cadier [54] n'en avaient pas introduit en 1998 dans leur sédiment artificiel. Mais à partir des travaux de thèse de Verrhiest [173] qui ont suivi, du kaolin a été inclus dans la phase sédimentaire à hauteur de 30% de la masse sèche (S1, tableau 2.1).

Cependant, le développement et l'activité des organismes benthiques ainsi que la manipulation des systèmes entraînent une remise en suspension du kaolin, qui constitue une limite importante de l'essai. En effet, ce phénomène a plusieurs conséquences, parmi lesquelles :

- la modification de la répartition et la biodisponibilité des polluants conduisant à des conditions d'exposition des organismes non réalistes,
- le colmatage du tractus digestif des daphnies,
- et l'augmentation de la turbidité de la colonne d'eau, qui est susceptible de perturber la pénétration de la lumière, nécessaire à la croissance algale.

TABLE 2.1 – Composition de sédiments artificiels utilisés dans les essais LAMs au CEAEQ et au LEHNA

composé	S0	S1 ou S1'	S2	S3	S4	S5
expérimentateurs	Clément et Cadier	Verrhiest	Triffault- Bouchet	Cauzzi	Triffault- Bouchet, Delhaye	Raevel
année	1998	2001	2004	2007	2006	2007
ref.	[54]	[173]	[164]	[41]	non publié	[132]
$m_{sèche}$ totale (g)	267	$\simeq 300$	150	100	150	150
composition (%)						
sable fin (100-200 μm)	97	65 ou 74	-	74	63.25	88.13
sable de Loire (200-500 μm)	-	-	65	-	20	-
sable grossier (500-1000 μm)	-	-	-	-	5	-
kaolin (argile)	-	30 ou 20	30	20	10	10
CaCO ₃	-	0.1	0.1	1.0	0.1	0.1
α -cellulose	2.4	4.85	4.75	4.85	1.5	1.5
TétraMin®	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.3

On a supposé que la concentration en kaolin dans la colonne d'eau était proportionnelle à la concentration initiale dans le sédiment et qu'une diminution de la concentration en kaolin dans le sédiment permettrait donc de réduire sa remise en suspension. En 2006, au CEAEQ, Triffault-Bouchet a donc réduit à 10% la concentration en kaolin dans le sédiment artificiel.

2.2.4.4 Maturation du sédiment

La phase de maturation du sédiment ($J_i - J_0$) permet le développement de populations de micro-organismes et la stabilisation de plusieurs paramètres physico-chimiques (pH, le potentiel d'oxydo-réduction,...) et microbiologiques [150, 32, 94, 24, 175]. Les populations de micro-organismes initient la dégradation de la matière organique et constituent une source de nourriture supplémentaire pour consommateurs primaires. Le développement et la survie des organismes benthiques sont alors améliorés par cette phase de maturation. Lors des travaux de thèse de Triffault-Bouchet [160], la phase de maturation était de 4j en moyenne. Cauzzi [41], quant à lui, laissait mûrir le sédiment au minimum 7 jours.

2.2.5 Organismes

Dans les essais en microcosme, le développement de 5 espèces d'organismes aquatiques d'eau douce (*P. subcapitata*, *L. minor*, *D. magna*, *H. azteca*, *C. riparius*) est suivi au cours du temps.

2.2.5.1 Choix des organismes

Les principaux critères de choix des organismes sont la sensibilité ainsi que les possibilités et facilité d'élevage ou de culture. Les organismes rassemblés dans cet essai en microcosme sont des organismes retenus pour des essais de toxicité mono-spécifiques classiques, qui correspondent à différents niveaux trophiques (producteurs et consommateurs primaires) et évoluent dans les différents compartiments abiotiques (tableau 2.2). Etant donné la taille des systèmes et la durée de l'essai, seuls des organismes de petite taille à court cycle de vie peuvent être utilisés [87]. Nos microcosmes sont donc des écosystèmes simplifiés contenant des producteurs et consommateurs primaires, à la base des chaînes alimentaires. Il existe des relations trophiques entre ces espèces dans les microcosmes : les algues sont consommées par les invertébrés. Des décomposeurs se développent aussi dans les systèmes, mais ne sont pas introduits volontairement et ne sont pas contrôlés.

Producteurs primaires

Dans les essais en microcosme, les producteurs primaires sont principalement représentés par le phytoplancton et éventuellement le périphyton [41]. Clément et ses collaborateurs ont choisi d'introduire une seule espèce d'algue, *Pseudokirchneriella subcapitata*, contrairement à Taub [156] qui suivait plusieurs espèces.

Des macrophytes flottantes, les lentilles d'eau *Lemna minor*, sont également introduites. En effet, les macrophytes jouent un rôle important dans les écosystèmes car elles sont notamment un refuge pour les invertébrés [30, 31] et un support pour le développement de communautés périphytiques,

sources de nourriture pour les consommateurs primaires. Lorsque les essais de toxicité sur les algues révélaient une forte toxicité, il était déjà recommandé avant les années 1980, de réaliser des essais complémentaires sur des plantes supérieures. Les membres de la famille des Lemnaceae, en particulier les *Lemna minor*, ont été proposées comme des macrophytes “représentatifs” et utiles pour l’évaluation de la toxicité des produits chimiques dès 1979 [22]. En effet, ces plantes ont comme avantage, en plus de leur petite taille et leur facilité de culture, un grand ratio aire sur volume, une faible cuticule sur la face des frondes en contact avec la solution test et la possibilité de réaliser les essais à partir d’un seul clone, puisque la reproduction est végétative [22]. D’après Cleuvers et Ratte [51], les lentilles d’eau sont un bon complément des algues, pour l’évaluation de la phytotoxicité des substances colorées en particulier.

Consommateurs primaires

Les consommateurs primaires sont généralement représentés par des invertébrés pélagiques (rotifères, copépodes, cladocères) et/ou (épi)benthiques (amphipodes, larves d’insectes, oligochètes). Clément et ses collaborateurs ont choisi d’introduire 3 espèces d’invertébrés : des daphnies *Daphnia magna*, des hyalles *Hyaella azteca* et des chironomes *Chironomus riparius*. Les daphnies sont des organismes pélagiques, évoluant dans la colonne d’eau, mais qui sont néanmoins également exposés au sédiment, qu’elles ont tendance à remuer en surface pour se nourrir [101, 107]. Les hyalles sont des organismes épibenthiques utilisés pour tester la toxicité de sédiments. Elles sont généralement enfouies dans le sédiment, mais on peut les voir se déplacer à la surface sur sédiment, sur les parois du bécher, sur les racines des lentilles d’eau ou nager dans la colonne d’eau (les observations sur l’enfouissement varient suivant les laboratoires [45]). Elles ne sont donc pas seulement exposées via le sédiment aux contaminants. D’après Chapman *et al.* [45], les hyalles sont utiles pour tester la toxicité des sédiments mais ne doivent pas être utilisées seules. Les larves de chironomes, qui se développent essentiellement dans le sédiment, bien qu’on observe, dans nos microcosmes, qu’elles se nourrissent également du biofilm à la surface du sédiment, sont un bon complément des hyalles pour tester la toxicité de sédiment.

2.2.5.2 Organismes : biologie et écologie

Quelques caractéristiques biologiques et écologiques des organismes d’eau douce utilisés dans le LAM sont données ci-dessous et synthétisées dans les tableaux 2.2 et 2.3.

Pseudokirchneriella subcapitata

L’algue verte unicellulaire *Pseudokirchneriella subcapitata* fait partie de la famille des Chlorophyceae. Cette algue microscopique a une taille inférieure à 6 μm . Son cytoplasme renferme principalement de la chlorophylle a, de la chlorophylle b et des pigments caroténoïdes [160]. Les cellules sont isolées ou regroupées par paquets irréguliers. La reproduction se fait par division cellulaire.

Elle est présente dans divers milieux lenticques, dans la colonne d’eau ou le sédiment. Son développement est principalement limité par les teneurs en azote, en phosphore et la luminosité. Elle

TABLE 2.2 – Eléments sur la biologie des producteurs primaires utilisés dans les essais

organisme	Algue	Lentille d'eau
espèce étudiée	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (<i>Selenastrum capricornutum</i>)	<i>Lemna minor</i>
abréviation	Ps phytoplancton (et périphyton)	Lm macrophyte flottant
milieu de vie	colonne d'eau et surface du sédiment pélagique	interface colonne d'eau et air pélagique
ch. trophique	producteur I photosynthétique	producteur I photosynthétique
reproduction	division cellulaire	végétative (bourgeoisements successifs latéraux)
taille	< 6 μm	diamètre des frondes < 5 mm longueur racines < 15 cm
pour plus d'informations	[113]	[89, 90]

TABLE 2.3 – Eléments sur la biologie des consommateurs primaires utilisés dans les essais

organisme	daphnie	hyallele	chironome
espèce étudiée	<i>Daphnia magna</i>	<i>Hyalella azteca</i>	<i>Chironomus riparius</i>
abréviation	Dm crustacé	Ha amphipode	Cr diptère
milieu de vie	eau et surface du sédiment	sédiment et colonne d'eau	<i>larve</i> : sédiment et surface du sédiment <i>nymphé</i> : sédiment et colonne d'eau <i>insecte</i> : air
ch. trophique	pélagique consommateur I	épibenthique consommateur I	benthique consommateur I
source nourriture	filtreur algues, bactéries	épiphytique algues, bactéries à la surface du sédiment	détritivore algues, bactéries, champignons, débris alimentaires
reproduction	asexuée (parthénogénétique) ou sexuée	sexuée	sexuée
âge maturité (j)	$\simeq 10$	$\simeq 40$	$\simeq 20$
taille	< 6 mm	< 1 cm	larves < 1.5 cm
pour plus d'informations	[107]	[24]	[24]

constitue une part importante de la nourriture consommée par le zooplancton.

Lemna minor

Les lentilles d'eau *Lemna minor* sont des macrophytes flottants à la surface de l'eau (non enracinées dans le sédiment). Elles appartiennent à la famille des *Lemnaceae*. Elles se présentent sous forme de colonies de 2 à 4 frondes, de diamètre inférieur à 5 mm. Chaque fronde possède une racine dont la longueur, inférieure à 15 cm, dépend notamment de la disponibilité en azote et phosphore [115].

Elles se reproduisent généralement par multiplication végétative, sous la forme de bourgeonnements successifs latéraux. Une fronde peut produire jusqu'à 10 ou 20 frondes filles.

Elles sont présentes dans divers milieux aquatiques, principalement lentiques, des zones tempérées de l'hémisphère nord. Elles se développent particulièrement dans les milieux riches en azote et en phosphore. Elles sont une source de nourriture pour les oiseaux, les gastéropodes, les gammares,... Ces organismes participent à leur dissémination [115].

Daphnia magna

Les microcrustacés *Daphnia magna* appartiennent à la famille des *Daphnidae* et à l'ordre des *Cladocera*. Ces daphnies sont les plus grandes du genre *Daphnia* (jusqu'à 6 mm). Elles sont présentes dans les écosystèmes aquatiques des zones tempérées et particulièrement les eaux calmes.

Elles sont recouvertes d'un exosquelette transparent renouvelé par mue. Elles possèdent une grande paire d'antenne servant au déplacement et une plus petite permettant l'alimentation [41]. Le battement des appendices thoraciques crée un courant d'aspiration qui leur permet de filtrer l'eau afin de se nourrir de particules en suspension (algues, bactéries, matière organique,...).

Les femelles peuvent se reproduire sans mâle et produire deux types d'œufs suivant les conditions environnementales. En conditions favorables, les femelles matures produisent des œufs (10 à 30) qui donnent naissance à des clones (même génome). En conditions défavorables, les œufs donnent des mâles et des femelles. Les femelles une fois fécondées par les mâles produisent des œufs contenus dans une poche protectrice (épiphippie). Ces œufs protégés demeurent viables pendant plusieurs mois dans l'attente de conditions plus favorables. Ils conduisent à des clones de leur mère, ce qui permet une reprise du cycle parthénogénétique.

Hyalella azteca

Les crustacés *Hyalella azteca* appartiennent à la famille des *Hyalellidae* et à l'ordre des *Amphipoda*. Ces hyalelles font moins d'1 cm de longueur. Cette espèce est originaire d'Amérique du nord. Elle se développe principalement dans les zones littorales peu profondes et bien oxygénées [41]. Les hyalelles sont des organismes épibenthiques. Elles tirent principalement leur nourriture du sédiment (algues, bactéries, matière organique,...) et aiment s'y réfugier. Elles sont principalement consommées par les poissons et les invertébrés de grande taille.

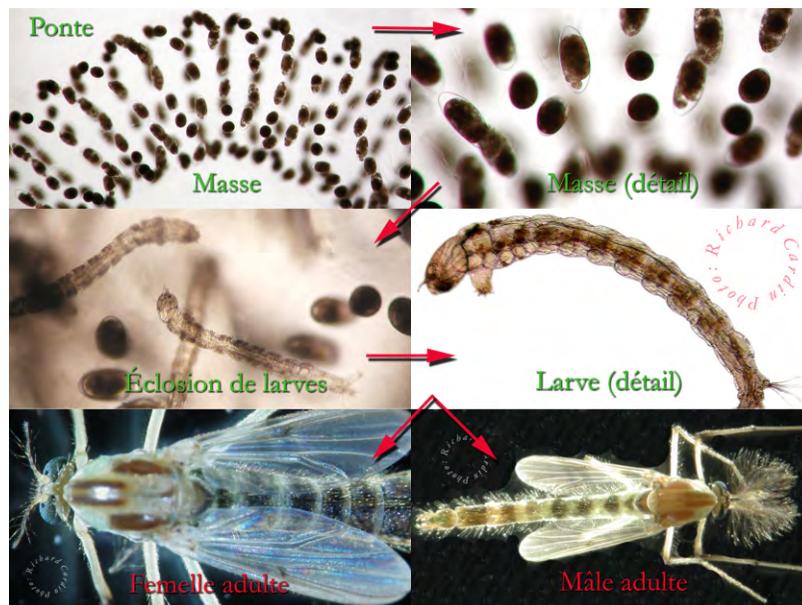


FIGURE 2.5 – Photographies de différentes étapes du cycle de vie des chironomes *C. riparius*

Le cycle de vie des hyalles comprend trois stades de développement : un stade immature, un stade juvénile et un stade adulte. La maturité sexuelle est atteinte au bout de 5 à 6 semaines [24]. Elle n'est donc pas atteinte pendant l'essai en microcosme.

La reproduction des hyalles est sexuée et initiée par la mise en amplexus du mâle et de la femelle (le mâle s'accroche à la femelle). La femelle fécondée mue ensuite, ce qui lui permet de libérer les jeunes de la portée précédente (1 à 30). La fertilisation des œufs nouvellement produits a lieu après cette mue.

Chironomus riparius

L'insecte *Chironomus riparius* appartient à la famille des *Chironomidae* et de l'ordre des *Diptera*. Ces chironomes sont principalement présents dans les milieux aquatiques lenticules et lotiques d'Amérique du nord et d'Europe. Le cycle de vie des chironomes comprend 4 stades : œuf (surface de l'eau, dans la masse, 2 jours), larves (sédiment, 16-20 jours), nymphe (sédiment et colonne d'eau) et imago (air) (figure 2.5). Les larves (inférieure à 1.5 cm) peuplent les 10 premiers centimètres des sédiments. Elles se nourrissent principalement de bactéries, d'algues, de champignons et de matière organique présents dans le sédiment. Elles sont consommées par les poissons, oiseaux et invertébrés de grande taille.

Les adultes ont une durée de vie très courte (quelques jours) et s'accouplent rapidement. 24 à 48 heures après, les femelles fécondées pondent une série d'œufs (entre 150 et 600) appelée masse. Cette dernière est accrochée en surface de la colonne d'eau sur des supports divers (bêcher ou racine des lentilles d'eau dans un microcosme). L'éclosion des œufs donne finalement naissance à des larves de faible taille qui vont gagner le sédiment.

2.2.5.3 Manipulation et suivi des daphnies

Dans les premiers essais LAMs réalisés, Clément et ses collaborateurs laissaient l'ensemble des daphnies (mères et néonates) dans les microcosmes tout au long de l'essai [54]. Néanmoins, les densités de daphnies étaient trop importantes en fin d'essai, il a donc été décidé d'éliminer les néonates en cours d'essai, à l'occasion des dénombrements [55], ce qui est également réalisé dans les tests mono-spécifiques standard de reproduction des daphnies sur 21 jours.

2.3 Exposition et effet du cadmium

2.3.1 Le cadmium dans l'environnement et son utilisation

La croûte terrestre contient en moyenne $0.18 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de cadmium [170]. Le cadmium se trouve associé aux minerais contenant du zinc ou du plomb. Les niveaux de cadmium dans les sols sont généralement compris entre 0.01 et $1.8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ [170]. De plus fortes concentrations sont présentes dans les sédiments récents des fleuves et cours d'eau (0.60 à $74 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) [113]. Lum [111] rapporte des concentrations en cadmium dans l'eau dans les grands lacs et le fleuve Saint Laurent de 0.01 à $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ et Kottelat [101] des concentrations en cadmium dissous dans les eaux naturelles de 0.02 à $0.08 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ avec environ 10% sous forme colloïdale.

Le cadmium est principalement utilisé pour la production d'accumulateurs, de pigments, pour le cadmiage qui consiste en la déposition d'une fine couche de cadmium pour protéger la surface des métaux contre la corrosion ainsi que pour stabiliser des produits en PCV (polychlorure de vinyle) [91].

2.3.2 De l'exposition aux effets

La toxicité d'un métal pour les organismes dépend de sa disponibilité environnementale et de sa bioaccumulation (figure 2.6). Plus précisément, les effets toxiques d'un métal sur un organisme sont liés à sa spéciation, sa concentration dans les différents compartiments abiotiques (partition solide-liquide), sa prise en charge, son internalisation, son transport et sa distribution interne ainsi que son interaction avec les biomolécules [35, 60, 34]. L'ensemble de ces facteurs sont liés à la durée d'exposition, les conditions environnementales, la composition des milieux abiotiques et les espèces considérées.

2.3.2.1 Spéciation

La spéciation chimique d'un élément est la distinction entre les différentes formes chimiques possibles (espèces) de cet élément dans un environnement donné [144]. La distribution des métaux entre ces différentes formes est en équilibre dynamique. La spéciation est la base de la compréhension du devenir des métaux trace dans les milieux aquatiques [144].

Les métaux en solution peuvent être présents sous forme :

- d'ion libre (en réalité, en solution aqueuse, les cations métalliques sont associés à des molécules d'eau qui forment une sphère d'hydratation [34]),
- de complexe avec

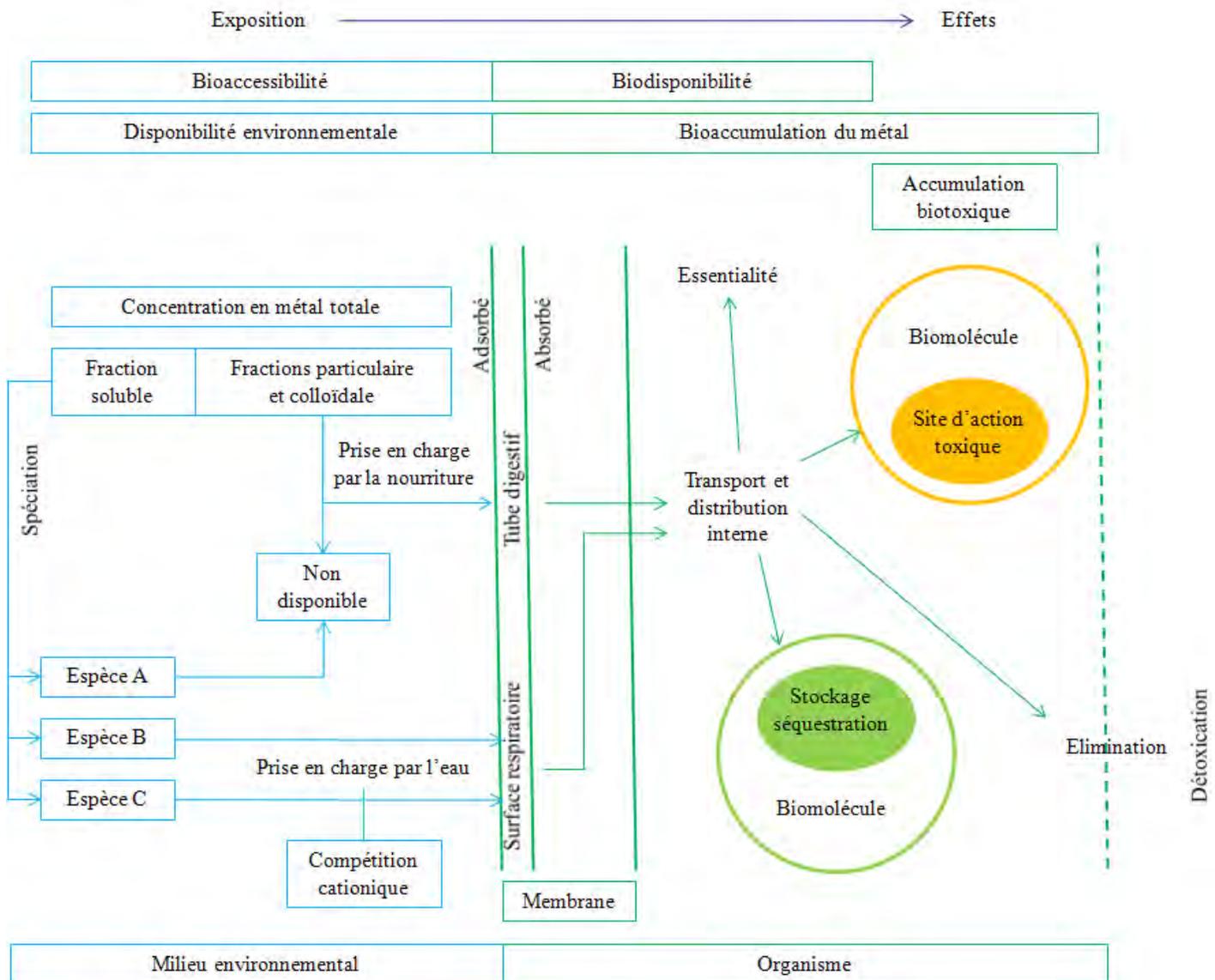


FIGURE 2.6 – Schéma conceptuel pour évaluer les processus de bioaccessibilité et biodisponibilité des métaux dans les systèmes aquatiques (d'après Drexler *et al.* [60])

- des ligands minéraux (HCO_3^- , CO_3^{2-} , Cl^- , SO_4^{2-} , $\text{S}^{2-}/\text{HS}^-$, ...),
- des ligands organiques monomères simples (acides acétique, phénol, acides aminés, acides polycarboxyliques, ...) ou polymères complexes (protéines, glucides, acides humiques, acides fulviques, ...),
- des ligands synthétiques (EDTA, NTA, ...),
- à la surface de colloïdes inertes ou vivants (bactéries),
- ou des particules en suspension,
- de précipité (hydroxyde ou carbonate).

Le cadmium est un cation B dans la classification des éléments en fonction de leurs propriétés chimiques de coordination. C'est un cation "mou", dont les interactions sont en partie de caractère covalent et qui est de préférence lié aux ligands contenant du soufre ou de l'azote d'après Sigg et al. [144]. D'après Campbell et Couillard [34], le cadmium a tendance à rester libre en solution ou à s'associer aux carbonates plutôt qu'aux hydroxydes. Le cadmium s'adsorbe moins que d'autres métaux (Pb, Cu, Cr) aux colloïdes et à la matière organique dans les eaux naturelles [101]. Kottelat [101] trouve 10% de cadmium sous forme colloïdale dans ses expériences.

L'ion libre est plus toxique que les formes complexées ou précipitées [141]. Ceci s'explique par la capacité de l'ion libre à pénétrer l'organisme et à interagir avec les biomolécules. La bioaccumulation et la toxicité sont donc corrélées à la proportion de cadmium sous forme Cd^{2+} . Il est donc important de connaître la concentration en cadmium libre si l'on veut comprendre la toxicité du métal sur les organismes dans les différents essais.

Facteurs influençant la spéciation

De nombreux facteurs peuvent influencer la spéciation chimique du cadmium en solution aqueuse tels que la température, la pression et la composition de l'eau [125].

La présence de ligands dans l'eau pouvant complexer l'ion métallique entraîne une diminution directe de la concentration en ion libre et donc une diminution de la toxicité du cadmium. Une augmentation de l'alcalinité ou la salinité entraîne l'augmentation de la formation de paires d'ions CuCO_3 ou CdCl^+ et CdCl_{2aq} moins toxiques que l'ion libre Cd^{2+} . De nombreux auteurs ont montré que la bioaccumulation et la toxicité du cadmium diminuaient en présence de matière organique, notamment de substances humiques [183, 184, 103, 165]. L'influence sur la bioaccumulation et la toxicité de métaux, de la présence de ligands synthétisés par l'homme comme l'EDTA, fréquemment utilisé dans les eaux reconstituées, a également été démontrée pour de nombreux organismes, notamment les lentilles d'eau [58] et les daphnies [147].

Les colloïdes, sur lesquels les métaux peuvent s'adsorber participent également à la diminution de la concentration en cadmium libre dans l'eau.

La présence dans l'eau d'ions en compétition pour la formation de complexes (H^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) peut également avoir un impact sur la spéciation des métaux et donc leur toxicité. De nombreux auteurs ont en effet montré que la toxicité des métaux augmentait avec la dureté de l'eau [188, 184, 183, 93, 46, 186]. Cette conclusion a été néanmoins remise en cause récemment par les travaux de Markich *et al.* [114] et Maloney [113].

2.3.2.2 Partition solide-eau

Il est nécessaire de connaître la partition du métal entre l'eau et les solides pour comprendre l'exposition des organismes dans les systèmes aquatiques. Sigg *et al.* [144] utilisent le terme "sorption" pour désigner "tout processus à l'interface conduisant à un changement de phase (solide-liquide) du soluté ou à la transformation d'une surface de par la présence du soluté ou de son environnement". Les mécanismes de sorption sont (1) l'échange d'ion, (2) la complexation de surface, (3) la précipitation de surface, (4) les processus de sorption liés au caractère hydrophobe de la surface ou du composé considéré, (5) l'absorption (incorporation du soluté dans la matrice solide), (6) la diffusion dans la phase solide [144]. Ces mécanismes font intervenir la spéciation du soluté.

Le coefficient de partition du métal K_d est le ratio entre la concentration en métal "sorbé" et la concentration en métal dissous [5]. Le tableau 2.4 donne les coefficients de partition du cadmium entre différents solides et l'eau.

TABLE 2.4 – Coefficients de partition K_d du cadmium solide/eau (médiane et intervalle) (d'après [5])

solide	sédiment	matière en suspension	COD
$\log(K_d)$ (en l.kg^{-1})	3.6 (0.5 - 7.3)	4.7 (2.8 - 6.3)	5.2 (3.4 - 5.5)

2.3.2.3 Durée d'exposition

La réponse des organismes à un contaminant augmente généralement avec la durée d'exposition. Cependant, ces résultats sont plus ou moins marqués suivant les durées, les contaminants [62] et espèces testées [151] ainsi que les paramètres choisis [151]. Pour des expositions à de faibles concentrations sur de longues périodes, il peut apparaître des effets sous-létaux, qui n'ont pas forcément d'impact sur l'organisme lui même mais qui peuvent en avoir à l'échelle de la population.

2.3.2.4 Sensibilité de l'organisme

Beaucoup d'études ont été réalisées sur la sensibilité des organismes aux contaminants et aux métaux plus particulièrement. Celle-ci dépend de nombreux critères parmi lesquels :

- l'espèce [125, 151, 170],
- le génome (sous-espèce) [11, 14, 10, 119, 149, 63, 12, 9, 82, 131]
- l'âge ou le stade de développement initial des organismes [120]
- la nourriture ou les éléments nutritifs [185] :
 - concentration N/P [187]
 - type de nourriture [17]
- l'histoire de vie :
 - exposition préalable (de l'organisme ou des parents) et acclimatation [26, 39],
 - nutrition préalable de l'organisme et des parents [68],

- consanguinité [73],
- changement histoire de vie [145],
- le paramètre mesuré [151].

On peut également supposer qu'un meilleur fitness contribue à diminuer la sensibilité des organismes à une contamination. Les facteurs abiotiques contrôlent la concentration à l'entrée de l'organisme, mais l'organisme peut aussi mettre en place des stratégies de régulation de la solubilité des métaux en interne.

2.3.3 Effet du cadmium sur les organismes du LAM

Il existe un très grand nombre d'études sur les effets du cadmium chez les organismes aquatiques, dont les LC50 peuvent varier d'un facteur 10 – 100 selon les auteurs et les conditions [101]. Les tableaux 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 et 2.9 présentent quelques résultats de la littérature concernant la toxicité du cadmium sur les organismes aquatiques du microcosme.

2.3.3.1 Algues

Les algues d'eau douce ont une charge nette négative ce qui entraîne une affinité pour les espèces chargés positivement, comme les cations métalliques. Il existe deux phases distinctes dans la prise en charge des métaux par les cellules algales : (1) une phase rapide d'adsorption physique par échange d'ion avec la paroi cellulaire (10 min) et (2) une phase plus lente de transport actif du métal dans le cytoplasme de la cellule (internalisation) [158, 125]. Le métal pénètre dans la cellule via les canaux de transport de cations [35]. D'après Sofyan *et al.* [146] l'accumulation du cadmium dans les algues augmente avec la concentration en cadmium dans le milieu de culture et les facteurs de bioconcentration du cadmium dans les *P. subcapitata* sont compris entre 28 et 78.

2.3.3.2 Invertébrés

Les invertébrés sont exposés au cadmium via l'eau, la nourriture et les sédiments [125, 101]. Bien que la concentration en métal soit généralement beaucoup plus importante dans le sédiment que la colonne d'eau, seule une petite fraction est biodisponible. Mais l'activité de bioturbation des organismes benthiques (1) relâche, dans la colonne d'eau, une importante quantité d'eau interstitielle, qui contient de fortes concentrations en cadmium et (2) ramène des sédiments des couches profondes au niveau de la surface, où d'autres processus de spéciation peuvent être initiés [125]. Wang *et al.* [178] montrent que l'accumulation du cadmium par les hyalles est corrélée au métal biodisponible dans l'eau de surface au cours des bioessais de toxicité réalisés avec une phase sédimentaire en laboratoire.

Le cadmium a la capacité de s'adsorber rapidement sur la carapace de *Daphnia magna* puis de diffuser lentement dans l'organisme [136].

TABLE 2.5 – Toxicité du cadmium sur les algues *P. subcapitata* dans la littérature (d'après [113])

conditions	paramètre		Cd	$\mu\text{g.l}^{-1}$	ref.
AAP avec EDTA (0.8 μM)	croissance (CMEO) croissance (inhib.)	-	total	79.8 49.4	[15]
AAP avec EDTA (0.8 μM) (1) AAP sans EDTA (2)	croissance	CI50 (4 j)	total	56.2 (1) 23.2 (2)	[159]
FRAQUIL chélate (1) FRAQUIL avec NTA (10 μM) (2)	biomasse	CI50 (3 j)	libre	45.0 (1) 31.5 (2)	[69]
SAAM EDTA (0.8 μM) culture continue	croissance	CI50 (1 j)	total	32.0	[110]
US EPA (1985) modifié avec EDTA (80 nM) [EDTA] = 1 μM conditions statiques	croissance	CI50	total	340.6	[49], [48]
AAM avec EDTA (0.8 μM)	croissance (biomasse) (14 - 21 j)	-	total	57.3	[166]
AAP AAPm	activité photo- synthétique (^{14}C)	EC50		200 270	[103]
milieu CEAEQ	croissance (nb cellules)	CI50 (4 j)	total	9.3 ± 2.0	CEAEQ, non pub.
[171]	croissance (nb cellules)	CI50 (4 j)	total total	1.6 9.2	[146]
milieu CEAEQ 2003 sans EDTA	croissance (nb cellules)	CI50 (4 j)	total libre	9.5 [8.9 ; 10.1] 9.4 [8.8 ; 10.0]	[113]

TABLE 2.6 – Toxicité du cadmium sur les lentilles d'eau *L. minor* dans la littérature

conditions	paramètre		$\mu\text{g.l}^{-1}$	ref.
milieu standard [1] pH = 7.5 ± 0.2 T = $27 \pm 2^\circ\text{C}$ Eclairement : 6450 lux	chlorophylle	EC ₅₀ (4 j)	200	[180]
statique eau reconstituée sans EDTA dureté = $39 \text{ mg.l}^{-1}\text{CaCO}_3$ T = 25°C Eclairement continu : 1615 ± 110 lux	croissance	EC ₅₀ (4 j)	54	[155]
-	croissance	EC ₅₀ (10 j)	169	[105]
milieu Steinberg stérilisé EDTA = $4.03 \mu\text{M}$ pH = 5.5 ± 0.2 T = $25 \pm 2^\circ\text{C}$ Eclairement continu : 85-125 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-2}$	croissance	EC ₅₀ (3 j) EC ₅₀ (7 j)	393 214	[62]

TABLE 2.7 – Toxicité du cadmium sur les daphnies *D. magna* dans la littérature (ldc : léger déclin de la consommation ; fdc : fort déclin de la consommation)

conditions	paramètre		Cd	conc. ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	ref.
-	survie	LC50 (2 j)	total libre	39 30	[141]
eau	survie	LC50 (2 j)	total	36-33-24-40	[124]
eau			libre	28-25-18-31	
eau et sédiment			total	61-27-100	
dureté = 150 $\text{mg.l}^{-1}\text{CaCO}_3$	ldc	EC50 (14 j)		1	[23]
	fdc	EC50 (14 j)		5	
3 niveau de nourriture		LC50 (21 j)		3.5 - 8.3	[67]
milieu ASTM T = $20 \pm 1^\circ\text{C}$ photopériode : 16j/8n daphnies <24 h	mobilité	EC50 (2 j)	total	9.5 (9.3 - 9.7)	[85]
dureté = 69-87 $\text{mg.l}^{-1}\text{CaCO}_3$	-	EC50 (2 j)		26.4	[151]
		EC50 (4 j)		12.7	
		EC50 (7 j)		9.9	
		EC50 (10 j)		9	
		EC50 (14 j)		8.6	
milieu ASTM milieu M7 milieu EEC	mobilité	EC50 (2 j)		331.6 9.5 9.8	[84]
milieu ASTM	reproduction	EC50 (21 j)		6.1	[86]
		NOEC/LOEC		3.2 / 4.8	
milieu ADaM T = 20°C photopériode : 16j/8n daphnies <48 h 0.7 W.m^{-2} $0.07 \text{ mgC.daphnie}^{-1}.\text{j}^{-1}$	croissance	EC10 (8 j)	libre	6.3	[97]
		EC10 (12 j)		5.4	
		EC10 (15 j)		6.0	
		EC10 (17 j)		7.3	
	reproduction	EC10 (17 j)		3.1	
Milieu M4 avec Na_2EDTA et FeSO_4 remplacés par COD naturel (4mg.l^{-1} de C) daphnies acclimatées (≥ 6 générations), < 24h, 3 clones photopériode : 16j/8n T = 20°C (1) ou 24°C (2)	mobilité	EC50 (2 j)	dissous	112 ± 14 (1) 64 ± 12 (2)	[121]

TABLE 2.8 – Toxicité du cadmium sur les hyaelles *H. azteca* dans la littérature

conditions	paramètre		$\mu\text{g.l}^{-1}$	ref.
eau (1), eau-sédiment (2)	survie	LC50 (4 j)	8 (1)	[124]
		LC50 (10 j)	6 (1)	
		LC50 (4 j)	74 (2)	
		LC50 (10 j)	80 (2)	
dureté = 90 $\text{mg.l}^{-1}\text{CaCO}_3$ âge initiale : 0-2 j (1) ; 2-4 j (2) ; 4-6 j (3) ; 10-12 j (4) ; 16-18 j (5) ; 24-26 j (6)	survie	LC50 (4 j)	13 (1)	[56]
			7.5 (2)	
			9.5 (3)	
			7 (4)	
			11.5 (5)	
			14 (6)	
eau seulement, conditions statiques, 2 mg nourriture pour poisson J0 et J2	survie	LC50 (4 j)	13	[117]

TABLE 2.9 – Toxicité du cadmium sur les chironomes *C. riparius* dans la littérature

conditions	paramètre		mg.l^{-1}	ref.	
-	survie	LC50 (4 j)	1.76	[182] dans [29]	
eau seulement, conditions statiques, 2 mg nourriture pour poisson J0 et J2	survie	LC50 (3 j)	0.021	[117]	
eau seulement, sans nourriture dureté = 10 $\text{mg.l}^{-1}\text{CaCO}_3$ (1) dureté = 140 $\text{mg.l}^{-1}\text{CaCO}_3$ (2) larves du 3ème ou 4ème stade	survie	LC50 (2 j)		[79]	
					331 (1)
					1106 (2)

Chapitre 3

Matériels et méthodes

Dans ce chapitre, nous présenterons les protocoles expérimentaux des deux dernières expériences réalisées dans le cadre de cette thèse ainsi que les traitements de données effectués et utilisés dans ce manuscrit. Pour information, le lecteur trouvera la liste et les objectifs de l'ensemble des expériences réalisées au cours de cette thèse en annexe A.

3.1 Protocoles expérimentaux

Les essais en microcosme aquatique de laboratoire statique S et dynamique D ont été réalisés au Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés (LEHNA) à l'Ecole Nationale des Travaux Publics de l'Etat (ENTPE, France). Les deux essais n'ont pu être conduits simultanément pour des raisons logistiques. Ils ont été réalisés à 3 mois d'intervalle, en juin et octobre 2009, afin d'éviter les fortes températures de la période estivale. Les conditions d'essai sont synthétisées dans les tableaux 3.1 et 3.2.

Les expériences ont été entièrement réalisées par l'auteur de la thèse à l'exception des dosages d'ions par chromatographie ionique et spectrométrie d'absorption atomique, qui demandaient une technicité particulière que l'auteur n'a pu développer.

3.1.1 Photographies et schémas expérimentaux

La figure 3.1 présente les dispositifs expérimentaux des deux expériences. Afin de permettre l'installation et la manipulation des systèmes avec un renouvellement en continu de l'eau, nous avons dû changer d'étagères par rapport aux essais statiques (figure 3.1). Afin de retrouver plus rapidement les béciers lors des multiples mesures, les microcosmes ont été positionnés dans un ordre logique. Par rotation ou positionnement logique, nous entendons "selon une suite cohérente, régulière". Les béciers ont été déplacés de manière non aléatoire une ou deux fois par semaine. Ce point sera discuté dans le chapitre 4.

TABLE 3.1 – Conditions de l'essai en microcosme aquatique de laboratoire statique S

Type d'essai	Essai de toxicité chronique en microcosme aquatique de laboratoire sans renouvellement d'eau		
Durée de l'essai	21 j		
Nb de réplicats	4 réplicats par traitement		
Traitements	5 concentrations nominales en cadmium dans l'eau : 0 - 10 - 20 - 40 et 80 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$		
Température de la salle	22 \pm 4°C		
Eclairciment	environ 2000 lux, lampes fluorescentes à large spectre, photopériode : 16 jour / 8 nuit		
Récipient	bêcher de forme basse de 2 l (diamètre : 13 cm ; hauteur : 18.5 cm) en plastique (PMP transparent)		
Sédiment	100 g de sédiment reconstitué (88.35% de sable fin, 10% de sédiment naturel d'Aiguebelette séché et tamisé, 1.5% d' α -cellulose, 0.15% de TétralMin®)		
Colonne d'eau	eau reconstituée (EM), hauteur : environ 15 cm, 2 l introduits initialement		
Renouvellement de l'eau	aucun		
Aération de l'eau	continue		
Suivi de la qualité de l'eau	température, pH, oxygène dissous, conductivité, carbone organique dissous		
Dosage teneur en ions	NH_4^+ , PO_4^{3-} , NO_3^- et NO_2^- (spectrophotométrie) ; Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- et SO_4^{2-} (chromatographie ionique) ; Cd^{2+} (spectrométrie d'absorption atomique)		
Nourriture	aucune nourriture apportée au cours de l'essai		
Nettoyage des récipients	aucun		
Espèces introduites à J0	<i>P. subcapitata</i>	<i>L. minor</i>	<i>D. magna</i> <i>H. azteca</i> <i>C. riparius</i>
Age des organismes à J0	culture de 5 j	culture de 7 j	< 1 j 7 - 14 j 2 j
Nb d'organismes par réplicat à J0	2-10 ⁷ cel.	2 colonies 3 frondes	10 10 10
Nb d'organismes introduits au cours de l'expérience	-	-	-
Paramètres biologiques	croissance	croissance	survie, croissance, survie reproduction survie, émergence

TABLE 3.2 – Conditions de l'essai en microcosme aquatique de laboratoire dynamique de D

Type d'essai	Essai de toxicité chronique en microcosme aquatique de laboratoire avec renouvellement d'eau				
Durée de l'essai	21 j				
Nb de réplicats	4 réplicats par traitement				
Traitements	5 concentrations nominales en cadmium dans l'eau : 0 - 1.25 - 2.5 - 5 et 10 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$				
Température de la salle	20 \pm 1°C				
Eclairciment	environ 3000 lux, lampes fluorescentes à large spectre, photopériode : 16 jour / 8 nuit				
Récipient	bécher de forme basse de 2 l (diamètre : 13 cm ; hauteur : 18.5 cm) en plastique (PMP transparent)				
Sédiment	100 g de sédiment reconstitué (88.35% de sable fin, 10% de sédiment naturel d'Aiguebelette séché et tamisé, 1.5% d' α -cellulose, 0.15% de Tétramin®)				
Colonne d'eau	eau reconstituée (EM), hauteur : environ 15 cm, 2 l introduits initialement				
Renouvellement de l'eau	continu, 1 l.j ⁻¹				
Aération de l'eau	aucune				
Suivi de la qualité de l'eau	température, pH, oxygène dissous, conductivité				
Dosage teneur en ions	NH ₄ ⁺ , PO ₄ ³⁻ , NO ₃ ⁻ et NO ₂ ⁻ (spectrophotométrie) ; Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Cl ⁻ et SO ₄ ²⁻ (chromatographie ionique) ; Cd ²⁺ (spectrométrie d'absorption atomique)				
Nourriture	aucune nourriture apportée au cours de l'essai				
Nettoyage des récipients	si l'évacuation de l'eau est obstruée, brosser délicatement le filtre				
Espèces introduites à J0	<i>P. subcapitata</i> <i>L. minor</i> <i>D. magna</i> <i>H. azteca</i> <i>C. riparius</i>				
Age des organismes à J0	culture de 5 j	culture de 7 j	< 1 j	7 - 14 j	2 j
Nb d'organismes par réplicat à J0	2·10 ⁷ cel.	2 colonies 3 frondes	10	10	10
Nb d'organismes introduits au cours de l'expérience	2·10 ⁷ cel. à J2	-	-	-	-
Paramètres biologiques	croissance	croissance	survie, croissance, reproduction	survie, croissance, survie	survie, émergence

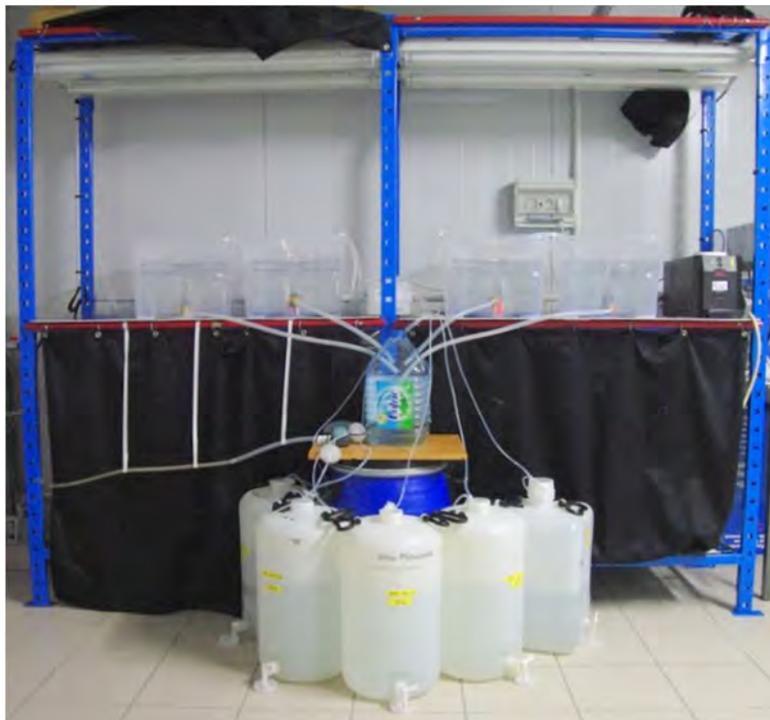
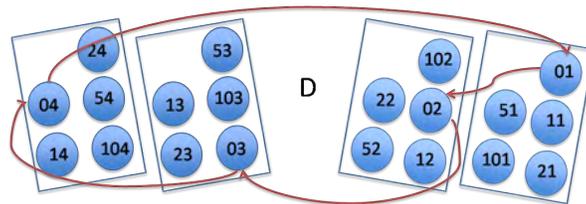
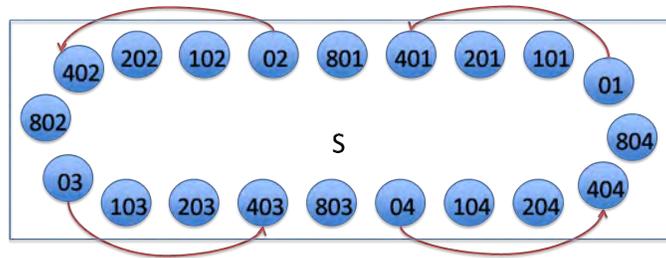


FIGURE 3.1 – Schémas expérimentaux du positionnement initial et de la rotation des béchers et photographies des expériences S et D réalisées sans et avec renouvellement d'eau (pour les numéros de bécber, les deux premiers chiffres correspondent au traitement, le dernier au numéro de réplicat)

3.1.2 Conditions environnementales

3.1.2.1 Température de la salle d'essai

Les essais ont été réalisés dans une salle thermostatée dans laquelle la température était maintenue à $20 \pm 2^\circ\text{C}$, hormis lors des journées où la température extérieure était trop importante pour que le système de climatisation de la pièce fonctionne correctement. La température dans la salle d'essai pouvait alors s'élever à plus de 26°C .

La température était mesurée grâce à un appareil portable d'électrochimie numérique (Hach, modèle HQ 30D Flexi).

3.1.2.2 Eclairage

Les microcosmes étaient éclairés par des lampes fluorescentes à large spectre à partir de J0. L'éclairage était différent dans les deux expériences. Dans l'expérience D, il y avait deux rampes de lumière au lieu d'une seule centrale et les néons étaient plus éloignés des systèmes.

Dans la plupart des expériences, une rotation bihebdomadaire logique des béciers assurait une uniformisation de l'éclairage moyen reçu par chaque système au cours de l'expérience. Dans l'expérience D, la rotation se faisait à l'intérieur de chaque traitement pour des raisons logistiques (alimentation continue en eau contaminée).

La photopériode était de 16h d'éclairage et 8h d'obscurité, comme préconisé dans les normes et protocoles des essais de toxicité réalisés avec les invertébrés que nous étudions [169, 37, 36, 43]. Cette photopériode, classiquement utilisée, correspond à une période maximale d'ensoleillement qui favorise le développement et l'activité des organismes et permet d'observer plus rapidement des effets (Bastien, com. pers.).

L'éclairage était mesuré grâce à un luxmètre dont la cellule photosensible est déposée au centre et au-dessus du film plastique ou couvercle couvrant le bécier. Dans l'expérience S, des films transparents alimentaires ont été utilisés pour recouvrir les microcosmes. Par contre, dans l'expérience D, le couvercle utilisé est plus épais, pour soutenir le système d'arrivée du flux d'eau. Il n'était pas tout à fait transparent. Le couvercle intercepte environ 500 lux dans l'expérience D. L'éclairage était compris entre 2000 et 4000 lux à la surface du film plastique ou couvercle.

3.1.3 Milieux abiotiques

Ces microcosmes de laboratoire sont réalisés dans des béciers avec bec verseur de forme basse (diamètre : 13 cm ; hauteur : 18.5 cm) en plastique (PMP transparent), lavés à l'acide nitrique dilué (environ 5%) et abondamment rincés à l'eau déminéralisée. Dans chaque bécier sont introduits 100 g de sédiment artificiel et 2 l d'eau.

3.1.3.1 Contaminant : cadmium

Nous avons choisi le cadmium comme polluant modèle pour comparer les essais sans et avec renouvellement d'eau.

Définitions des différentes concentrations

Afin de faciliter la discussion sur les concentrations en cadmium, nous allons préciser les appellations et sigles retenus. Nous appellerons C , la concentration nominale en cadmium, c'est à dire la concentration théorique initiale dans l'eau apportée. C_w et C_s représentent respectivement les concentrations dans l'eau et dans le sédiment mesurées à un instant t . Les indices i , 0 , f et m , représentent respectivement les concentrations en cadmium mesurées dans un compartiment initialement (au moment de l'introduction de l'eau sur le sédiment), à J0 (lors de l'introduction des organismes), finale (lors de l'arrêt de l'essai à Jf) et moyenne durant la période d'exposition. Par exemple, C_{w_0} est la concentration mesurée dans l'eau à J0 et C_{s_f} est la concentration mesurée finale dans le sédiment.

Contamination via la colonne d'eau

Le cadmium a été apporté via la colonne d'eau. L'eau reconstituée a été contaminée avec des solutions mères de chlorure de cadmium préalablement préparées avec de l'eau ultra pure et conservées dans des bouteilles en plastique. Pour chaque essai en microcosme, de nouvelles solutions mères ont été préparées.

Les scénarios de contamination étaient différents dans les deux expériences. Dans l'essai S nous avons réalisé un apport ponctuel de cadmium en début d'expérience (J-7) alors que dans l'essai D, le cadmium était apporté en continu aux systèmes à partir de J-6.

Lors de l'essai statique S, l'eau a été contaminée avant d'être introduite dans le récipient d'essai. Lors de l'essai en microcosme avec un flux d'eau D, l'eau initialement introduite était exempte de cadmium. Par contre, l'eau servant au renouvellement mis en place à J-6 était contaminée.

Choix des concentrations

Cinq traitements ont été étudiés simultanément dans chaque expérience : 4 concentrations en cadmium et des témoins, avec 4 réplicats par traitement. Les concentrations dans les essais en microcosme ont été choisies en fonction de la littérature, des résultats des essais préliminaires de répartition du cadmium entre les milieux abiotiques et des essais mono-spécifiques préalables. Les concentrations nominales en cadmium dans l'eau étaient de 10, 20, 40 et 80 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pour l'essai S et de 1.25, 2.5, 5 et 10 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pour l'essai D. Notons que dans l'expérience S, le cadmium n'a pas été introduit dans l'un des microcosmes du traitement correspondant à la concentration nominale en cadmium de 20 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Nous n'avons donc que 3 réplicats dans ce traitement et 5 microcosmes témoins.

D'après une synthèse de l'USEPA [170], les concentrations en cadmium peuvent être de quelques microgrammes par litre, dans les environnements naturels impactés par l'homme. Les intervalles de concentrations testées comprennent donc des concentrations réalistes, c'est à dire qu'on pourrait les retrouver dans l'environnement.

Durée de l'exposition

La durée d'exposition des organismes au cadmium était de 21 jours pour l'ensemble des systèmes. Dans les travaux préalables à cette thèse, la phase d'exposition était de 28 jours (section 2.2). Néanmoins, comme le souligne Clément [53], bien que la survie des daphnies soit bonne jusqu'à 21 jours (71% en moyenne en excluant les essais où la survie est très problématique dès le début de l'essai (< 40%)), elle devient moins satisfaisante en moyenne au delà de cette durée. Ceci a également été observé dans les premières expériences réalisées au cours de cette thèse. De plus, la période de 21 jours est suffisante pour observer des effets sur la reproduction des daphnies. Le choix a donc été fait de restreindre la durée d'exposition à 21 jours pour nos essais.

3.1.3.2 Eau

Choix de l'eau

Le choix de l'eau pour les essais avec un flux continu dépend de (1) sa composition et notamment sa richesse en nutriments (favorisant plus ou moins le développement des organismes), (2) la stabilité de cette composition, (3) la facilité de mise en oeuvre logistique (4) la possibilité de comparer les différentes expériences et (5) la représentativité (tableau 3.3).

TABLE 3.3 – Tableau de synthèse des critères de choix de l'eau pour les essais avec flux continu, réalisé d'après les résultats des essais préliminaires (EN : eau de nappe ; ER : eau du réseau ; EM : eau reconstituée du microcosme ; + : le moins favorable et +++ : le plus favorable)

	EN	ER	EM
richesse en nutriments	+	++	+++
développement des producteurs I	+	++	+++
stabilité composition de l'eau	+	++	+++
comparaison avec essais statiques	+	+	+++
facilité de mise en oeuvre (logistique)	+++	++	+
représentativité	++	++	+

Trois eaux ont été envisagées pour réaliser les essais en microcosme avec renouvellement d'eau : (1) l'eau de nappe (EN), directement prélevée quelques mètres sous le parking du laboratoire, puis filtrée et oxygénée et (2) l'eau du réseau (ER) déchlorée et (3) l'eau reconstituée pour ces microcosmes, notée EM.

Notre choix a tout d'abord été guidé par l'aspect pratique. Les premiers essais ont donc été réalisés avec les eaux naturelles : l'eau de nappe (EN) et l'eau du réseau (ER). L'avantage est que ces eaux sont disponibles en grande quantité et ne nécessitent pas de préparation en dehors de la filtration et de l'aération pour l'eau de nappe et de la déchloration pour l'eau du réseau. Cependant, la composition de ces eaux naturelles est variable. La concentration des différents éléments présents dans l'eau de nappe (EN) varie au cours du temps (notamment en fonction des saisons) (Winiarski, com. pers.). De plus, dans les expériences avec renouvellement de l'eau réalisées avec l'eau du réseau

(ER), la conductivité de l'eau en entrée varie au cours du temps. Or la conductivité de l'eau dans les systèmes est liée à la conductivité de l'eau entrante et ceci, quel que soit le débit testé. Même si nous pouvions réaliser une réserve d'eau unique par expérience, il y aurait possiblement de fortes variations dans la composition de l'eau entrante d'une expérience à l'autre. Ceci pourrait entraîner une variation du développement des organismes ainsi que des différences d'exposition aux contaminants.

Notre but étant d'augmenter la réplicabilité et la répétabilité de l'essai, il nous a semblé plus approprié d'utiliser une eau de composition stable en entrée, donc de privilégier l'eau reconstituée EM. De plus, la composition de l'eau microcosme est ajustable et il est par exemple possible d'adapter la concentration en nutriments à la croissance algale désirée. Ensuite, l'emploi de la même eau facilite la comparaison avec les expériences en condition statique. La préparation de volumes importants de milieu reconstitué étant contraignante mais réalisable, nous avons donc choisi de travailler avec l'eau microcosme.

Les expériences S et D ont donc été réalisées avec de l'eau reconstituée EM.

Composition de l'eau reconstituée EM

La composition de l'eau reconstituée EM est présentée dans le tableau 3.4.

Quelques modifications supplémentaires ont été apportées par rapport au milieu optimisé par Triffault-Bouchet (section 2.2). Constatant un manque d'oligoéléments essentiels (notamment Se) dans l'eau reconstituée utilisée pour les essais en microcosme, nous avons décidé de remplacer la solution d'oligoéléments du milieu algues OCDE jusqu'ici utilisée par la solution d'oligoéléments du milieu M4. Les milieux utilisés lors d'expériences réalisées sur un métal unique, ou une solution contenant des métaux de composition connue, pourraient contenir de l'EDTA, puisque des logiciels de calcul de spéciation nous permettent aujourd'hui de prendre en compte la présence de cet agent chélatant. Cependant, dans un souci de standardisation du milieu, nous avons conservé le choix fait par le CEAEQ de retirer l'EDTA de la solution mère d'oligoéléments.

Préparation de l'eau reconstituée

L'eau reconstituée est préparée à partir d'eau déminéralisée. Cette dernière est plus rapide à produire que l'eau distillée et sa production nécessite un volume d'eau moins important. En outre, elle est estimée suffisamment purifiée pour fabriquer l'eau reconstituée. Lors d'un essai préliminaire (FFE2), nous n'avons pas mis en évidence de différence entre les essais réalisés avec l'eau distillée et l'eau déminéralisée.

Les solutions mères du milieu microcosme sont préparées dans des fioles jaugées avec de l'eau ultra-pure et les composés sont pesés grâce à une balance de précision (Mettler). Ces solutions sont conservées à 4°C, pendant 6 mois pour les solutions de macroéléments, 1 an pour la solution d'oligoéléments et 3 mois pour la solution de vitamines.

L'eau reconstituée est préparée dans des bidons de 20 à 30 l, décontaminés avec une solution diluée d'acide nitrique ou lavés à la javel si besoin, puis largement rincés avec l'eau servant à la préparation du milieu microcosme. Les volumes de solutions mères sont prélevés à la pipette, l'éprouvette graduée

TABLE 3.4 – Composition de l'eau reconstituée EM

	Solution	Composants	concentration (mg.l ⁻¹)	
Macroéléments	Solution 1 OCDE	NH ₄ NO ₃	3.74	
		KH ₂ PO ₄	0.424	
	Solution 2 OCDE	MgSO ₄ , 7 H ₂ O	15.0	
		MgCl ₂ , 6 H ₂ O	24.0	
		CaCl ₂ , 2 H ₂ O	63.0	
	Solution 3 OCDE	NaHCO ₃	125	
	Oligoéléments	Solution Oligoéléments milieu M4	FeSO ₄ , 7 H ₂ O	0.996
			H ₃ BO ₃	2.86
			MnCl ₂ , 4 H ₂ O	0.361
LiCl			0.306	
RbCl			0.071	
SrCl ₂ , 6 H ₂ O			0.152	
NaBr			0.016	
Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O			0.063	
CuCl ₂ , 2 H ₂ O			0.0165	
ZnCl ₂			0.013	
CoCl ₂ , 6 H ₂ O			0.01	
KI			0.00325	
Na ₂ SeO ₃			0.00219	
NH ₄ VO ₃			0.000575	
Solution Vitamines milieu M4			Thiamine (HCl)	0.00075
	B12	0.001		
	Biotine	0.00075		

ou la balance, suivant le volume. Le volume d'eau est complété à la balance, puisque la densité de l'eau reconstituée est proche de 1.

L'eau est ensuite aérée jusqu'à ce que le pH se stabilise et que l'eau soit saturée en oxygène.

Mise en place des microcosmes

2 l d'eau sont introduits dans les microcosmes sur le sédiment à l'aide d'un récipient sans fond que l'on ferme par une compresse. Ce système permet de limiter la perturbation engendrée par le flux d'eau arrivant sur le sédiment et de limiter la remise en suspension de ce dernier. Ce système s'est révélé plus efficace et précis que l'utilisation d'une bouteille percée (système préalablement utilisé au LEHNA).

Les microcosmes statiques sont recouverts d'un film alimentaire afin de limiter l'évaporation de l'eau. Ce film est néanmoins percé pour faciliter la circulation de l'air à la surface de l'eau.

En absence de renouvellement d'eau, la colonne d'eau des microcosmes est oxygénée en continu. Des robinets permettent de répartir l'air apporté par une pompe (Pierron, modèle Rena 100) et filtré (Whatmann 0.2 μm) vers différents microcosmes. L'objectif est de maintenir, dans la colonne d'eau, une concentration en oxygène dépassant les 80% de saturation afin que notamment, l'ammoniaque, nocif pour les organismes, soit converti en nitrates [53].

Apport et évacuation de l'eau dans les systèmes avec un flux continu

Les photographies de la figure 3.2 présentent le montage expérimental mis en place. Après avoir essayé de concevoir des récipients en verre, nous avons finalement opté pour des béciers en plastique (PMP) que nous pouvions percer nous-mêmes, grâce à des emporte-pièces métalliques chauffés à la flamme. Les béciers, modelés pour permettre le renouvellement d'eau, en plastique étaient alors moins fragiles que ceux en verre, qui se brisaient fréquemment. Leur utilisation était de plus appropriée pour tester la toxicité du cadmium, les métaux s'adsorbant plus sur le verre que le plastique.

Apport d'eau

L'eau était préparée et stockée dans des bouteilles de 20 à 30 l et apportée dans les systèmes grâce à une pompe péristaltique de grande précision IPC (ISMATEC®), afin de limiter la variabilité du débit de renouvellement. Ce renouvellement est d'ailleurs contrôlé par pesée des bouteilles d'eau d'entrée. Les arrêts intempestifs de la pompe générés par de micro-coupures de courant ont été prévenus en branchant la pompe à une batterie.

Dans tout le montage (excepté pour l'étanchéité des bacs de rétention), les joints ont été réalisés grâce à des bouts de tuyau de taille adaptée. Aucune fuite d'eau n'a été observée au niveau du montage.

Des couvercles en plastique transparent ont été découpés et placés sur les béciers. Ils étaient percés au centre afin d'introduire l'eau et d'une dizaine de petits trous (1 mm) afin de permettre à l'air de circuler. Des essais préliminaires ont été réalisés avec un colorant afin de choisir la méthode d'apport d'eau dans le bécier la plus adaptée (figure 3.3). L'apport de l'eau au dessus du bécier (1) n'a pas été retenu car l'eau d'entrée n'atteignait pas le fond du microcosme et la diffusion

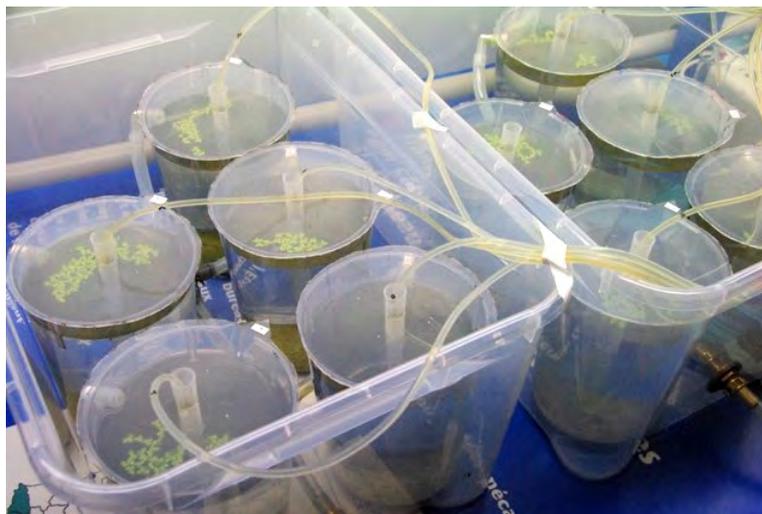
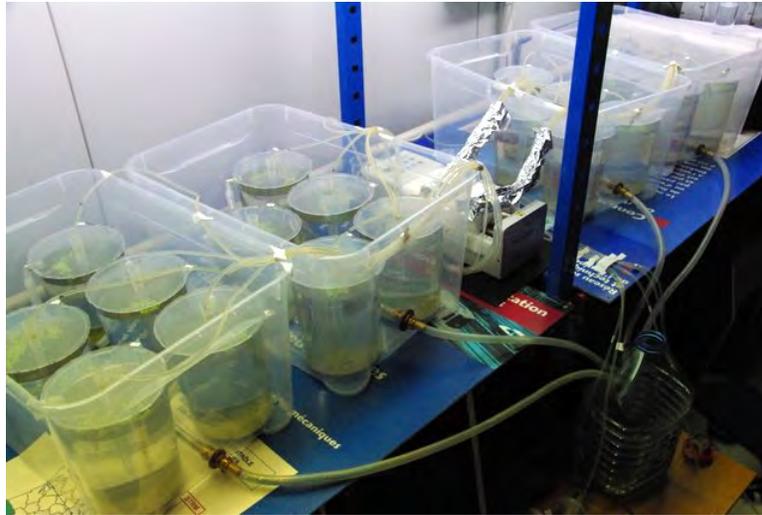


FIGURE 3.2 – Photographies de l'essai avec renouvellement d'eau D

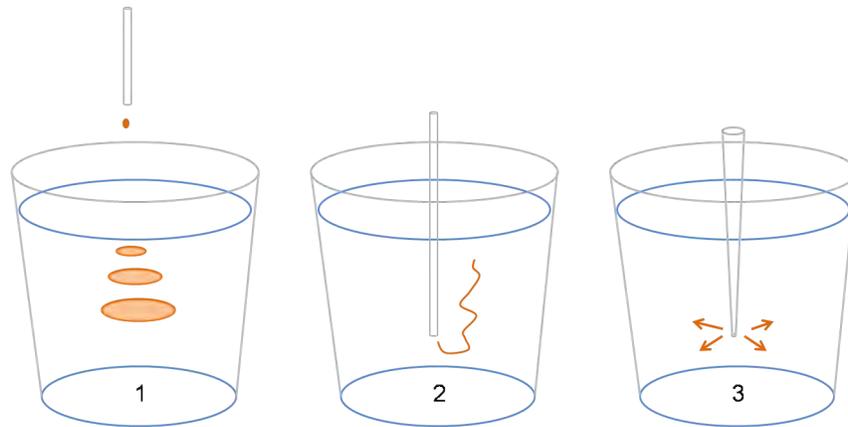


FIGURE 3.3 – Répartition schématique de l’eau apportée dans les béchers avec différentes méthodes

de l’eau aurait été perturbée en présence des lentilles d’eau. L’introduction par un tuyau dans la colonne d’eau des microcosmes (2) n’était pas satisfaisante car l’écoulement se faisait dans une direction préférentielle. La fixation d’un filtre (300 μm) à la sortie du tuyau entraîne une diffusion en “plaques” vers le bas. Nous avons donc pensé à percer latéralement le tuyau d’entrée, mais l’eau sortait principalement par l’extrémité, ce qui revenait au cas (2). Il a donc été décidé d’utiliser un cône de pipette de 10 ml bouché à la sortie et percé de 4 trous latéraux, permettant de répartir uniformément l’eau d’entrée au 3/4 de la colonne d’eau en profondeur (3). Cette solution était la plus satisfaisante. Percer 4 trous supplémentaires 5 cm plus haut n’apportait rien de plus.

Evacuation de l’eau

Un coude de 1 cm de diamètre, auquel un filtre de 300 μm était fixé afin d’empêcher l’entraînement des organismes autres que les algues, permettait d’évacuer continuellement et sans perturbation l’eau, les colloïdes et particules en suspension au fur et à mesure. Les filtres étaient parfois légèrement frottés en cas de mauvais écoulement de l’eau (surtout en présence d’eau naturelle). Cependant, les algues ne colmataient pas l’évacuation comme nous l’avions craint. Les béchers étaient placés dans des bacs de rétention qui pourraient également servir de bain thermostaté. Les sorties des béchers étaient reliées à un tuyau central qui permettait d’évacuer l’eau du bac de rétention par un perçage étanche (figure 3.2).

Débit de renouvellement

Ce choix dépend principalement de (1) la stabilisation des paramètres physicochimiques désirée, (2) la dynamique algale, (3) les contraintes logistiques (approvisionnement en eau).

Kottelat conseille de renouveler entièrement la colonne d’eau chaque jour afin de stabiliser les conditions physico-chimiques [101]. Pour des raisons de faisabilité technique (fabrication des stocks d’eau d’entrée), nous nous sommes limités à 1 l.j^{-1} . Ce débit permet de maintenir la concentration algale environ constante. Un essai préalable de comparaison de débits avait été réalisé avec de l’eau du réseau. Des simulations et une expérience de validation permettraient de trouver le débit optimal avec l’eau reconstituée EM.

TABLE 3.6 – Paramètres physico-chimiques mesurés dans la colonne d'eau des microcosmes (f.sem⁻¹ : nombre de fois par semaine)

Paramètre	Unité	Appareil	Fréquence
Température	°C	électrochimie numérique	2 f.sem ⁻¹
pH	-	électrochimie numérique	2 f.sem ⁻¹
Oxygène dissous	%	électrochimie numérique	2 f.sem ⁻¹
Conductivité	µS.cm ⁻¹	électrochimie numérique	2 f.sem ⁻¹
Carbone organique dissous	mg.l ⁻¹ C	COT-mètre	1 f.sem ⁻¹
[NH ₃], [NO ₂ ⁻] et [PO ₄ ³⁻]	mg.l ⁻¹	spectrophotomètre	1 à 3 f.sem ⁻¹
[Cl ⁻], [NO ₃ ⁻], [SO ₄ ²⁻], [Na ⁺], [K ⁺], [Mg ²⁺], [Ca ²⁺]	mg.l ⁻¹	chromatographie ionique	1 f.sem ⁻¹
[Cd ²⁺]	µg.l ⁻¹	spectromètre d'absorption atomique	1 à 2 f.sem ⁻¹

Suivi physico-chimique de la colonne d'eau

Nous avons suivi 16 paramètres physico-chimiques dans la colonne d'eau des microcosmes (tableau 3.6). Les paramètres ont été mesurés dans chaque système individuellement afin de pouvoir estimer la variabilité de tous les paramètres. Ceci constitue une originalité de ce travail par rapport aux autres essais LAMs réalisés. Seuls les ions mesurés par des techniciens par chromatographie ionique ou spectrométrie d'absorption atomique, n'ont pu toujours être mesurés à la fréquence souhaitée. Les mesures et prélèvements finaux ont été réalisés à J20.

Suivi de la température, du pH, de l'oxygène dissous et de la conductivité

La température, le pH, l'oxygène dissous et la conductivité ont été mesurés grâce à un appareil portable d'électrochimie numérique (Hach, modèle HQ 30D Flexi) et des électrodes numériques (Hach, INTELLICAL). L'oxygène dissous a été mesuré grâce à un capteur LDO (Luminescent Dissolved Oxygen) qui facilite la mesure et donne des résultats précis quelle que soit la concentration en oxygène (pas d'étalonnage, pas de remplacement d'électrolyte, pas d'interférence par dépôt ou d'attaque par H₂S,...). Cette méthode est recommandée par l'USEPA. Les quatre paramètres étaient mesurés directement dans les microcosmes lors de l'essai statique, afin de limiter les prélèvements. Dans l'essai avec un flux continu d'eau, des prélèvements d'eau (30 ml) ont pu être réalisés à mi-hauteur afin de limiter la perturbation des systèmes.

Dosage d'ions (hors cadmium)

Pour le dosage des ions (hors cadmium), des échantillons d'eau ont été prélevés au centre de la colonne d'eau de chaque microcosme, filtrés et conservés à 4°C.

L'ammoniaque (NH_3), et dans une moindre mesure les nitrites (NO_2^-), peuvent s'avérer toxiques pour les invertébrés. Il est donc important de suivre l'évolution de ces ions en solution, particulièrement celle de NH_3 . Les ions nitrates NO_3^- et orthophosphates PO_4^{3-} sont nécessaires à la photosynthèse des producteurs primaires. L'orthophosphate PO_4^{3-} est souvent l'élément limitant la croissance algale, il est donc intéressant de connaître sa dynamique. L'ammoniaque (NH_3), les nitrates (NO_3^-), les nitrites (NO_2^-) et l'orthophosphate (PO_4^{3-}) ont donc été dosés par la méthode Hach (spectrophotomètre Hach, modèle DR2000) dans un délai maximal de 3 jours après prélèvement.

Les teneurs en ions chlorure (Cl^-), sulfate (SO_4^{2-}), sodium (Na^+), potassium (K^+), magnésium (Mg^{2+}), calcium (Ca^{2+}) ont également été analysées par chromatographie ionique (Dionex, modèle DX-100), d'après un protocole d'analyse basé sur la norme NF T 90-042 [2] pour les anions et la norme NF T 90-048 [3] pour les cations (voir la thèse de Triffault-Bouchet [160] pour plus de détails).

La dureté d'une eau est une grandeur liée à la somme des concentrations en cations métalliques, à l'exception de ceux des métaux alcalins (Na^+ , K^+). En première approximation, elle correspond à la concentration en ions calcium et magnésium. Elle peut être exprimée, par exemple, en degré hydrotimétrique français ($^{\circ}\text{TH}$) ou en équivalent de concentration de CaCO_3 . Nous avons retenu cette dernière solution et calculé la dureté D à partir des concentrations en ions Ca^{2+} et Mg^{2+} issues des dosages au Dionex selon l'équation 3.1 :

$$D = M_{\text{CaCO}_3} \left(\frac{[\text{Mg}^{2+}]}{M_{\text{Mg}}} + \frac{[\text{Ca}^{2+}]}{M_{\text{Ca}}} \right) = 100.086 \left(\frac{[\text{Mg}^{2+}]}{24.305} + \frac{[\text{Ca}^{2+}]}{40.078} \right) \quad (3.1)$$

avec M_X , la masse molaire de X . D est exprimé en $\text{mg}_{\text{CaCO}_3} \cdot \text{l}^{-1}$.

Dosage du cadmium

Des échantillons d'eau ont été prélevés une à deux fois par semaine pour suivre l'évolution de la répartition du cadmium entre les compartiments. Cependant, tous les échantillons n'ont pu être analysés.

A cause de la variété des formes de cadmium et du manque d'information concernant leur toxicité relative, il n'existe pas de mesure analytique idéale pour exprimer les seuils de toxicité du cadmium pour la vie aquatique [170]. L'USEPA a exprimé ses critères en fonction du cadmium soluble dans l'acide en 1985, mais recommande en 2001 d'utiliser de la concentration en cadmium dissous (métal en solution après filtration à $0.45 \mu\text{m}$) [170]. Nous avons réalisé des mesures sur des échantillons filtrés, mais nous avons généralement choisi de mesurer la concentration en cadmium total dans l'eau afin d'inclure notamment les fractions adsorbées sur les algues et bactéries, assimilables par les invertébrés.

Afin de doser la concentration en cadmium dans l'eau, des échantillons (10 ml) étaient prélevés à l'aide d'une micropipette et de cônes de 5 ou 10 ml à mi-hauteur de la colonne d'eau. Certains échantillons ont été filtrés à $0.45 \mu\text{m}$. L'eau prélevée était conservée dans des récipients en plastique, acidifiée (acide nitrique, 0.2%) et conservée à 4°C , à l'obscurité, avant d'être analysée.

La teneur en cadmium a été déterminée par spectrométrie d'absorption atomique (HITACHI, modèle Z - 8200, four graphite, température d'atomisation 1500°C).

3.1.3.3 Sédiment

Choix du sédiment

Nous avons choisi de travailler avec un sédiment artificiel car sa composition est plus reproductible que pour les sédiments naturels. Cependant, il est moins représentatif que les sédiments naturels, issus de phénomènes biogéochimiques complexes. En effet, la composition physicochimique du sédiment artificiel est bien maîtrisée et ajustable. De plus ces sédiments sont dépourvus de contaminants et d'organismes endogènes. Seul le développement de microorganismes reste peu contrôlé.

Composition du sédiment

Le sédiment est composé de 88.35 g de sable de Fontainebleau, 10 g de sédiment naturel, prélevé dans le lac d'Aiguebelette, séché et tamisé, 1.5 g d' α -cellulose et de 0.15 g de Tétramin®.

Le kaolin et le CaCO_3 ont été remplacés par le sédiment naturel, prélevé dans le lac d'Aiguebelette, afin de palier aux problèmes de remise en suspension de l'argile au cours de l'expérience, et principalement lors de l'émergence des chironomes. En effet, des essais préliminaires ont montré qu'une réduction de la concentration en kaolin jusqu'à 3% de la masse sèche du sédiment ne diminue pas la bioturbation et qu'il est peu réaliste et préjudiciable pour le développement des chironomes de retirer le kaolin en totalité sans le remplacer.

Afin d'augmenter la quantité de nourriture disponible pour les consommateurs primaires, nous avons essayé de tripler la concentration initiale en Tétramin® dans le sédiment, lors d'expériences préliminaires (FFS1 et FFE1). Néanmoins, dans les systèmes contenant 0.45 g de Tétramin® dans le sédiment, les concentrations en NH_3 dans la colonne d'eau au moment de l'introduction des organismes (J0) étaient en moyenne de 6.1 mg.l^{-1} ($\text{CV} = 3.2\%$) dans l'expérience FFS1 et 6.6 mg.l^{-1} ($\text{CV} = 6\%$) dans l'expérience FFE1, tous traitements confondus. En revanche, dans l'expérience FFS1, la teneur en NH_3 dans l'eau des systèmes ne contenant que 0.15 g de Tétramin® était en moyenne de 2.3 mg.l^{-1} ($\text{CV} = 8.5\%$). Or comme nous l'avons vu, l'ammoniaque est toxique pour les organismes du microcosme. Nous avons maintenu l'apport de 0.15 g de Tétramin® dans le sédiment artificiel.

Maturation du sédiment

Nous avons laissé le sédiment mûrir 7 jours dans l'obscurité, avant d'introduire les organismes, afin de permettre le développement de populations de micro-organismes et la stabilisation de plusieurs paramètres physico-chimiques et microbiologiques.

Dosage du cadmium

Afin de connaître la quantité de cadmium adsorbée sur les sédiments en fin d'expérience, des échantillons ont été prélevés à J22 et séchés à l'étuve (60°C). Dans l'expérience S, le sédiment a été prélevé sans distinction de profondeur. Dans l'expérience D, le sédiment a été collecté en surface (0 - 0.5 cm) et en profondeur (0.5 - 1 cm). Pour certains prélèvements, 100 mg de sédiments ont ensuite été minéralisés grâce à un four à micro onde CEM/Xpress (180°C, 30 min) avec 2 ml d'acide nitrique et 6 ml d'acide chlorhydrique ultra-purs. Les échantillons minéralisés sont filtrés et dilués dans 25 ml d'eau ultra pure. La teneur en cadmium a été déterminée par spectrométrie d'absorption atomique (HITACHI, modèle Z - 8200, four graphite, température d'atomisation 1500°C), comme pour les échantillons d'eau. La concentration en cadmium dans le sédiment est exprimée en $\mu\text{g.g}^{-1}$ de masse sèche de sédiment.

3.1.4 Organismes

3.1.4.1 Conditions de culture et d'élevage

Dans un souci de maîtrise et d'éventuelle standardisation, les organismes utilisés pour les essais sont issus d'élevages en laboratoire, où les conditions sont contrôlées. L'identification taxonomique de la souche de *P. subcapitata* est certifiée par l'UTCC (University of Toronto Culture Collection of algae and cyanobacteria).

Conditions environnementales

Les organismes sont cultivés ou élevés au LEHNA, dans une salle réservée à cet effet. La température de la salle est maintenue entre 20°C et 25°C. La photopériode est de 16 h de jour pour l'ensemble des organismes. Les algues et les lentilles d'eau sont cultivées sous un éclairage de 3000 à 4000 lux et les invertébrés sous un éclairage de 500 à 1000 lux.

Milieux abiotiques

Eau

Les algues et lentilles d'eau sont cultivées dans des milieux artificiels reconstitués à partir de solutions mères contenant les éléments nécessaires à leur développement. Ces solutions mères sont conservées 1 an à 4°C. Les milieux de cultures sont répartis dans des erlenmeyers en verre fermés par du coton cardé, stérilisés à l'autoclave (120°C, 20 min, 2 bars) et conservés à 4°C jusqu'à 3 mois.

Les invertébrés sont élevés dans de l'eau de nappe filtrée et aérée jusqu'à saturation en oxygène. L'eau est oxygénée en continu dans les élevages de hyalelles et de chironomes.

Sédiment

Seuls les chironomes sont élevés dans des aquariums contenant une phase sédimentaire. En effet, le sédiment gênerait la récupération des daphnies et hyalelles néonates. Le sédiment artificiel des élevages de chironomes est reconstitué à partir de sable fin (sable de fontainebleau) et de Tétramin®, puis recouvert d'eau. On laisse des microorganismes se développer dans l'aquarium durant une semaine avant d'introduire les premières larves qui vont coloniser le sédiment.

Entretien

Pseudokirchneriella subcapitata

Le repiquage des algues est réalisé une fois par semaine, en conditions stériles, sous hotte aspirante. 1 ml d'inoculum d'une culture précédente est introduit dans 100 ml de milieu stérile contenu dans un erlenmeyer de 250 ml. Les erlenmeyers sont placés sur une plaque agitatrice (100 rpm environ). Des cultures d'algues servant à nourrir les daphnies d'élevage sont préparées en parallèle en conditions non stériles.

Lemna minor

Les lentilles d'eau sont repiquées toutes les semaines dans 150 ml de milieu de culture stérile. Une dizaine de frondes sont introduites à l'aide d'une oese en conditions stériles (sous hotte aspirante) dans chaque erlenmeyer.

Daphnia magna

Les daphnies sont maintenues en permanence en élevage en laboratoire. L'eau est renouvelée 3 fois par semaine à 50% lors du retrait des jeunes néonates par tamisage. Les daphnies mères sont préalablement récupérées à la pipette afin de limiter le stress occasionné par l'intervention. Chaque semaine, 3 nouveaux récipients sont remplis de jeunes daphnies afin de constituer de nouveaux élevages. Les plus vieilles daphnies sont supprimées. Les daphnies sont nourries régulièrement grâce à la culture de *P. subcapitata* réalisée à cet effet, afin qu'il y ait toujours de la nourriture en quantité suffisante.

Hyalella azteca

Les hyalelles sont élevées dans des aquariums de 10 à 20 l. Des grilles servent de support aux organismes, privés de sédiment afin de pouvoir retirer les petits. Les hyalelles sont nourries avec du Tétramin® et la même solution de *P. subcapitata* que les daphnies. Chaque semaine, 75% de l'eau est renouvelée, les aquariums sont nettoyés et les petits sont retirés par tamisage (tamis de 1 mm pour retenir les adultes et 0.2 mm pour les néonates). Tous les trimestres, un nouvel élevage est initié avec 300 néonates.

Chironomus riparius

Les chironomes sont élevés dans des aquariums de 10 à 20 l contenant de l'eau et du sédiment. 75% de l'eau est renouvelée 2 fois par semaine et les déchets sont retirés. Par la même occasion, les insectes émergents et les masses qu'ils ont pondues sont retirés de l'aquarium. Seules une à deux masses sont laissées dans l'aquarium afin qu'il y ait toujours de jeunes larves de chironomes et que l'émergence des chironomes se fasse en continu. Les organismes sont nourris avec une quantité suffisante de Tétramin®. S'il n'y a plus d'émergences dans un aquarium, une partie des larves est retirée du sédiment, et si la situation se maintient, le sédiment et l'eau sont changés.

TABLE 3.7 – Conditions d'introduction des organismes dans les essais S et D à J0

	Ps	Lm	Dm	Ha	Cr
Nombre ou densité d'organismes introduits	2.10^4 cel.ml ⁻¹	2 colonies de 3 frondes	10	10	10
Age initial des organismes ou de la culture (j)	5	7	1	7 à 14	2
Durée d'acclimatation (j)	-	1	< 1	2	2

3.1.4.2 Densité et introduction des organismes dans les microcosmes

Au jour J0 de chaque expérience, les organismes sont introduits dans les microcosmes. Le tableau 3.7 présente les conditions générales d'introduction qui sont détaillées dans la suite de cette section.

Pseudokirchneriella subcapitata

Lors de la préparation d'un essai, 5 ml d'inoculum d'une culture algale en phase exponentielle de croissance sont introduits dans 300 ml de milieu, dans un erlenmeyer de 500 ml. Ce repiquage est réalisé 5 jours avant le début de l'essai afin que la culture soit en phase exponentielle de croissance au début de l'expérimentation. Les erlenmeyers sont placés sur la même plaque agitatrice que pour le repiquage des solutions mères. Avant l'introduction dans les essais, les algues sont centrifugées (2000 rpm, 10 min, 20°C). Le milieu de culture est retiré puis le culot est resuspendu dans le milieu d'essai. L'opération est répétée une deuxième fois afin de bien laver les algues, et notamment, d'ôter l'EDTA présent dans le milieu de culture. La densité algale dans la solution est ensuite évaluée grâce au compteur de particules Beckman Coulter®), et la quantité d'algues désirée est introduite dans les microcosmes à l'aide d'une micropipette. La concentration algale initiale dans les microcosmes était de 20 000 cel.ml⁻¹. Dans l'essai avec renouvellement d'eau D, un deuxième apport de 4.10^7 cellules algales a été nécessaire durant la phase de latence précédant la croissance algale à J2, afin que les algues ne soient pas toutes emportées avec l'eau sortante.

Lemna minor

La croissance des lentilles d'eau est limitée lorsque la densité devient trop importante [61]. Nous avons donc utilisé des cultures de lentilles d'eau en phase exponentielle de croissance (culture de 7 j). Deux colonies de trois frondes sont introduites par béccher, après 1 jour d'acclimatation dans l'eau d'essai.

Daphnia magna

Dix daphnies de moins de 24 heures sont introduites dans chaque microcosme. Elles sont prélevées dans les élevages dont les mères sont âgées d'au moins 2 semaines, afin de ne pas réaliser l'essai sur la

première génération de daphnies filles. Elles sont transférées dans du milieu microcosme contenant des algues pendant quelques heures avant leur introduction dans les microcosmes.

Hyaella azteca

Dix hyaelles, âgées de 7 à 9 jours sont introduites dans chaque système. Elles ont été préalablement acclimatées pendant 2 jours dans du milieu microcosme avec des algues et un peu de Tétramin®.

Chironomus riparius

Dix larves de chironomes, écloses depuis 48 h, et acclimatées depuis l'éclosion dans du milieu microcosme avec un peu de sable et de Tétramin®, sont introduites dans chaque microcosme.

3.1.4.3 Paramètres mesurés : suivis et analyses

Afin d'évaluer l'effet du traitement sur les systèmes, des paramètres biologiques ont été mesurés au cours du temps. Pour identifier les paramètres utiles, il est nécessaire de prendre en compte la variabilité, mais aussi la sensibilité des descripteurs [40]. Le tableau 3.8 rassemble les principaux paramètres biologiques mesurés durant les expériences (tous les paramètres n'ont pas été mesurés dans toutes les expériences) et précise les fréquences de mesure.

En fin d'expérience, les paramètres concernant les organismes ont été mesurés dans l'ordre suivant entre J20 et J22 : algues, daphnies, lentilles d'eau, hyaelles et chironomes. Les mesures sur les daphnies étaient plus longues dans l'expérience D du fait de la plus grande survie des cladocères. Pour rappel, les mesures physico-chimiques sur l'eau ont été effectuées à J20 et les prélèvements d'échantillons d'eau et de sédiment ont été effectués à J20 et J22 respectivement.

En fin d'expérience, les organismes sont conservés à -18°C et peuvent être analysés pour des investigations ultérieures (masse sèche, longueur, bioaccumulation du cadmium).

Pseudokirchneriella subcapitata

Une des difficultés rencontrées lors de l'essai en microcosme est le suivi des algues. En effet, la dynamique des algues dans les systèmes est complexe. Les algues se développent dans la colonne d'eau et à la surface du sédiment, sont ingérées par les consommateurs primaires et sédimentent. Contrairement aux autres organismes, les algues sont microscopiques, ce qui ne permet pas un dénombrement à l'oeil nu.

Afin de suivre l'effet d'un contaminant sur les algues, on peut par exemple envisager de les dénombrer directement avec un microscope ou avec des appareils automatisés comme un compteur de particules ou un cytomètre en flux, ou de suivre la densité algale en mesurant la teneur en chlorophylle, en dosant des protéines ou des activités enzymatiques, en réalisant un marquage au carbone 14 ou en mesurant la teneur en oxygène dissous dans le milieu.

TABLE 3.8 – Principaux paramètres biologiques pouvant être mesurés dans les essais en microcosme et fréquence de mesure (fin : mesure finale ; f.sem⁻¹ : nombre de fois par semaine)

Organisme		Paramètre	Unités	Fréquence		
Algues	croissance	Densité	part.ml ⁻¹	1 à 7 f.sem ⁻¹		
Lentilles d'eau	croissance	Nombre de frondes	-	2 f.sem ⁻¹		
		Nombre de frondes petites	-	2 f.sem ⁻¹		
		Nombre de frondes moyennes	-	2 f.sem ⁻¹		
		Longueur des 10 plus grandes racines	cm	fin		
		Longueur maximum racines	cm	1 f.sem ⁻¹		
		Masse fraîche totale	mg	fin		
		Masse sèche totale	mg	fin		
		Surface couverte par les frondes	cm ²	fin		
		Daphnies	santé	Nombre de frondes décolorées	-	2 f.sem ⁻¹
			survie	Nombre de mères	-	2 f.sem ⁻¹
croissance	Taille des mères		mm	1 f.sem ⁻¹		
	Masse fraîche des mères par réplicat		mg	fin		
reproduction	Jour premières filles		-			
Hyaelles	survie	Nombre de filles	-	2 f.sem ⁻¹		
		Nombre de hyaelles	-	fin		
		Masse fraîche des hyaelles regroupées	mg	fin		
Chironomes	survie et	Nombre d'émergents mâles	-	≥3 f.sem ⁻¹		
		émergence	Nombre d'émergents femelles	-	≥3 f.sem ⁻¹	
		Nombre de larves	-	fin		
		Nombre de nymphes	-	fin		

Dans nos systèmes, la teneur en oxygène dissous ne peut nous informer précisément sur la densité algale puisque nous aérons les systèmes statiques et que la respiration des autres organismes modifie également ce paramètre. La teneur en oxygène dans la colonne d'eau est néanmoins un indice, le pic d'O₂ coïncide généralement avec le pic de croissance algale. De plus, la densité algale dans l'eau est généralement trop faible pour permettre un dénombrement au microscope grâce à une cellule de Thoma. Il est possible de faire sédimer les algues d'un échantillon d'eau sur une lame avant d'effectuer un dénombrement au microscope. Cependant, cette méthode requiert des prélèvements d'eau trop importants en regard de la faible dimension de nos microcosmes (cette technique pourrait néanmoins être explorée dans des essais avec renouvellement). Nous n'avons pas de cytomètre en flux à notre disposition ou de possibilité de marquer nos algues.

Clément et ses collaborateurs mesuraient les teneurs en chlorophylle *a* après avoir filtré toute la colonne d'eau lors de sacrifices réalisés chaque semaine [53]. Mais la variabilité de cette mesure est très élevée : dans la synthèse réalisée par Triffault-Bouchet [160], les coefficients de variations pour les témoins sont compris entre 37% et 97%. De plus, nous avons fait le choix de ne plus réaliser de sacrifices. Nous avons donc dosé la chlorophylle *a* contenue dans des échantillons de 10 ml d'eau, lors d'essais préliminaires. Cependant l'extraction dans de si petits échantillons ne donne pas de résultats assez précis.

Dénombrement au compteur de particules

Principe

Nous avons donc décidé d'utiliser un compteur de particules pour suivre l'évolution de la densité algale dans nos systèmes (Beckman Coulter®), modèle Coulter Counter Z1). Le compteur de particules est un appareil constitué d'une électrode et d'un tube à orifice de petite taille. Nous avons travaillé avec un tube avec une ouverture de 70 µm qui permet d'avoir un seuil minimal (2% de la taille de l'orifice du tube) plus bas que le tube standard de 100 µm. La solution est aspirée par l'orifice, et le passage de particules entraîne une déformation du signal électrique. Cette déformation est proportionnelle à la taille de la particule. Le résultat est donné en volume ou diamètre de la sphère qui donnerait une déformation équivalente.

Les essais préliminaires montrent que la mesure du nombre de particules en suspension nous donne une bonne estimation de la dynamique de la population algale, même en présence de sédiment.

Manipulation

1 ml d'eau est prélevé dans les microcosmes à quelques centimètres de la surface auquel on ajoute 19 ml de solution isotonique. Les cuvettes servant à la mesure sont rincées 3 fois avec de l'eau déminéralisée et réutilisées (il a été vérifié que ce lavage n'avait pas de conséquences sur la mesure).

Détermination du seuil de mesure

Avec le modèle Coulter Counter Z1, nous pouvons seulement connaître le nombre total de particules au dessus d'un seuil donné et nous n'avons pas d'éléments sur la répartition en taille des particules. Nous avons donc réalisé des dénombrements préliminaires en faisant varier le seuil, afin de déterminer le seuil à utiliser pour nos dénombrements d'algues. Si le seuil est trop bas, alors, il

Il y a un bruit de fond important, s'il est trop haut, alors, on mesure une faible partie des algues. Il s'agissait donc de trouver le meilleur compromis possible. Ce calage a été réalisé avec des suspensions algales pures et avec des prélèvements réalisés dans les microcosmes. Nous avons retenu le seuil de 3.2 μm pour les expériences réalisées avec sédiment, donc pour les essais S et D. Dans l'expérience D, les mesures ont également été réalisées au seuil de 2.6 μm , retenu pour les expériences statiques réalisées sans sédiment.

Lemna minor

Depuis la publication des premiers essais de phytotoxicité réalisés sur les *Lemna minor* en 1933, de nombreuses méthodes d'essai ont été développées. Les principaux paramètres mesurés pour évaluer la croissance des lentilles d'eau sont : le dénombrement des frondes, le poids sec, la surface des frondes, la longueur des racines et le contenu en chlorophylle [22]. Dans les essais S et D, nous avons mesuré tous ces paramètres, excepté la teneur en chlorophylle a.

Dénombrement des frondes

Les frondes des lentilles d'eau sont dénombrées 2 fois par semaine, sans manipulation, à la surface de l'eau. Nous avons distingué 3 tailles de frondes dans le dénombrement : les frondes émergentes (petites), les frondes moyennes, et les frondes ayant pratiquement atteint leur taille maximale. Les frondes décolorées ont également été dénombrées (figure 3.4).

Longueur des racines des lentilles d'eau

Plusieurs méthodes existent dans la littérature pour mesurer la croissance des racines. Larson *et al.* [108] estiment la longueur moyenne des racines par fronde alors que Bishop et Perry [22] mesurent les 10 plus longues racines de lentilles d'eau à 0.5 cm près. Nous avons adopté cette dernière technique.

Surface couverte par les lentilles d'eau

Pour estimer la surface des frondes, les lentilles d'eau sont récupérées en fin d'expérience à l'aide d'une oese et placées dans des petits pots remplis de 100 ml d'eau. Elles sont ensuite photographiées en plaçant l'objectif bien au dessus du pot. Les images sont traitées sous Gimp (colors - components - decompose - RGB - dans la fenêtre des filtres, sélectionner le bleu et sauver avec la qualité maximale). Le rapport entre la surface couverte par les lentilles d'eau sur la surface de l'eau est alors calculé grâce à l'outil creaContours de CreaTools (CREATIS). La surface réelle couverte par les lentilles peut alors être déduite de la surface réelle de l'eau.

Masse sèche des lentilles

A la fin de l'essai, les lentilles sont rincées plusieurs fois afin de retirer le biofilm éventuellement développé à la surface des racines. Elles sont ensuite égouttées sur du papier absorbant et pesées avec une balance de précision (Mettler, modèle AE 240) pour déterminer la masse fraîche.

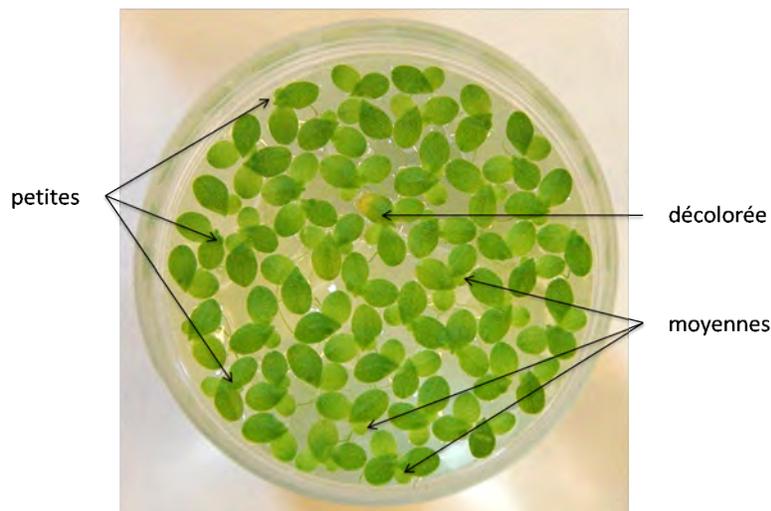


FIGURE 3.4 – *Lemna minor*. Observation et dénombrement des frondes de lentilles d'eau

Daphnia magna

La survie, la croissance et la reproduction des daphnies sont suivies au cours de l'essai.

Survie

Les daphnies mères (génération introduite à J0 : G0) sont dénombrées directement dans la colonne d'eau ou prélevées à l'aide d'une micro-pipette dont le bout du cône a été coupé à la taille appropriée afin de ne pas blesser la daphnie lors du prélèvement.

Croissance

Afin d'évaluer la biomasse finale de daphnies mère par microcosme, les daphnies ont été pesées sur une balance de précision (Mettler). La masse fraîche des daphnies provenant d'un réplicat était évaluée juste après récupération des organismes. Cependant, étant donné les balances dont nous disposons, la faible masse des organismes, et la présence d'eau résiduelle à la surface des organismes, la pesée n'est pas une mesure très précise. De plus, elle ne permet pas de mettre en évidence les écarts de croissance intra-microcosme. Les mesures de taille ont donc été privilégiées pour suivre la croissance des organismes.

Les daphnies ont été mesurées individuellement, avec une loupe binoculaire munie d'une échelle graduée dans l'oculaire selon la figure 3.5. Ces mesures ont été réalisées sur les daphnies vivantes car il était possible de les laisser dans une petite goutte d'eau. La longueur des daphnies a été suivie au cours de l'essai à J7, J14 et J20 dans l'essai S et J7, J16 et J21 dans l'essai D, ce qui permet de suivre la croissance des cladocères.

Reproduction

La reproduction des daphnies mères est mesurée en dénombrant l'ensemble des daphnies fille de génération G1. Les daphnies filles sont retirées du système régulièrement.

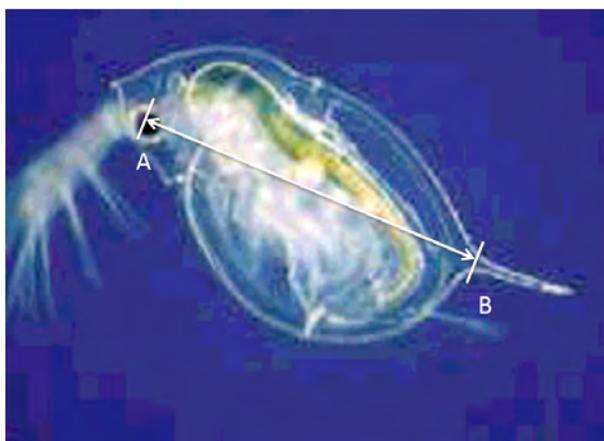


FIGURE 3.5 – *Daphnia magna*. La mesure de la longueur est effectuée entre les points A et B

La manière de récupérer les jeunes daphnies a été modifiée par rapport aux travaux précédents, dans lesquels 80 à 90% de la colonne d'eau du microcosme était siphonnée dans un récipient en verre, après le retrait des mères et des lentilles d'eau. Les daphnies néonates étaient alors dénombrées et retirées. L'eau était ensuite réintroduite dans le microcosme.

Ce procédé générait plusieurs problèmes. Les daphnies et les lentilles d'eau étaient fréquemment manipulées, mais surtout le milieu était fortement perturbé. Le retrait et la réintroduction de l'eau entraînaient des modifications dans la colonne d'eau et suite à la remise en suspension variable d'une partie du sédiment. Cela pouvait modifier de façon importante la répartition des polluants entre les compartiments abiotiques au cours de l'expérience. L'utilisation d'un tuyau et d'un récipient commun pour récupérer l'eau favorisait également la contamination (chimique, biologique) entre les systèmes, même à l'intérieur d'un traitement, dans le cas où un tuyau par traitement était utilisé et les récipients rincés entre deux traitements.

Il a donc été décidé de récupérer directement les daphnies filles dans les systèmes, au fur et à mesure, à l'aide d'une pipette. Une lampe, située derrière le microcosme, permet de mieux les distinguer. Une légère rotation est donnée au bécher afin de faire remonter les jeunes daphnies qui seraient encore dissimulées à proximité du sédiment. Elles sont dénombrées lors de leur aspiration avec la pipette. L'eau prélevée (200 ml au maximum) est versée sur un tamis retenant les jeunes daphnies (300 μm), puis réintroduite délicatement dans le microcosme.

Cette méthode a été testée lors d'expériences préliminaires réalisées au CEAEQ. Ce procédé semble nettement moins perturber les microcosmes. Cependant, aucune expérience spécifique n'a été réalisée pour comparer l'impact des deux modes de récupération des daphnies. En terme d'efficacité, cette manipulation s'avère beaucoup moins couteuse en temps que le siphonnage lorsque le nombre de néonates est faible. Le temps de récupération des daphnies est du même ordre de grandeur avec les deux méthodes pour les reproductions maximales observées. Cette technique peut donc être utilisée, sans augmenter la durée totale de l'essai, pour récupérer les daphnies quotidiennement, ce qui entraîne un suivi plus fin de la reproduction et une meilleure répartition du temps de travail. En effet, la récupération des jeunes daphnies est la manipulation la plus chronophage en cours d'essai.

Hyaella azteca

La survie ou la croissance des hyaelles ne peut être suivie au cours du temps sans sacrifier des microcosmes, étant donné que ces organismes sont souvent enfouis dans le sédiment. Nous n'avons donc réalisé que des dénombrements et mesures en fin d'essai.

Survie

Les amphipodes sont récupérés et dénombrés à la fin de l'expérience à l'aide d'une pipette après que presque toute l'eau du microcosme ait été retirée. Si on incline le bécher, les hyaelles se trouvant dans la partie du sédiment "à l'air" remontent à la surface et se dirigent vers l'eau restante. Il est alors possible de les récupérer facilement.

Croissance

Tout comme pour les daphnies, la biomasse totale fraîche de hyaelles par microcosme a été pesée en fin d'essai lors de certaines expériences.

Chironomus riparius

Survie et émergence

L'émergence des chironomes est suivie tout au long de l'expérience. La survie ne peut être évaluée qu'en fin d'expérience. Les chironomes sont dénombrés au fur et à mesure de leur émergence ou dans le sédiment lors du sacrifice final. Le sexe des émergents est déterminé (figure 2.5). Les émergents sont retirés par aspiration ou à l'aide d'une pince. Les larves et les nymphes restantes en fin d'essai sont récupérées et dénombrées en cherchant délicatement dans le sédiment à l'aide d'une spatule.

3.2 Traitement de données

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes associés à Elise Billoir, Carole Forfait, Sandrine Charles et Marie Laure Delignette-Muller du Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive (LBBE) de l'Université de Lyon pour analyser les données collectées au cours des expériences. Tous les graphiques et les analyses statistiques ont été réalisés grâce au logiciel R en dehors de la modélisation avec le cadre de modélisation dynamique et la dynamique des systèmes.

3.2.1 Logiciel R

3.2.1.1 Présentation

R est présenté comme un projet, un langage de programmation, un progiciel de fonctions statistiques, logiciel de traitement statistique et graphique de données et un environnement d'analyse de données. "En tant que projet, R fait partie du projet de développement de logiciels libres GNU¹, un projet international visant à partager des logiciels librement, sans restriction de licence" [142].

1. www.gnu.org

3.2.1.2 Avantages et limite de R

Le logiciel R a de nombreux avantages. C'est un logiciel libre, gratuit, disponible sur Windows, Mac et Linux, ce qui permet le partage, le développement et l'enrichissement par tous. Une vaste littérature est accessible. Ce logiciel est puissant car on peut charger des bibliothèques (package) lorsque cela est nécessaire et chacun peut développer ses propres calculs. Les packages sont des ensembles de programmes externes qui complètent R. Ils sont disponibles sur le réseau CRAN (<http://cran.r-project.org/>). R est dénué d'interface ce qui permet à l'utilisateur de se concentrer sur la programmation des calculs effectués. L'utilisateur a donc la pleine maîtrise de ses données et des procédures statistiques qu'il veut utiliser. La seule limite est qu'il nécessite un peu d'investissement initial pour l'utiliser. Mais une large littérature en libre accès facilite cet apprentissage.

3.2.2 Préparation des données

Une attention particulière a été portée à la manière d'organiser les données collectées lors des expériences afin d'en faciliter l'exploitation. Il est généralement recommandé de regrouper toutes les données dans un unique tableau [133]. Le format le plus pratique est de mettre le nom des variables en entête de chaque colonne et les données dans les lignes au dessous (figure 3.6).

Les données de chaque expérience ont été saisies dans un unique fichier excel. Chaque fichier comporte au moins 5 onglets : manipulation, données, mesure des organismes, tableaux et graphiques croisés dynamiques, commentaires. Le premier onglet contient les informations spécifiques à l'expérience nécessaires à l'exploitation des données (nom de l'expérience, objectifs, protocoles, conditions expérimentales, dates,...). Le second onglet comporte l'ensemble des données expérimentales mesurées et éventuellement des données calculées à partir des données mesurées. On pourrait envisager d'ajouter un onglet avec les données mesurées uniquement. La mesure de la taille des organismes est séparée du tableau général de données car c'est la seule mesure faite pour chaque organisme dans chaque microcosme. La valeur moyenne de la longueur des organismes par microcosme est reportée dans le tableau général de données. Le quatrième onglet comporte les résultats de tableaux croisés dynamiques et des observations, commentaires et analyses sont inscrites dans le cinquième onglet.

Le tableau de données peut être importé dans R après avoir été enregistré dans un fichier texte (fonction *read.table*).

3.2.3 Représentations graphiques

Etant donné le nombre de réplicats (3 à 5), nous avons choisi de représenter les points expérimentaux. Cette représentation donne plus d'information que les moyennes (\pm écart-type). Les données des différents traitements ont été légèrement décalées selon l'axe des abscisses (temps) afin d'améliorer la lisibilité des graphiques. Bien que la réalisation de chaque mesure ne s'étale pas sur plus de 12h, ce décalage graphique peut atteindre 1 jour pour des questions de clarté.

Les traitements sont exprimés en fonction de la concentration en cadmium moyenne mesurée dans l'eau durant la période d'exposition des organismes (C_{w_m}).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W
	Mat	Liel	Rel	Sec	Org	Mm	Cor	Exp	Dat	Heu	Tps	Tps	Tra	Nur	Ref	Lun	Lum	Lun	Tur	pH	O2	Cor	Cdv
1	ECd4	F	NR	ES	SO	S	Cd	976	3	10	-6	NA	80	804	4	0	0	0	NA	NA	NA	NA	NA
41	ECd4	F	NR	ES	O	M	T	976	9	14	0	NA	0	01	1	2100	0	0	18,5	8,01	95,1	368	0,09
42	ECd4	F	NR	ES	O	M	T	976	9	14	0	NA	0	02	2	2340	0	0	18,7	8,14	98,4	361	0,09
43	ECd4	F	NR	ES	O	M	T	976	9	14	0	NA	0	03	3	2060	0	0	18,5	8,17	99,7	360	0,05
44	ECd4	F	NR	ES	O	M	T	976	9	14	0	NA	0	04	4	2280	0	0	18,3	8,13	98,7	362	0,05
45	ECd4	F	NR	ES	O	M	Cd	976	9	14	0	NA	10	101	1	2130	0	0	18,4	8,23	101	356	3,5
46	ECd4	F	NR	ES	O	M	Cd	976	9	14	0	NA	10	102	2	2360	0	0	18,4	8,24	101	356	3
47	ECd4	F	NR	ES	O	M	Cd	976	9	14	0	NA	10	103	3	2050	0	0	18,6	8,19	101	355	2,9
48	ECd4	F	NR	ES	O	M	Cd	976	9	14	0	NA	10	104	4	2230	0	0	18,6	8,23	101	355	2,6
49	ECd4	F	NR	ES	O	M	Cd	976	9	14	0	NA	20	201	1	2350	0	0	18,6	8,21	101	354	5,9
50	ECd4	F	NR	ES	O	M	Cd	976	9	14	0	NA	20	202	2	2100	0	0	18,7	8,16	99,4	358	5,6
51	ECd4	F	NR	ES	O	M	Cd	976	9	14	0	NA	0	203	3	2290	0	0	18,7	8,19	100	355	0,2
52	ECd4	F	NR	ES	O	M	Cd	976	9	14	0	NA	20	204	4	2190	0	0	18,6	8,17	99,2	356	6
53	ECd4	F	NR	ES	O	M	Cd	976	9	14	0	NA	40	401	1	2320	0	0	18,6	8,18	99,9	357	9,5
54	ECd4	F	NR	ES	O	M	Cd	976	9	14	0	NA	40	402	2	2130	0	0	18,8	8,11	97,5	357	11,1
55	ECd4	F	NR	ES	O	M	Cd	976	9	14	0	NA	40	403	3	2420	0	0	18,6	8,24	101	355	8,3
56	ECd4	F	NR	ES	O	M	Cd	976	9	14	0	NA	40	404	4	2300	0	0	18,6	8,1	97,5	355	14,1
57	ECd4	F	NR	ES	O	M	Cd	976	9	14	0	NA	80	801	1	2290	0	0	18,8	8,15	99,2	357	19,5
58	ECd4	F	NR	ES	O	M	Cd	976	9	14	0	NA	80	802	2	2400	0	0	18,7	8,05	98,7	352	21,5
59	ECd4	F	NR	ES	O	M	Cd	976	9	14	0	NA	80	803	3	2170	0	0	18,7	7,98	95,2	352	22,8
60	ECd4	F	NR	ES	O	M	Cd	976	9	14	0	NA	80	804	4	2200	0	0	18,6	8,05	96,3	353	24,5
61	ECd4	F	NR	ES	O	M	T	976	10	14	1	NA	0	01	1	2100	2100	2100	NA	NA	NA	NA	NA
62	ECd4	F	NR	ES	O	M	T	976	10	14	1	NA	0	02	2	2340	2340	2340	NA	NA	NA	NA	NA
63	ECd4	F	NR	ES	O	M	T	976	10	14	1	NA	0	03	3	2280	2280	2280	NA	NA	NA	NA	NA
64	ECd4	F	NR	ES	O	M	T	976	10	14	1	NA	0	04	4	2200	2200	2200	NA	NA	NA	NA	NA

FIGURE 3.6 – Extrait du tableau de données de l'essai S

TABLE 3.9 – Distributions des différents types de données

Données	type	distribution généralement suivie
survie	binaire	binomiale
croissance	continue	normale ou log normale
reproduction	≈ continue	poisson ou binomiale négative

Nous utilisons les codes suivants pour noter la significativité des réponses sur les graphiques :
 0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1

3.2.4 Statistiques descriptives

Les principales statistiques descriptives utilisées sont la moyenne, l’écart-type et le coefficient de variation CV (%) calculé à partir de ces deux dernières valeurs, afin d’exprimer la variabilité :

$$CV = 100 \times \frac{\text{écart} - \text{type}}{\text{moyenne}}$$

3.2.5 Analyses en composante principale

Afin d’explorer les données, nous avons réalisé des analyses en composante principale. Nous avons utilisé la fonction *dudi.pca* du package *ade4*.

3.2.6 Comparaison de traitements

Nous avons utilisé les statistiques inférentielles pour comparer différents traitements. L’intérêt est d’effectuer des inférences pour des populations entières à partir des mesures effectuées à partir d’échantillons. Après avoir donné quelques définitions, nous expliquerons comment nous avons choisi les tests utilisés et comment nous les avons appliqués.

3.2.6.1 Définitions

Type de données

Lors des essais, plusieurs types de données sont collectés. Elles peuvent être binaires (la réponse peut prendre 2 états, par exemple : mort ou vivant), discontinues ou continues [128]. Les données de survie sont des données binaires, alors que celle de croissance sont continues. Les données de reproduction sont considérées comme continues, bien que ce soit une approximation (tableau 3.9).

Distributions des données

Afin de réaliser des tests statistiques, il faut connaître la distribution que suivent les données. Le tableau 3.9 présente les distributions que suivent généralement les différents types de données collectées dans nos essais.

Test d'hypothèse

C'est une règle de décision permettant de déterminer laquelle parmi deux hypothèses concernant la valeur d'un paramètre (p, μ, σ^2, \dots) est la plus plausible.

H_0 est l'hypothèse nulle testée en général. H_1 est la contre hypothèse. Ces deux hypothèses doivent impérativement être mutuellement exclusives.

p est la probabilité que l'hypothèse testée soit vraie.

α est le risque de première espèce. C'est la probabilité de rejeter H_0 sachant qu'elle est vraie : $P(\text{rejeter } H_0 \mid H_0 \text{ vraie})$. Dans ce travail, comme généralement en biologie, α est fixé à 0.05, c'est à dire que l'on rejette l'hypothèse testée si $p < 0.05$ avec 5% de chance de se tromper. On dira alors qu'il y a une différence statistiquement significative entre les traitements comparés.

β est le risque de deuxième espèce. C'est la probabilité d'accepter H_0 sachant qu'elle est fautive : $P(\text{rejeter } H_1 \mid H_1 \text{ vraie})$, soit, dans notre domaine, la probabilité de considérer qu'il n'y a pas d'effet alors qu'il y en a un. Ce risque, bien qu'ayant des conséquences graves, est rarement mentionné dans les études.

$1 - \beta$ est la puissance du test. C'est la probabilité qu'une hypothèse nulle fautive soit rejetée par le test en faveur d'une vraie alternative [128]. On peut se servir de la puissance dans le design expérimental (pour réduire au minimum le nombre d'animaux sur lesquels sont effectués les tests par exemple).

Avant de faire un test statistique, il faut bien poser la question à laquelle on veut répondre. Le but n'est pas de choisir la méthode la plus puissante, mais la méthode la mieux adaptée aux données [128]. Le choix du test d'hypothèse dépend du type et de la distribution des données.

Test paramétrique / non paramétrique

Un test paramétrique nécessite que la distribution des données soit normale et les variances homogènes. L'histogramme est une représentation graphique des données qui permet de visualiser la distribution. Différents tests ont été développés pour évaluer la normalité (test de Shapiro-Wilk) et l'homosédasticité (test de Bartlett ou Levene) des données ou des résidus d'un modèle, lorsque le nombre de données par groupe est trop faible pour faire des tests sur la distribution *a priori*. Les graphiques "Normal Q-Q Plot" permettent également d'évaluer la normalité (plus les points s'approchent d'une droite, plus la distribution s'approche d'une distribution normale). Il est également important de représenter la répartition des résidus en fonction du traitement afin de s'assurer qu'elle est bien homogène.

Un test non paramétrique ne fait aucune hypothèse sur la distribution des données. Il permet d'élargir le champ d'application des statistiques. Il est moins puissant qu'un test paramétrique, lorsque celui peut s'appliquer.

Test de tendance

Si l'effet du traitement sur un paramètre est monotone, on peut utiliser un test de tendance (Cochran-Armitage, Williams, Jonckheere-Terpstra). Dans le cas contraire, on utilise un test de comparaison deux à deux (Dunnnett's test, Fisher's exact test avec correction de Bonferroni-Holm). Lorsque les données le permettent, il est conseillé d'appliquer des tests de tendance car ils sont plus puissants [128]. Le guide de l'OECD propose un test formel de monotonie (Batholomew's test)[128].

Détermination de NOEC par des tests d'hypothèse

Les bioessais standards réalisés en écotoxicologie sur une espèce sont destinés à évaluer à partir de quelle concentration (ou dose) une substance est toxique pour l'espèce considérée. Les écotoxicologues essayent classiquement d'estimer pour un bioessai donné, à un temps donné, à partir de quelle concentration on observe une différence pour chaque paramètre suivi. Des tests statistiques permettent de prendre en compte la variabilité de la réponse au sein de chaque traitement et d'estimer une NOEC (No Observed Effect Concentration), concentration expérimentalement testée juste sous la LOEC (Lowest Observed Effect Concentration), plus faible concentration testée pour laquelle un effet significatif est observé. Ces valeurs dépendent du test d'hypothèse choisi. La détectabilité d'un effet dépend alors de la qualité et la taille de l'expérience ainsi que de la procédure statistique utilisée [128].

Concentration retenue pour l'évaluation des NOEC

Les valeurs standards comme les NOEC permettent de comparer nos données aux données de la littérature étant donné que ces paramètres sont largement estimés en écotoxicologie [99]. Parfois ces valeurs standards sont estimées en fonction de la concentration mesurée [137]. Cependant, dans notre cas, la concentration évolue au cours du temps dans au moins un compartiment abiotique, du fait de la présence de la phase sédimentaire. On peut donc exprimer ces valeurs en fonction de la concentration (théorique ou mesurée) initialement introduite, ou présente dans une phase donnée à un instant donné (par exemple à J_0), ou en fonction d'une concentration mesurée moyenne sur une plage de temps donnée. Nous distinguerons les NOEC, $NOEC_0$ et $NOEC_m$ respectivement calculées en fonction de la concentration nominale, la concentration mesurée à J_0 et la concentration moyenne durant la durée d'exposition.

3.2.6.2 Comparaison de 2 traitements à un temps donné

Pour comparer deux traitements, nous avons utilisé un test de Fisher si les données sont binaires et un test t de Student (paramétrique) ou un test U de Mann-Withney-Wilcoxon (non paramétrique) si les données sont continues. Ces tests ont par exemple été utilisés pour évaluer la différence entre les données témoins des essais S et D.

3.2.6.3 Comparaison de plus de 2 traitements à un temps donné

Le tableau 3.10 résume les tests utilisés pour comparer plus de 2 traitements, en fonction du type de données.

TABLE 3.10 – Synthèse des tests sélectionnés à partir du guide OECD pour déterminer comparer plus de 2 traitements en fonction du type de données (d’après [128])

paramètre biologique	type de données		classique (comparaison 2 à 2)	Test de tendance
survie	binaire		Fisher avec correction de Bonferroni-Holm	Jonkheere ou Cochran-Armitage
croissance reproduction	continu	normal and homogène	anova + Dunnett	anova + Williams
		non normal et homogène	Kruskal-Wallis + Mann-Withney avec correction de Bonferroni-Holm	Kruskal-Wallis + Jonckherre

Données binaires

Dans le cas de données binaires (survie), on utilise le test de Cochran-Armitage si l’effet du traitement sur le paramètre testé est monotone et le test de Fisher avec correction de Bonferroni-Holm dans le cas contraire. La correction de Bonferroni consiste à comparer chaque p-value à $\frac{\alpha}{n}$ s’il y a n traitements. Lorsque k comparaisons sont réalisées, la correction de Bonferroni-Holm consiste à ordonner les k p-value à comparer par ordre croissant : $p_1 \leq p_2 \leq \dots \leq p_k$. Puis, en commençant par p_1 , on compare chaque p_i à $\frac{\alpha}{k-i+1}$. Carole Forfait, du LBBE, a écrit les fonctions *stepdownCochran* et *FisherBH* pour réaliser ces tests afin d’évaluer l’impact du cadmium et de déterminer des NOEC.

Données continues

Dans le cas de données continues, on regarde tout d’abord si le traitement a une influence sur le paramètre à étudier, à un temps donné. Si on met en évidence une différence significative entre les traitements, alors on peut réaliser des tests pour déterminer quel(s) traitement(s) diffère(nt) des autres.

Tests paramétriques

Si les données suivent une distribution normale ou qu’on suppose que c’est le cas, on commence par réaliser une analyse de variance (*aov*). On effectue ensuite des tests *a posteriori* sur les résidus afin de vérifier leur normalité et leur homogénéité (*shapiro.test*, *qqnorm*, *levene*).

Afin de déterminer quels traitements diffèrent des témoins, on utilise le test de Dunnett ou, si les résultats sont monotones, le test de Williams (fonction *SimTestDiff* du package *SimComp*).

Tests non paramétriques

Si la distribution des résidus ou des données ne suit pas une loi normale, on réalise le test non paramétrique de Kruskal-Wallis (*kruskal.test*) au lieu de l'anova. Dans le cas où une différence significative globale est mise en évidence, nous réalisons un test de Jonckheere, si la réponse est monotone, ou un test de Dunn (Mann-Whitney-Wilcoxon avec correction de Bonferroni-Holm) dans le cas contraire. Carole Forfait a développé les fonctions *stepdownJonck* et *WILCOXBH* pour réaliser ces calculs.

3.2.6.4 Comparaison de courbes de survie

Lors des essais en microcosme, l'évolution au cours du temps de différents paramètres est suivie. Il est alors intéressant de comparer les courbes d'évolution de ces paramètres. Ceci a par exemple été réalisé avec des données de survie des daphnies.

Pour comparer ces courbes de survie, nous avons utilisé la librairie *survival*. Nous avons tracé les courbes de Kaplan-Meier (*survfit*) et utiliser le test du log-rank (*survdiff*) ou le test de Cox pour comparer ces courbes. Cette comparaison n'a pu être effectuée que pour les daphnies puisque nous ne connaissons la survie des autres invertébrés qu'au temps final.

3.2.7 Courbes dose-réponse

Une autre analyse classique des résultats de tests de toxicité consiste à estimer des concentrations entraînant x% d'effet (ECx) en modélisant des courbes dose-réponse. Généralement, une distinction est faite lorsqu'il s'agit de données de survie, on parle alors de concentration létale (LCx). Les ECx et LCx sont généralement estimées avec un intervalle de confiance à 95%.

Tout comme les NOEC, les ECx dépendent du temps auquel le paramètre biologique est mesuré. Par contre, elles ne dépendent pas directement de la gamme de concentration testée. Les ECx pourront également être calculées en fonction de la concentration nominale, la concentration initiale ou la concentration moyenne dans l'eau.

Parmi les nombreux modèles existant pour simuler des courbes doses-réponses sigmoïdales, les modèles logistiques et Weibull sont couramment utilisés [135].

Les modèles dose-réponse sont réalisés à partir du package *drc* [135]. La fonction *drm* permet d'ajuster différents types de modèles aux données. Le type de données (binaires ou continues) doit être spécifié. Nous avons généralement utilisé le modèle logistique à 3 paramètres (équation 3.2). Le paramètre *e* correspond à la EC50.

$$f(x, (b, d, e)) = \frac{d}{1 + \exp[b(\log(x) - \log(e))]} \quad (3.2)$$

Il est nécessaire de vérifier ensuite la normalité des résidus (fonction *shapiro.test*, `normal qqplot` des résidus) et l'homogénéité de leur distribution (test de Levene et représentation graphique). La fonction *plot* permet de représenter le modèle et éventuellement les données.

3.2.8 Ajustement d'un modèle à des données

La fonction *nls* du package *nlstools* a été utilisée afin d'ajuster un modèle à des données. Elle a par exemple permis de modéliser l'évolution de la concentration en cadmium dans l'eau par une fonction exponentielle (section 4.1.1).

3.2.9 Cadre de modélisation dynamique

Nous avons utilisé le cadre de modélisation développé par nos collègues du LBBE pour analyser les données collectées sur les daphnies dans les expériences S et D. Ce cadre de modélisation nous a principalement permis d'apporter des éléments de réponse aux questions suivantes :

- Le renouvellement d'eau contribue-t-il à améliorer le développement des daphnies ?
- Le renouvellement d'eau a-t-il une influence sur la sensibilité des daphnies au cadmium ?

Nous avons publié deux articles présentant le cadre de modélisation et son application aux données collectées lors des expériences S et D (notées respectivement TV et CST dans les publications) [20, 21]. Un schéma global du cadre de modélisation, ainsi que les différents paramètres, équations et hypothèse sont détaillés dans la publication de Billoir et al. [20].

Ce cadre comporte 5 modules connectés : exposition, bioaccumulation, survie, croissance et reproduction. La bioaccumulation dans les organismes est le seul paramètre qui n'a pas pu être mesuré, il est considéré comme une variable latente dans le modèle. L'exposition était définie comme la concentration totale en cadmium dans l'eau (dissoute et particulaire), ce qui permet de prendre en compte l'eau et la nourriture comme voies d'exposition des daphnies au cadmium comme conseillé par Barata *et al.* [13], Goulet *et al.* [80] et Geffard *et al.* [77].

Les mêmes modules ont été utilisés pour la bioaccumulation, la survie et la croissance pour l'essai S et l'essai D. Par contre, le module de reproduction a été adapté aux conditions expérimentales et les modèles d'exposition étaient différents pour les expériences S et D (section 4.1.1).

Pour les trois traits de vie étudiés (survie, croissance et reproduction), des fonctions seuils ont été introduites dans les modèles afin d'évaluer les effets toxiques, comme cela est proposé dans les modèles DEBtox [98]. Pour chaque paramètre biologique, nous avons fait l'hypothèse que les effets toxiques apparaissent lorsque la concentration dans l'organisme excède une concentration seuil appelée *NEC* (*No Effect Concentration*). Nous avons supposé que les effets étaient proportionnels à la différence entre la concentration interne et la NEC_* , avec un coefficient d'intensité noté k_* (* = S pour la survie, G pour la croissance et R pour la reproduction). Pour respecter le principe de parcimonie, nous avons fait l'hypothèse que les paramètres *NEC* et k étaient communs pour la croissance et la reproduction. Ils sont alors notés NEC_{GR} et k_{GR} .

Nous avons également supposé que la nourriture, principalement les algues *P. subcapitata*, était suffisante pour assurer le bon développement des daphnies.

3.2.10 Dynamique des systèmes

Afin d'améliorer notre compréhension du fonctionnement du système, nous avons construit une première ébauche de modèle de son fonctionnement écologique. Ce modèle était avant tout considéré comme un outil d'aide à la réflexion [129]. Avec Cécile Velluet [172], nous avons commencé

à développer un modèle afin de simuler la dynamique de la population algale dans la colonne d'eau des microcosmes. Nous avons travaillé avec le logiciel Vensim PLE (Personal Learning Edition). Etant donné la complexité du système et donc la multiplicité des interactions à étudier, il n'était pas possible, au cours de ce travail, de modéliser de manière précise l'ensemble des interactions ayant lieu au sein du système. De plus, les études mécanistiques très fines sont souvent réductrices car elles isolent des éléments du système. L'assemblage de telles études est donc délicat car le système n'est pas égal à la somme de ses parties. Nous avons donc adopté un point de vue plus global qu'analytique et étudié le microcosme, en tant que système complexe, avec l'approche systémique.

Selon l'AFSCET (Association Française des Sciences des Systèmes Cybernétiques, Cognitifs et Techniques) et la revue internationale de systémique (1994), la systémique est une "discipline qui regroupe les démarches théoriques, pratiques et méthodologiques, relatives à l'étude de ce qui est reconnu comme trop complexe pour pouvoir être abordé de façon réductionniste, et qui pose des problèmes de frontières, de relations internes et externes, de structure, de lois ou de propriétés émergentes caractérisant le système comme tel, ou des problèmes de mode d'observation, de représentation, de modélisation ou de simulation d'une totalité complexe" [59].

Pour mettre en oeuvre l'approche systémique, nous avons utilisé une méthodologie appelée dynamique des systèmes, issue des travaux réalisés par Forrester au Massachusetts Institute of Technology dans les années 1950. La dynamique des systèmes est une méthode de modélisation de l'évolution de systèmes complexes, basée sur les concepts fondamentaux de l'approche systémique [33]. Trois principaux types de variables sont considérées [75, 33] :

- les variables d'état ou de niveau, ensemble de variables dont l'évolution est importante pour l'étude du système, qui varient en fonction des flux et représentent l'état du système à chaque instant (rectangle),
- les variables de flux, fonctions du temps qui déterminent les variations des variables d'état mais ne sont pas mesurables en soi, si ce n'est par les effets qu'elles produisent dans les niveaux avec lesquelles elles sont en relation (flèche),
- et les variables auxiliaires, font partie du flux, mais se distinguent des variables précédentes dans la mesure où elles ont une interprétation réelle par elles-mêmes ou simplement parce qu'elles rendent plus facile la compréhension des équations de flux (cercle ou rien).

Chapitre 4

Résultats et discussions

4.1 Paramètres abiotiques de la colonne d'eau

4.1.1 Cadmium

4.1.1.1 Concentration en cadmium dans la colonne d'eau

Evolution

Essai statique

Dans l'expérience S, la concentration en cadmium dans l'eau diminue au cours de l'expérience (figure 4.1). La concentration moyenne en cadmium mesurée dans l'eau en fin d'expérience C_{w_f} (J20) correspond en moyenne à 16% de la concentration au moment de l'introduction des organismes C_{w_0} (J0) et à 5% de la concentration initiale C_{w_i} (J-7) (tableau 4.1). Les concentrations moyennes mesurées dans l'eau sur toute la période d'exposition C_{w_m} (J0 - J20) sont 1.5, 2.5, 5.0 et 11.3 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Nous nous référerons à ces concentrations moyennes dans la suite des résultats.

L'évolution de la concentration en cadmium dans l'eau peut être modélisée par une fonction exponentielle selon le modèle (4.1) :

$$C_n = e^{-bt} \quad (4.1)$$

avec C_n la concentration normalisée.

Le paramètre b est estimé à 0.167 dans l'expérience S.

Notons que dans les autres essais en microcosme aquatique de laboratoire statiques LAMs réalisées avec du cadmium au cours de la thèse, la concentration normalisée en cadmium dans l'eau décroît de la même manière (figure 4.2). Le paramètre b du modèle (4.1) a été estimé à 0.177 à partir de l'ensemble des données collectées dans les essais LAMs contaminés, réalisés avec et sans organismes au LEHNA et au CEAEQ (ERCd1, ERCd2, ECd1, ECd4 = S) (figure 4.3).

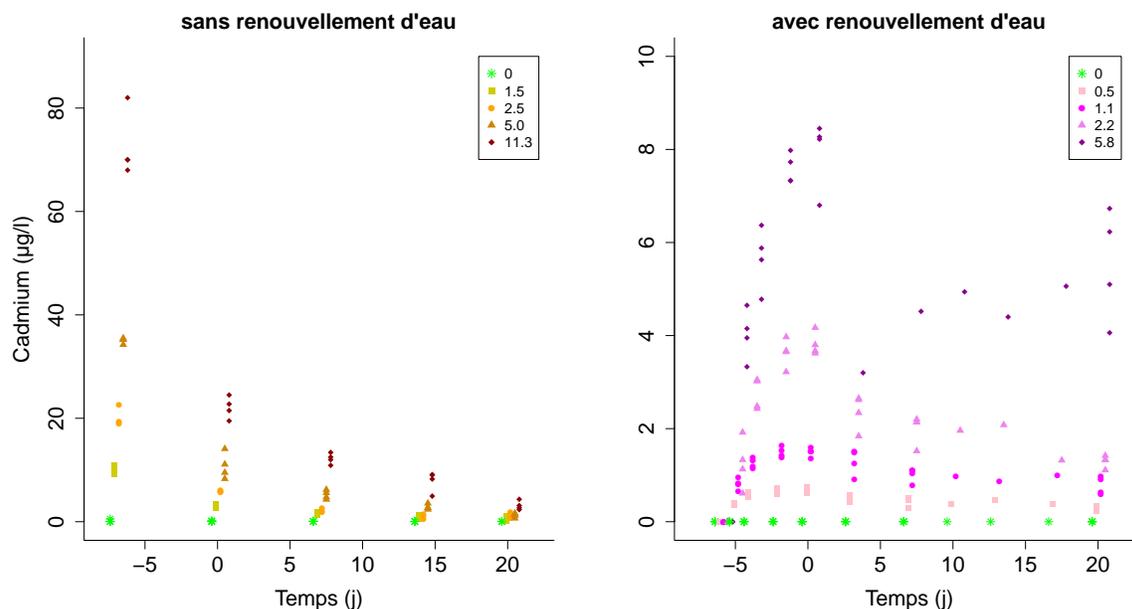


FIGURE 4.1 – Evolution de la concentration en cadmium mesurée dans la colonne d’eau des microcosmes au cours des essais sans (S) et avec (D) renouvellement d’eau en fonction du traitement : concentration moyenne en cadmium dans le microcosme durant la période d’exposition (points expérimentaux ; échelles différentes pour plus de lisibilité ; légende : concentration dans l’eau moyenne mesurée sur la période d’exposition (J0 - J20) en $\mu\text{g.l}^{-1}$; pour (D) : mesure dans un seul réplicat par traitement à J7, J10, J13 et J17)

TABLE 4.1 – Concentrations en cadmium dans l’eau ($\mu\text{g.l}^{-1}$) dans les essais en microcosme contaminés réalisés en condition statique (S) et dynamique (D) (C : concentration nominale, C_{w_i} : concentration dans l’eau initiale mesurée (J-7), C_{w_0} : concentration dans l’eau mesurée lors de l’introduction des organismes (J0), C_{w_f} : concentration dans l’eau finale mesurée (J20), C_{w_m} : concentration dans l’eau moyenne mesurée sur toute la période d’exposition (J0 - J20), m : moyenne ($\mu\text{g.l}^{-1}$), CV : coefficient de variation (%))

Exp.	C	C_{w_i}		C_{w_0}		C_{w_f}		C_{w_m}	
		m	CV	m	CV	m	CV	m	CV
S	10	10.2	8	3.0	12	0.6	68	1.5	68
	20	20.3	10	5.8	4	1.1	56	2.5	81
	40	35.1	12	10.8	23	1.2	34	5.0	78
	80	72.5	9	22.1	10	3.1	28	11.3	65
D	1.25	0	-	0.7	7	0.3	20	0.5	31
	2.5	0	-	1.5	7	0.8	24	1.1	28
	5	0	-	3.8	7	1.3	10	2.2	41
	10	0	-	7.9	10	5.5	22	5.8	30

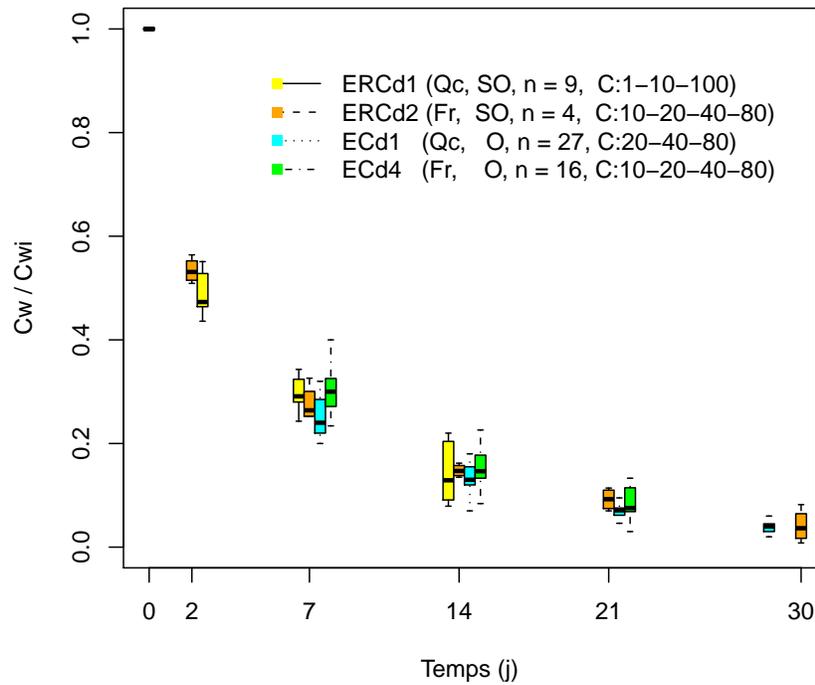


FIGURE 4.2 – Evolution de la concentration relative moyenne en cadmium dans l'eau normalisée (concentration C_w à l'instant t sur la concentration C_{w_i} initialement introduite) tous traitements confondus (sauf concentration nominale de $0.1 \mu\text{g.l}^{-1}$ de l'expérience ERCd1) pour 4 expériences (ERCd1, ERCd2, ECd1, ECd4 = S) réalisées au LEHNA en France (Fr) et au CEAEQ au Québec (Qc) avec et sans organismes (O et SO) (n : nombre de microcosmes ; C : concentrations nominales allant de 1 à $100 \mu\text{g.l}^{-1}$) (boxplot)

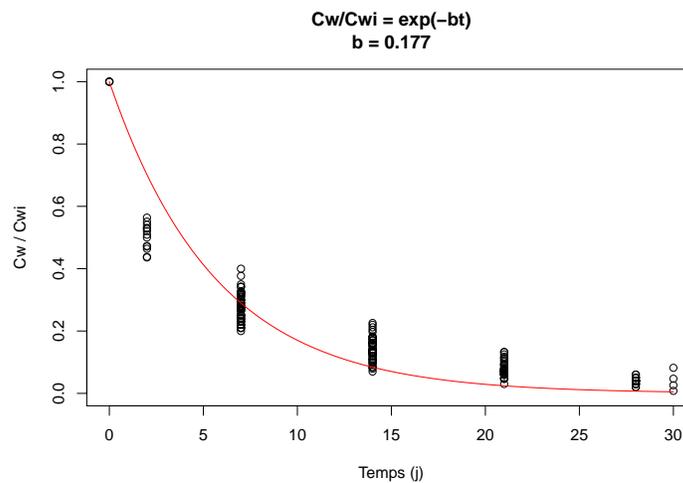


FIGURE 4.3 – Evolution de la concentration normalisée en cadmium dans l'eau (C_w/C_{w_i}) dans les essais en microcosme avec phase sédimentaire et sans renouvellement d'eau (ERCd1, ERCd2, ECd1 et ECd4). Points expérimentaux et modèle exponentiel à un paramètre ($b = 0.177$)

Essai dynamique

L'évolution de la concentration en cadmium dans l'eau dans l'expérience D est différente de celle présentée précédemment, sans renouvellement d'eau. De J-6 à J0, la concentration en cadmium augmente puis elle diminue environ de moitié jusqu'à la fin de l'expérience (figure 4.1). Ceci peut être expliqué par la dynamique du renouvellement de l'eau et le mode d'apport du cadmium. Nous rappelons que contrairement à l'expérience S, l'eau initialement introduite dans le microcosme n'était pas contaminée (chapitre 3). De J-6 à J21, l'eau du microcosme a été continuellement renouvelée avec de l'eau reconstituée contaminée à une concentration constante en cadmium.

Entre J-6 et J0, la concentration dans la colonne d'eau augmente jusqu'à une valeur légèrement inférieure à la concentration en cadmium dans les solutions d'eau en entrée. Ceci est dû au fait qu'une partie du cadmium est adsorbé sur le sédiment. Kottelat [101] a d'ailleurs utilisé cette différence de concentration en cadmium entre l'eau d'entrée et la colonne d'eau (supposée égale à l'eau de sortie) pour calculer le flux de déposition du cadmium sur le sédiment. Dans ses conditions expérimentales, le flux de déposition du cadmium sur le sédiment est estimé à $58 \pm 6 \mu\text{g.l}^{-1}.\text{j}^{-1}$.

Après J0, la concentration en cadmium dans l'eau diminue mais beaucoup moins rapidement que dans l'expérience statique avec apport initial unique de cadmium. La concentration moyenne en cadmium mesurée dans l'eau à la fin de l'expérience D, C_{w_f} (J20), correspond en moyenne à 52% de la concentration au moment de l'introduction des organismes C_{w_0} (J0) (tableau 4.1). Les concentrations moyennes mesurées dans l'eau sur toute la période d'exposition C_{w_m} (J0 - J20) sont 0.5, 1.1, 2.2 et $5.8 \mu\text{g.l}^{-1}$. Nous nous référerons à ces concentrations moyennes dans la suite des résultats.

Dans ses essais en microcosmes contaminés avec du cadmium, Kottelat [101] arrivait à maintenir une concentration constante dans la colonne d'eau, mais son taux de renouvellement était deux fois plus important que le notre. En effet, ce dernier était moins contraint par le volume d'eau utilisé puisqu'il réalisait ses expériences à partir d'eau naturelle. Le débit de renouvellement d'eau que nous avons choisi dans nos expériences, principalement pour des raisons logistiques, ne permet pas tout à fait de maintenir une concentration constante en cadmium dans le milieu. Nous avons pourtant fait cette approximation dans notre publication [21] car nous ne disposions pas à ce moment là de tous les résultats et les premiers résultats montraient une concentration presque constante du cadmium dans l'eau. La légère diminution de la concentration en cadmium dans l'eau après J0 pourrait être expliquée par le développement des micro-organismes, en partie apportés par les organismes d'élevages à J0. Ce développement est favorisé par l'éclairage (mis en place à J0) et l'augmentation de la température qu'il entraîne. Le cadmium peut en effet s'adsorber sur les différents organismes ce qui pourrait expliquer la diminution du cadmium dans l'eau à partir de J0.

Répliquabilité

La répliquabilité de la concentration en cadmium dans l'eau diminue au cours du temps (tableau 4.1). Cette concentration en cadmium est liée à l'évolution globale du système, qui est elle-même variable. En effet, à un instant t , la spéciation du cadmium ainsi que sa partition entre l'eau et

les solides dépend de l'état du système. Une fraction du cadmium est alors sorbée sur les solides. Cette sorption dépend d'un grand nombre de facteurs physico-chimiques. On peut supposer que l'accentuation de l'écart entre les répliqués au cours du temps est due à un effet cumulatif de la variabilité pour ce paramètre. Ceci pourrait être expliqué par le fait qu'une fraction de cadmium sorbé sur des solides à un instant t ne peut être entièrement remobilisée à l'instant $t + n$. Cette hypothèse est réaliste puisqu'il est souvent observé que le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre d'adsorption est plus court que celui de la désorption et que la réversibilité de l'adsorption est incomplète [16].

L'augmentation de la variabilité au cours de l'essai est moins marquée dans l'expérience D, étant donné que du cadmium est continuellement introduit lors du renouvellement d'eau, ce qui atténue en partie le phénomène précédemment décrit.

Dans l'essai S, la diminution de la répliquabilité en fin d'essai est d'autant plus marquée que la concentration en cadmium dans l'eau est faible. Ceci pourrait être expliqué par la plus forte variabilité de plusieurs paramètres pouvant influencer la sorption, dans les traitements contenant de faibles concentrations en cadmium.

4.1.1.2 Concentration en cadmium dans le sédiment

La partition du cadmium dans les microcosmes n'étant pas le principal objet de notre étude, nous n'avons pas concentré nos efforts sur le dosage du cadmium dans le sédiment, étant donné que la concentration du métal dans le sédiment peut être estimée à partir de celle dans l'eau. Néanmoins, quelques échantillons de sédiment ont pu être dosés, dans les expériences S et D, ce qui nous permet de comparer nos estimations aux concentrations réellement mesurées et donc d'effectuer des bilans de masse.

Pour l'estimation de concentrations en cadmium dans le sédiment entre 0.1 et 4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, la moyenne des coefficients de variation sur 3 minéralisations pour un même sédiment est de 27% (CV = 89%, $n = 8$).

Essai statique

En l'absence de renouvellement d'eau, la concentration en cadmium dans la phase sédimentaire peut être estimée par bilan de masse.

Théorie

Si l'on pose $m_s(t)$, $m_w(t)$, $m_p(t)$ et $m_b(t)$ les masses de cadmium dans le sédiment, l'eau, prélevées (cumulées) et bioaccumulées à l'instant t , l'équation de conservation de la matière est la suivante :

$$\forall t \quad m_s(t) + m_w(t) + m_p(t) + m_b(t) = m_{Cd} = cte \quad (4.2)$$

On suppose que la masse de cadmium accumulée dans les organismes est négligeable.

On appelle t_i et t_f les temps initial et final.

On pose :

$$x(t_k) = x_k \quad (4.3)$$

Soit $C_s(t)$ et $C_w(t)$, les concentrations en cadmium dans le sédiment ($\mu\text{g.g}^{-1}$) et dans l'eau du microcosme ($\mu\text{g.l}^{-1}$) à l'instant t . La concentration dans la colonne d'eau est supposée homogène. $M(t)$ et $V(t)$ sont la masse de sédiment (g) et le volume d'eau (l) à l'instant t . $v_p(t)$ est le volume (l) prélevé à l'instant t . On suppose que la concentration en cadmium dans le sédiment est initialement nulle, la concentration en cadmium totale initiale est donc égale à la concentration en cadmium dans l'eau. On a alors :

$$C_{w_i} V_i = C_{s_f} M_f + C_{w_f} V_f + \sum_{k=1}^n v_{p_k} C_{w_k} \quad (4.4)$$

On suppose la masse de sédiment constante :

$$M_s(t) = M_s = cte \quad (4.5)$$

On pose également :

$$C_{w_k} = \alpha_k C_{w_i} \quad (4.6)$$

On a alors :

$$C_{s_f} = \frac{C_{w_i}}{M} \left[V_i - \alpha_f V_f - \sum_{k=1}^n v_{p_k} \alpha_k \right] \quad (4.7)$$

$$C_{s_f} = \frac{C_{w_i}}{M} \left[V_i (1 - \alpha_f) - \sum_{k=1}^n v_{p_k} (\alpha_k - \alpha_f) \right] \quad (4.8)$$

En première approximation, on peut faire l'hypothèse que la fraction de cadmium restant dans l'eau à la fin de l'expérience α_f et les volumes d'eau prélevés v_{p_k} sont négligeables, alors l'équation devient :

$$C_{s_f \text{ approx}} = \frac{C_{w_i} V_i}{M} \quad (4.9)$$

Application à l'expérience S Les coefficients de l'équation 4.8 pour l'expérience S sont regroupés dans le tableau 4.2. Aux jours -7, 0, 7 et 14, α_k est calculé à partir de la moyenne des mesures effectuées.

Pour les jours -6, 3 et 7, cette valeur a été estimée à partir des courbes d'évolution de la concentration en cadmium dans l'eau. α_k pourrait également être calculé à partir d'un modèle.

À la fin de l'expérience, la concentration en cadmium dans l'eau n'est pas tout à fait négligeable puisqu'il reste environ 5 % de la concentration initiale. Au total, 8.4% de la masse initiale de cadmium sont retirés par les prélèvements d'eau au cours de l'expérience (J-7 à J14). On ne peut donc pas faire l'hypothèse que la quantité totale de cadmium dans le système est constante.

TABLE 4.2 – Coefficients pour le calcul de la répartition du cadmium dans les microcosmes de l'expérience S

k	t_k	v_{p_k}	α_k	$v_{p_k}(\alpha_k - \alpha_f)$
1	- 7	0.010	1	0.0095
2	- 6	0.014	0.9	0.0119
3	0	0.090	0.3	0.0225
4	3	0.040	0.2	0.006
5	7	0.100	0.15	0.01
6	10	0.040	0.12	0.0028
7	14	0.100	0.08	0.003
8	21	0.120	0.05	

Dans l'expérience S, on a :

$$n = 7; f = n+1; V_i = 2; M = 100; \alpha_f = 0.05$$

$$\sum_{k=1}^n v_{p_k}(\alpha_k - \alpha_f) = 0.0657$$

$$C_{s_f} = 0.018343 \cdot C_{w_i}$$

Le tableau 4.3 présente les résultats des concentrations en cadmium dans le sédiment mesurées et calculées à la fin de l'expérience S. La concentration en cadmium moyenne mesurée dans le sédiment (C_{s_f-mes}) est inférieure à la concentration calculée à partir de la concentration en cadmium dans l'eau (C_{s_f-cal}), sauf pour la plus faible concentration ($C = 10 \mu\text{g.l}^{-1}$). Les résultats des calculs sont bien compris dans l'intervalle $[C_{s_f-mes} - 2\sigma; C_{s_f-mes} + 2\sigma]$. Les résultats des dosages de cadmium dans le sédiment sont cohérents avec les résultats théoriquement attendus à partir du dosage de cadmium dans l'eau. Les concentrations calculées avec l'équation simplifiée (4.9) sont légèrement supérieures aux concentrations théoriques exactes mais reste dans l'intervalle $[C_{s_f-mes} - 2\sigma; C_{s_f-mes} + 2\sigma]$ sauf pour la plus forte concentration. Le calcul simplifié est une bonne approximation étant donné la précision des mesures.

Nous avons supposé la masse de sédiment constante. En réalité, un biofilm se développe, des algues mortes se déposent et les organismes benthiques excrètent des déchets. Néanmoins, on peut supposer ces masses négligeables devant la masse initiale de sédiment.

Répartition du cadmium dans le sédiment dans l'essai dynamique

Dans l'expérience D, deux couches de sédiments ont été prélevées : 0-5 mm et 5-10 mm. Peu de dosages ont pu être effectués mais les quelques résultats montrent que le sédiment est principalement accumulé en surface (tableau 4.4). Ceci est en accord avec les résultats de Kottelat [101], qui montre que dans ses expériences, le cadmium se dépose à la surface du sédiment ou dans les 5 premiers millimètres. Cependant, dans nos microcosmes, on retrouve également du cadmium dans le sédiment

TABLE 4.3 – Comparaison des concentrations en cadmium dans le sédiment calculées (*cal*) et mesurées (*mes*) au temps final dans l'expérience sans renouvellement d'eau S en fonction de la concentration nominale C et de la concentration initiale C_{w_i} en cadmium dans l'eau (écartype σ entre parenthèses)

C	C_{w_i-mes}	C_{s_f-mes}	$C_{s_fapprox-cal}$	C_{s_f-cal}
($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
10	10.2	0.34 (0.17)	0.20	0.19
20	20.3	0.29 (0.08)	0.41	0.37
40	35.1	0.63 (0.32)	0.70	0.64
80	72.5	1.00 (0.15)	1.45	1.33

TABLE 4.4 – Concentrations en cadmium dans la couche supérieure (0-5 mm) C_{s_f-sup} et dans la couche inférieure (5-10 mm) C_{s_f-inf} des sédiments au temps final (J21) de l'expérience D en fonction de la concentration moyenne en cadmium dans l'eau sur la période d'exposition C_{w_m} (concentrations moyennes en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de sédiment sec \pm écart type, lorsque plusieurs réplicats ont été dosés, 1 minéralisation pour chaque réplicat)

C_{w_m} ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	C_{s_f-sup} ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	C_{s_f-inf} ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
0.5	0.25 ± 0.14	0.11 ± 0.06
1.1	0.76	0.28
2.3	0.73	0.35
5.8	3.75 ± 0.79	0.28 ± 0.05

inférieur. Ceci peut être dû à l'activité de bioturbation des organismes benthiques, dont les microcosmes de Kottelat [101] sont dépourvus. La concentration en cadmium dans la couche profonde semble peu dépendre de la concentration en cadmium dans l'eau. Des dosages complémentaires sur d'autres échantillons permettraient de préciser ces observations.

4.1.2 Eclairage

La figure 4.4 présente l'éclairage moyen à la surface de chaque microcosme entre J_0 et l'instant t . L'intensité lumineuse à la surface des béchers était plus élevée dans l'expérience avec renouvellement d'eau ($m = 3600$ lux ; $CV = 4\%$) que dans celle sans renouvellement d'eau ($m = 2200$ lux ; $CV = 5\%$). Nous rappelons que les mesures ont été réalisées à la surface des couvercles des microcosmes et que l'éclairage sous le couvercle correspond à environ 500 lux de moins. Pour des raisons logistiques, il a été nécessaire de changer d'installation expérimentale pour réaliser l'essai D. Néanmoins, l'éclairage retenu pour l'expérience D permettait de maintenir une concentration algale satisfaisante au cours de l'expérience. L'éclairage de l'expérience S correspondait au choix retenu pour l'ensemble des essais LAMs. On pourrait envisager de réaliser ultérieurement 2 essais témoins LAMs et LAMd avec le même éclairage.

Placement et rotation des béchers

Les microcosmes ont été placés de manière non aléatoire et une rotation logique a été mise en place. Le choix du positionnement non aléatoire découle d'une volonté d'optimiser le temps de réalisation des mesures. Les mesures ont été effectuées en allant des microcosmes témoins aux microcosmes les plus contaminés afin de minimiser les risques de contamination supplémentaire au cadmium au cours de l'expérience. Les outils de prélèvement et de mesure étant rincés entre chaque système, ce risque de contamination était faible, ce choix a tout de même été retenu. Les mesures pouvaient être réalisées de manière plus efficace si le positionnement des béchers était logique. Etant donné le nombre important de mesures réalisées chaque jour, ce facteur temps est loin d'être négligeable. Cependant, si moins de paramètres sont mesurés, il pourrait être intéressant d'opter pour un positionnement aléatoire.

Il a été décidé de réaliser une rotation logique des béchers durant l'expérience. Ce choix visait à homogénéiser les conditions environnementales moyennes (température, éclairage) durant l'expérience. Cependant, bien que l'éclairage et la température de chaque microcosme aient été suivis au cours du temps, il est difficile de prendre en compte l'influence des paramètres environnementaux sur les processus bio-physico-chimiques ayant lieu à l'intérieur de chaque microcosme si ces paramètres ne sont pas constants. Par exemple, la dynamique de développement des organismes peut varier au cours de l'expérience et du déplacement des béchers. Il serait préférable à l'avenir d'utiliser un positionnement fixe afin de pouvoir détecter l'influence éventuelle d'un facteur environnemental sur les résultats et de simplifier le suivi des processus à l'intérieur de chaque système.

4.1.3 Température

La température de la colonne d'eau des microcosmes est comprise entre 18.5°C et 22.8°C ($m = 20.8^{\circ}\text{C}$) dans l'essai sans renouvellement d'eau et 18.7°C et 19.7°C ($m = 19.2^{\circ}\text{C}$) dans l'expérience

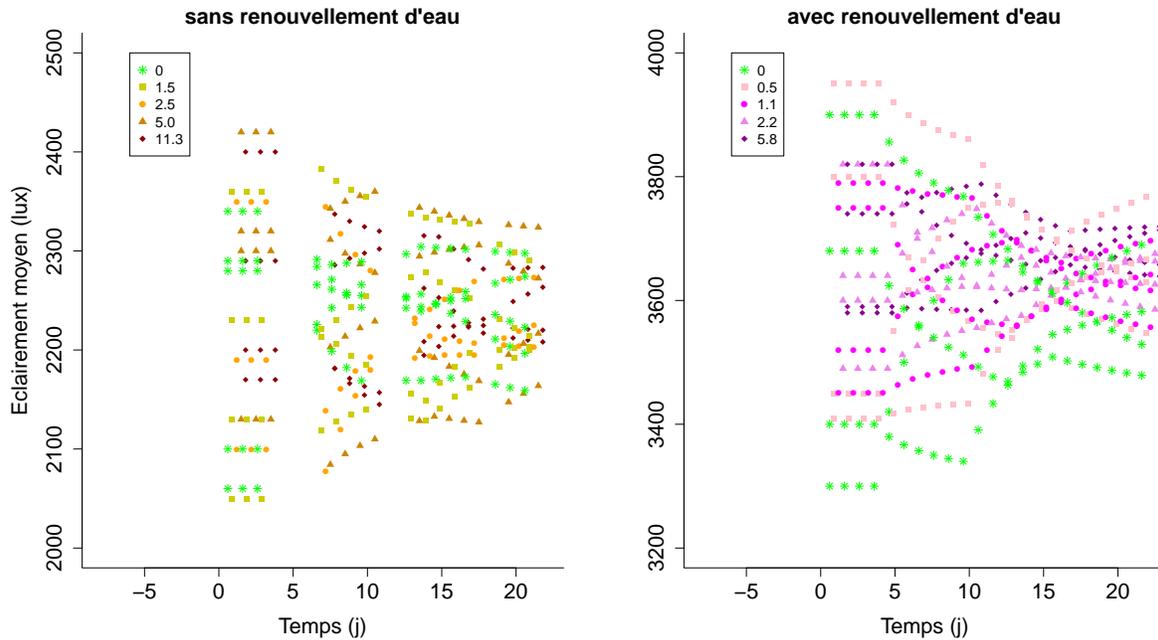


FIGURE 4.4 – Evolution de l'éclairage moyen des microcosmes (au dessus du couvercle) au cours des essais sans et avec renouvellement d'eau en fonction de la concentration moyenne en cadmium dans le microcosme durant la période d'exposition (points expérimentaux)

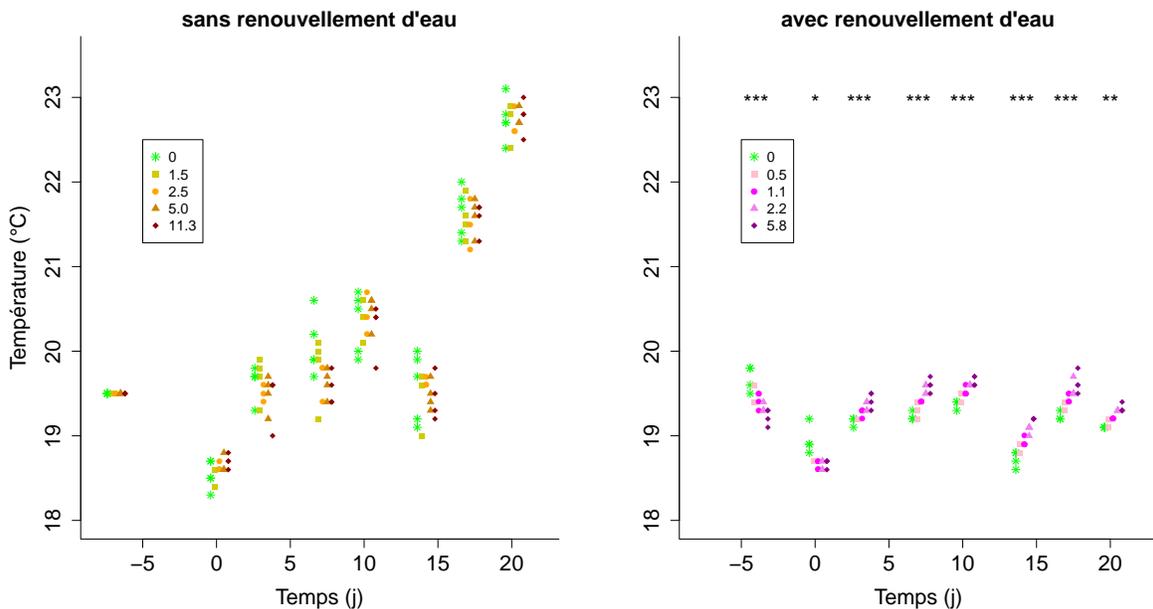


FIGURE 4.5 – Evolution de la température de la colonne d'eau des microcosmes au cours des essais sans et avec renouvellement d'eau en fonction de la concentration moyenne en cadmium dans le microcosme durant la période d'exposition (points expérimentaux et différences significatives entre traitements représentées par des étoiles)

avec renouvellement d'eau (figure 4.5).

L'augmentation de la température de la colonne d'eau des microcosmes de l'essai S à partir de J17 est due à l'augmentation de la température extérieure et au défaut de régulation de température de la salle d'essai. L'expérience S a été réalisée au mois de juin. A la fin du mois, les fortes températures extérieures ont entraîné une augmentation de 6°C de la température de la salle d'essai. Les essais ont donc été interrompus durant la période estivale. Le temps ne permettait pas de réaliser à nouveau cet essai à l'automne. Il est donc nécessaire d'éviter de faire des essais dans la période estivale en attendant que le processus de régulation de la température de la salle d'essai du LEHNA ait été amélioré.

Dans l'essai D, les variations significatives de température avec le traitement pourrait provenir du positionnement des bouteilles stockant l'eau d'entrée, par rapport aux systèmes de refroidissement et d'éclairage de la salle.

4.1.4 pH

4.1.4.1 Systèmes témoins

Evolution

L'évolution du pH dans la colonne d'eau des microcosmes est similaire au cours des essais S et D (figure 4.6). Le pH est compris entre 7.5 et 8.8. Le pH moyen sur toute la durée de l'essai est de 8.1 pour les 2 expériences. On observe un pic autour de J7/J10.

Cette évolution du pH suit la dynamique de croissance algale dans les systèmes. En effet, le pH est lié à l'activité de photosynthèse des algues :



Selon le principe de Le Chatelier, la consommation de CO_2 lors de la photosynthèse (équilibre 4.10) déplace l'équilibre 4.11 vers la droite, entraînant une diminution de la concentration en ions hydrogènes (H^+) dans le milieu, soit une augmentation de la concentration en ions hydroxydes (HO^-) (équilibre 4.12), donc une augmentation du pH de la solution.

On peut supposer qu'après J10, la croissance algale est limitée par le manque d'éléments nutritifs. La concentration en CO_2 dissous augmente alors à nouveau, car le dioxyde de carbone est moins consommé par les algues, généré par la respiration des daphnies et apporté par le bullage dans les systèmes statiques. L'équilibre 4.11 est donc déplacé vers la gauche, ce qui correspond à une diminution du pH de l'eau.

Notons que l'amplitude de variation du pH dans l'eau est moins importante en présence d'une phase sédimentaire. En effet, dans les essais préliminaires réalisés en phase aqueuse uniquement, le pH pouvait monter jusqu'à 9.8. Le sédiment a donc un pouvoir tampon. En effet, le sédiment

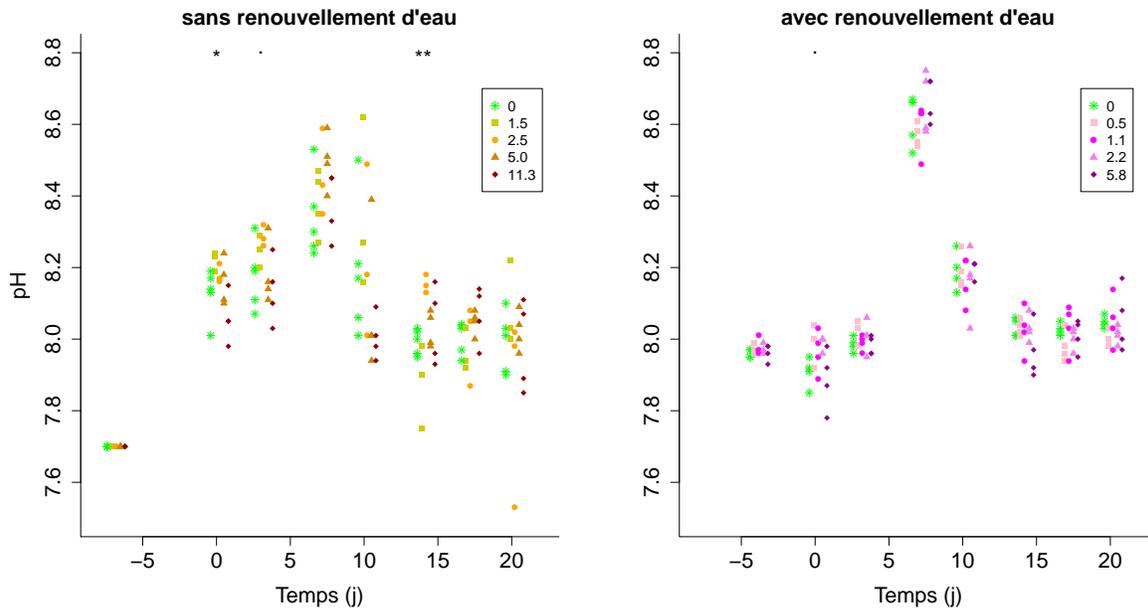


FIGURE 4.6 – Evolution du pH dans la colonne d'eau des microcosmes au cours des essais sans et avec renouvellement d'eau en fonction de la concentration moyenne en cadmium dans le microcosme durant la période d'exposition (points expérimentaux et différences significatives entre traitements représentées par des étoiles)

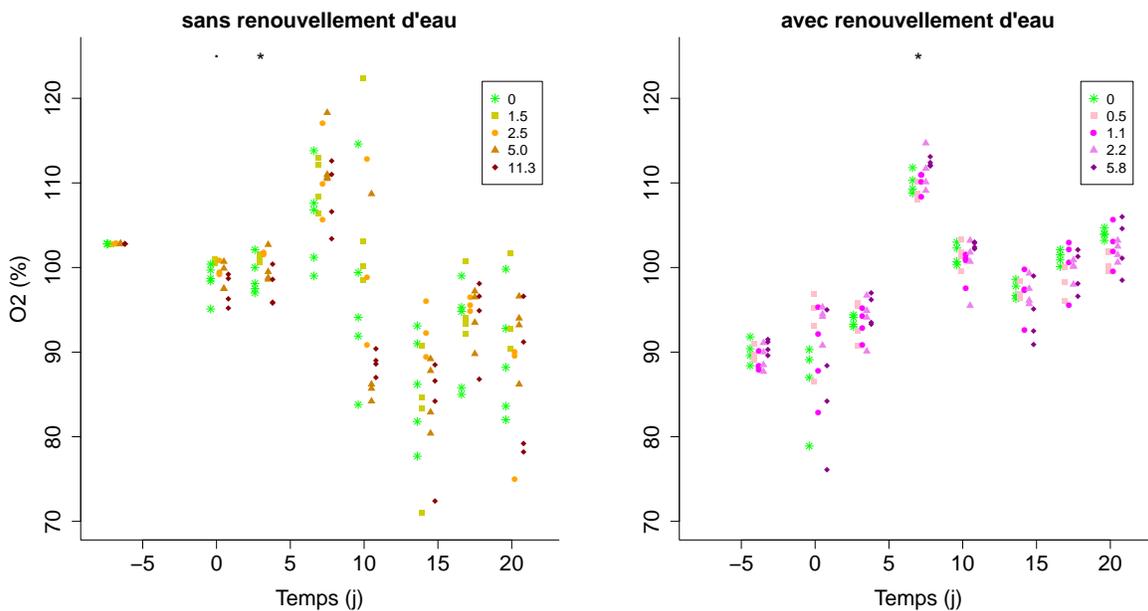


FIGURE 4.7 – Evolution de l'oxygène dissous dans la colonne d'eau des microcosmes au cours des essais sans et avec renouvellement d'eau en fonction de la concentration moyenne en cadmium dans le microcosme durant la période d'exposition (points expérimentaux et différences significatives entre traitements représentées par des étoiles)

artificiel contient du carbonate de calcium CaCO_3 . Ce carbonate de calcium solide peut être dissous en éléments minéraux (Ca^{2+} , CO_3^{2-}). L'ion carbonate (CO_3^{2-}), l'ion hydrogencarbonate (HCO_3^-), l'acide carbonique (H_2CO_3) et le dioxyde de carbone (CO_2) sont en équilibre (équation 4.13) :



Dans les deux expériences, la moyenne des coefficients de variation du pH pour chaque microcosme témoin au cours du temps est de 3%. Le renouvellement d'eau n'influence donc pas la stabilité du pH d'un microcosme.

Répliquabilité

Les coefficients de variation du pH entre répliqués à chaque jour de mesure sont compris entre 0.3% et 3.5% ($m = 1.2\%$; $ET = 0.8$) pour l'essai sans renouvellement d'eau et entre 0.2% et 1.2% ($m = 0.6$; $ET = 0.3$) pour l'essai avec renouvellement d'eau. Dans les deux expériences, le maximum de variabilité entre répliqués est atteint à J10, à la fin du pic de croissance des algues. La faible variabilité du pH peut être expliquée par l'effet tampon du sédiment et l'échelle logarithmique de mesure [40]. Le renouvellement d'eau permet d'améliorer la répliquabilité pour ce paramètre.

4.1.4.2 Effet du cadmium

On observe un effet significatif indirect du cadmium sur le pH dans l'essai S à J0 (anova, $p = 0.014$) et J14 (anova, $p = 0.0033$). A J0, le test de Dunnett ne permet d'identifier aucun traitement qui différerait du témoin de manière significative ($p = 0.09$ pour $C_m = 1.5 \mu\text{g.l}^{-1}$ de Cd). A J14 par contre, la moyenne du pH dans les microcosmes du traitement $2.5 \mu\text{g.l}^{-1}$ de Cd diffère significativement de la moyenne des témoins (Dunnett, $p = 0.027$). Cette différence est probablement due au fait que la concentration algale moyenne est plus importante dans ce traitement ($1.6 \cdot 10^5 \text{ part.ml}^{-1}$) que dans les microcosmes témoins ($0.94 \cdot 10^5 \text{ part.ml}^{-1}$).

Dans l'essai D, on ne met pas en évidence d'effet significatif du traitement sur le pH (anova, $p < 0.055$).

4.1.5 Oxygène dissous

4.1.5.1 Systèmes témoins

Evolution

La teneur en oxygène dissous dans la colonne d'eau des microcosmes est comprise entre 78% et 115% de saturation dans l'ensemble des témoins des essais S et D (figure 4.7). Comme pour le pH, on observe un pic autour de J7, puis la concentration diminue avec la densité algale. L'évolution de la concentration en oxygène dissous dans l'eau est également reliée à la densité algale, puisque les algues produisent de l'oxygène lors de la photosynthèse (équation 4.10).

Dans l'essai S, le bullage permet de maintenir la concentration en oxygène au dessus de 80% de saturation, même en fin d'expérience, lorsque la densité algale est faible et que l'activité des

autres organismes est importante. Ceci offre des conditions satisfaisantes pour le développement des invertébrés [160]. Par contre, le bullage ne permet pas de suivre la respiration globale du système, comme cela est fait dans d'autres études [28].

Dans l'essai D, le renouvellement d'eau permet de maintenir une teneur en oxygène dissous supérieure à 80% sans bullage. D'autre part, on observe que l'oxygène dissous dans l'eau se stabilise autour de 100% suite au pic de croissance algale. Ceci peut être expliqué par l'apport continu de nutriments, qui limite l'épuisement du milieu et favorise donc le développement des producteurs primaires. Sans renouvellement d'eau, il semble qu'il ne reste pratiquement plus d'orthophosphate disponible au bout de 20 jours (figure 4.11).

Dans les deux expériences, la moyenne des coefficients de variation de l'oxygène dissous pour chaque microcosme témoin au cours du temps est de 8%. Le renouvellement d'eau n'influence donc pas la stabilité de la teneur en oxygène d'un microcosme.

Répliquabilité

L'oxygène dissous est plus variable que le pH. Dans l'expérience S, les coefficients de variation à chaque jour de mesure sont compris entre 2% et 12%. Ce résultat est cohérent avec d'autres résultats de la littérature [40, 160]. Comme pour le pH, le maximum de variabilité est atteint à J10 dans les essais S et D.

Notons que dans l'essai statique préliminaire ECd3, réalisé sans phase sédimentaire, la variabilité de la concentration en oxygène dans l'eau est beaucoup plus faible que dans l'essai S. Ceci est lié à une faible variabilité de l'activité photosynthétique des algues dans cet essai.

La variabilité de la teneur en oxygène dissous dans l'eau des témoins est beaucoup plus faible lorsque l'eau est renouvelée. Les coefficients de variation sont de 1.3% à J10 et 0.6% à J20 dans l'essai D contre 12% et 8.1% dans l'essai S. Le renouvellement d'eau permet donc de stabiliser donc la teneur en oxygène dissous.

4.1.5.2 Effet du cadmium

On peut mettre en évidence une différence significative globale, entre la concentration en oxygène dissous moyenne des différents traitements, à J3 dans l'expérience S (anova, $p = 0.040$) et à J7 dans l'expérience D (anova, $p = 0.025$). Cependant, dans les 2 expériences, le test de Dunnett ne permet pas d'identifier une moyenne qui serait significativement différente de la moyenne des témoins.

4.1.6 Conductivité

4.1.6.1 Systèmes témoins

Evolution

Essai statique

Dans l'essai S, la conductivité croît presque linéairement (figure 4.8). Elle augmente de $290 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ à J-7 à $477 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ à J20 ($\text{CV} = 6.7 \%$). Cette augmentation de la conductivité est

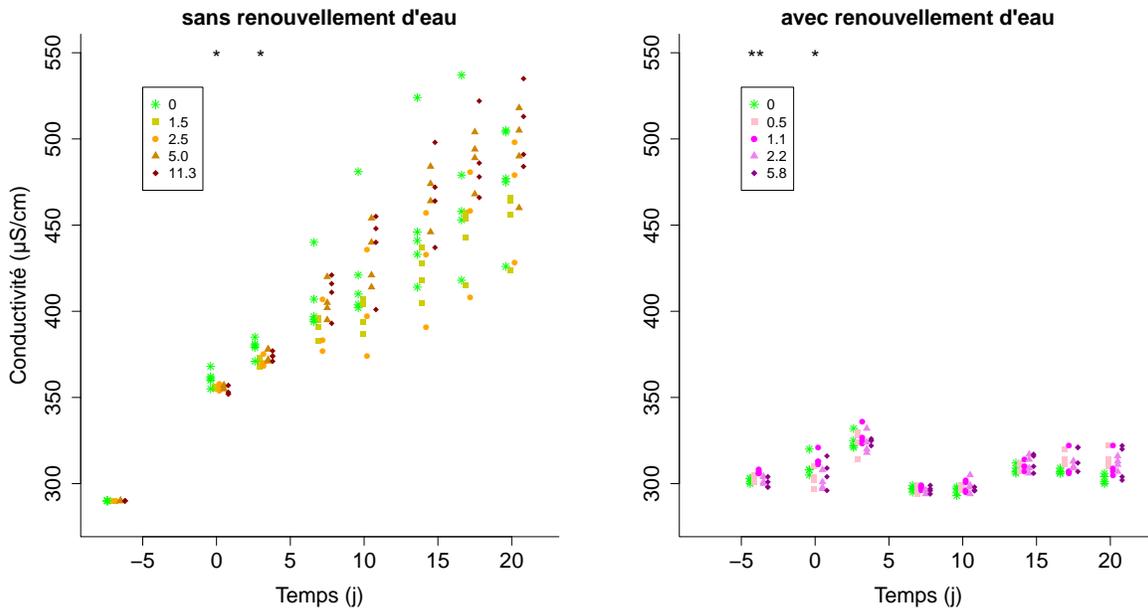


FIGURE 4.8 – Evolution de la conductivité dans la colonne d’eau des microcosmes au cours des essais sans et avec renouvellement d’eau en fonction de la concentration moyenne en cadmium dans le microcosme durant la période d’exposition (points expérimentaux et différences significatives entre traitements représentées par des étoiles)

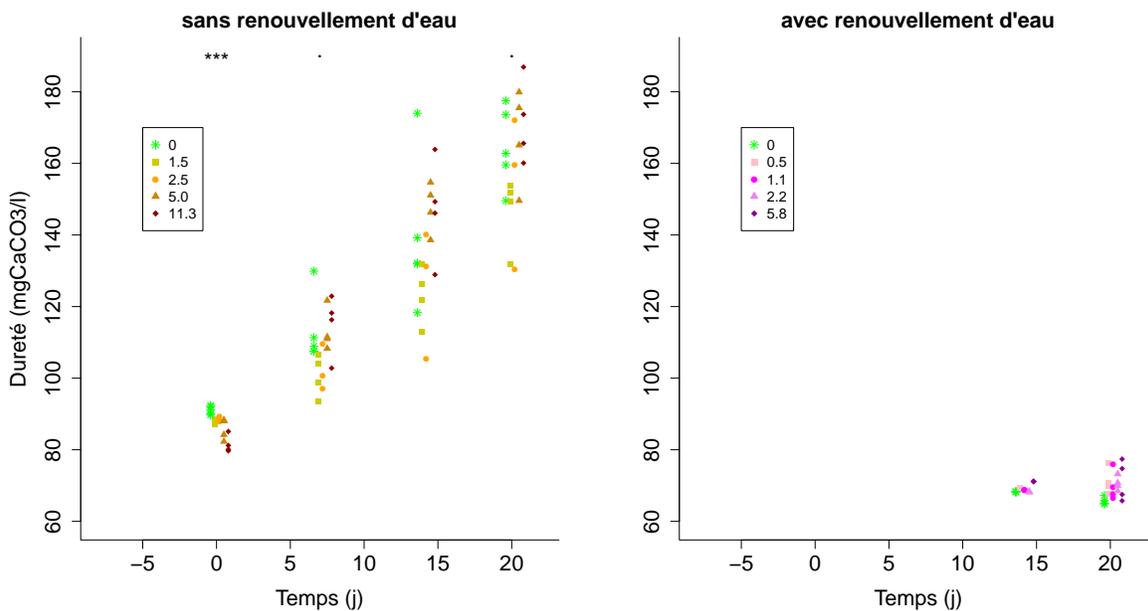


FIGURE 4.9 – Evolution de la dureté dans la colonne d’eau des microcosmes au cours des essais sans et avec renouvellement d’eau en fonction de la concentration moyenne en cadmium dans le microcosme durant la période d’exposition (points expérimentaux et différences significatives entre traitements représentées par des étoiles)

très fortement corrélée à l'augmentation de la dureté ($R = 0.98$) et plus particulièrement de la concentration en ions calcium ($R = 0.98$) dans l'eau.

La conductivité, notée s , d'une solution ionique est fonction des espèces ioniques présentes en solution ainsi que de leur concentration. En effet, si l'on note I_k l'ion k et λ_{I_k} la conductivité molaire ionique de l'ion k , on a :

$$s = \sum_{k=1}^n \lambda_{I_k} [I_k]$$

La conductivité de la colonne d'eau du microcosme évolue en fonction de plusieurs processus antagonistes ayant lieu dans le système :

- d'un côté, la diffusion d'ions à partir du sédiment et la minéralisation de la matière organique par les micro-organismes tendent à faire augmenter la conductivité,
- et d'un autre côté, le prélèvement de minéraux (nutriments, calcium) par les organismes, tend à faire diminuer cette conductivité.

Le relargage d'ions par la phase sédimentaire est le principal facteur expliquant l'évolution de la conductivité dans les systèmes statiques. Une partie des ions calcium de la phase sédimentaire sont relargués lors de la dissolution du carbonate de calcium. Mais la conductivité est également liée au compartiment biotique.

L'augmentation de la conductivité est généralement plus importante dans la phase de maturation, en l'absence d'organismes. La pente de la droite modélisant l'augmentation de la conductivité diminue au jour d'introduction des organismes (J0), dans la plupart des microcosmes de l'essai S. Donc si le prélèvement des ions par les organismes est moins important que le relargage par le sédiment, il n'est cependant pas négligeable.

Essai dynamique

Dès J0, la conductivité moyenne dans la colonne d'eau des témoins est significativement inférieure dans l'essai avec renouvellement d'eau D par rapport à l'essai statique S (figure 4.13). La conductivité dans les microcosmes témoins de l'expérience D est comprise entre $293 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ et $332 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. La moyenne des coefficients de variation de la conductivité de chaque microcosme témoin au cours du temps est de 3% dans l'expérience D, alors qu'elle est de 16% dans l'expérience S. Le renouvellement de l'eau permet donc de stabiliser fortement la conductivité au cours de l'essai (figure 4.8). Il permet d'évacuer les ions relargués par le sédiment et l'activité des organismes ainsi que d'apporter des ions consommés par les organismes.

Répliquabilité

Essai statique

Dans l'expérience S, les coefficients de variation de la conductivité aux différents jours sont compris entre 1% et 9%. Triffault-Bouchet [160] obtient un coefficient de variation inter-essais de 10.8%. La répliquabilité est donc bonne dans l'essai S par rapport à d'autres essais LAMs réalisés.

A J0, la répliquabilité de la conductivité des témoins est très bonne ($CV = 1\%$). La variabilité entre

réplicats augmente après l'introduction des organismes, jusqu'à J14, puis elle se stabilise. Plusieurs processus permettent d'expliquer cette variabilité croissante.

La variabilité de la conductivité peut être expliquée par celle des prélèvements d'ions par les producteurs primaires (éléments nutritifs) et les invertébrés (calcium) ainsi que par celle de la bioturbation générée par les organismes benthiques (hyalles et chironomes). L'augmentation de la variabilité au cours de l'essai peut être expliquée par l'augmentation de celle des prélèvements et de l'activité de bioturbation, du fait de la croissance des organismes ou des populations ou par des dynamiques différentes dans les microcosmes à un même instant.

Les résultats témoins de l'essai S montrent des corrélations, plus ou moins fortes suivant le jour, entre la conductivité et le nombre de frondes de lentilles d'eau, le nombre de daphnies mères, le nombre de hyalles et le nombre de chironomes émergents.

Conductivité et lentilles d'eau

Dans le réplikat 02, la conductivité augmente moins que dans les autres microcosmes témoins. La conductivité à J21 est de $426 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ alors qu'elle est comprise entre 475 et $505 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ dans les 4 autres réplikat. Or, la croissance des lentilles d'eau est particulièrement importante dans ce réplikat. Il y a 152 frondes à J21 alors que la moyenne du nombre de frondes dans les autres réplikat est de 83 ($CV = 20\%$). Le prélèvement d'ions par les lentilles d'eau est donc plus important dans le système 02 que dans les autres systèmes.

Il existe une forte corrélation négative entre le nombre de frondes et la conductivité à chaque jour de mesure. En effet, les lentilles d'eau prélevant des ions dans le milieu lors de la photosynthèse, la conductivité diminue lorsque la croissance augmente. En valeur absolue, les coefficients de corrélation sont supérieurs à 0.54 (valeur à J14) et ils atteignent 0.90 et 0.89 à J7 et J21 (figure 4.10). Or entre J10 et J17, la bioturbation liée à l'émergence des chironomes est importante. C'est également la période où la reproduction des daphnies est importante. Il est probable que la variabilité de ces deux paramètres ait également un impact très important sur la variabilité de la conductivité dans cet intervalle de temps.

A J21, la corrélation entre la conductivité et la surface des frondes ou la masse fraîche totale des lentilles d'eau est encore plus marquée, avec des coefficients de corrélation respectivement de -0.91 et -0.92.

Conductivité et particules en suspension

Il n'y a pas de relation évidente entre le nombre de particules en suspension et la conductivité. En valeur absolue, le coefficient de corrélation à chaque jour de mesure est inférieur à 0.23, sauf à J20 où il est de -0.48. On peut proposer plusieurs explications, surement complémentaires, à l'absence de corrélation forte entre la conductivité et le nombre de particules en suspension dans l'eau, contrairement aux lentilles d'eau.

Tout d'abord, le nombre de particules en suspension ne représente pas exactement le nombre d'algues vivantes, ayant une activité photosynthétique, dans la colonne d'eau.

Ensuite, les algues sont consommées par les invertébrés et cette consommation peut varier indépendamment de la conductivité. Le fait que les jeunes daphnies ne soient pas retirées des microcosmes

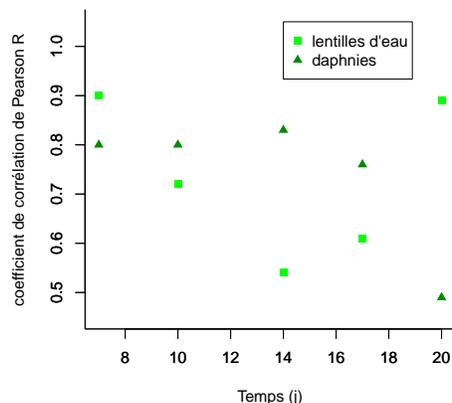


FIGURE 4.10 – Corrélation entre la conductivité et le nombre de daphnies mères ou le nombre de frondes de lentilles d'eau au cours de l'essai S (coefficient de corrélation de Pearson en valeur absolue)

juste après leur naissance, mais tous les 3 ou 4 jours dans l'essai S, entraîne une variabilité de la consommation des algues entre les systèmes liée à la celle de la reproduction des daphnies. En effet, à un jour donné, on pourrait retirer jusqu'à 300 daphnies de 2 ou 3 jours dans certains microcosmes et des daphnies venant tout juste de naître dans d'autres, ce qui a un impact fort sur la concentration algale dans les microcosmes considérés. En présence de consommateurs, la densité algale à un instant donné ne reflète donc pas la quantité d'ions prélevés pour la photosynthèse.

Conductivité et daphnies

Daphnies mères

On observe, par contre, une corrélation négative entre la conductivité et le nombre de daphnies mère.

Dans le réplicat 02, où la conductivité est particulièrement faible, toutes les daphnies mères sont vivantes à la fin de l'essai. Inversement, dans le réplicat 04, la conductivité est particulièrement élevée en milieu d'expérience : elle est de $524 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ à J14 alors que la moyenne dans les 4 autres réplicats est de $429 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ($\text{CV} = 3\%$). Le réplicat 04 est le seul système dans lequel deux daphnies mères meurent dès le 2ème jour.

En valeur absolue, le coefficient de corrélation entre le nombre de daphnies mère et la conductivité est supérieur à 0.76 entre J7 et J17. Il chute par contre à 0.49 à J20. Cette corrélation peut être expliquée par deux phénomènes complémentaires.

Relation directe Les daphnies prélèvent des ions calcium dans l'eau afin de construire leur carapace. Or nous avons vu que la conductivité était très fortement liée à la teneur en calcium dans l'eau ($R = 0.98$). Plus les daphnies sont nombreuses, plus le prélèvement global d'ions calcium augmente.

Relation indirecte On observe, entre certains réplicats, que la teneur en particules en suspension est équivalente et que la conductivité ainsi que le nombre de daphnies varie. Par exemple,

la densité de particules en suspension au cours de l'essai est équivalente dans les réplicats 02, 04 et 05, alors que le nombre de daphnies survivantes à partir de J2 est de 8 dans 04 et de 10 dans 02 et 05 et que la conductivité à J10 est de 481 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ dans 04 et de 402 et 410 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ dans 02 et 05. On peut alors émettre l'hypothèse que l'activité photosynthétique des algues, et donc le prélèvement d'ions nutritifs, est plus importante dans les microcosmes où le broutage par les daphnies mères est plus important et la densité de particules en suspension constante.

Daphnies filles

Par contre, la relation entre le nombre de daphnies filles cumulé et la conductivité est de moins en moins nette au cours de l'expérience. Le coefficient de corrélation est de -0.37, -0.18, -0.09 et -0.04 à J10, J14, J17 et J20 respectivement. Il serait plus intéressant d'établir une relation entre la biomasse cumulée des daphnies filles retirées et la conductivité, car la masse prendrait en compte l'âge des daphnies au moment du retrait.

Conductivité et hyaelles

A la fin de l'essai S, il y a une assez forte corrélation positive entre la conductivité et le nombre de hyaelles ($R = 0.73$). On peut faire l'hypothèse que les hyaelles contribuent à augmenter la conductivité de l'eau par leur activité de bioturbation à la surface du sédiment.

Nous ne connaissons pas les données de survie des hyaelles avant la fin de l'essai. Mais on peut faire l'hypothèse que l'activité de bioturbation des hyaelles mortes à la fin de l'essai est moins importante que celle des hyaelles qui restent vivantes jusqu'à J21. On pourrait alors supposer qu'il existe un lien entre le nombre de hyaelles en fin d'essai et l'activité de bioturbation des hyaelles au cours de l'essai. On peut alors calculer la corrélation entre le nombre de hyaelles à J21 et la conductivité à Jx, en faisant varier x. On se rend compte que cette corrélation augmente au cours du temps ($R = 0.096, 0.3, 0.49$ et 0.73 à J10, J14, J17 et J20). On peut alors poser l'hypothèse que l'impact de l'activité des hyaelles sur la conductivité de l'eau augmente au fur et à mesure de la croissance des amphipodes. En fin d'expérience, la variabilité de la survie des hyaelles semble être un des facteurs importants à prendre en compte pour expliquer la variabilité de la conductivité.

Conductivité et chironomes

Afin d'évaluer si l'activité de bioturbation des chironomes a un impact sur la conductivité de l'eau, on peut regarder par exemple la corrélation entre la conductivité à J10 et J14 et le nombre de chironomes émergents les jours suivants.

En effet, lors d'un essai préliminaire (E4), nous avons mis en évidence l'impact de l'activité des chironomes sur la turbidité de la colonne d'eau. Cet essai n'était pas réalisé avec du sédiment naturel d'Aiguebelette, mais du kaolin, qui se remet très facilement en suspension dans la colonne d'eau. Les seuls organismes introduits étaient des hyaelles et des chironomes. On observait un pic de turbidité entre J8 et J18 avec un maximum atteint entre J10 et J14 et des émergences à partir de J14. L'activité de bioturbation semble donc particulièrement importante entre J10 et J14 et pourrait accentuer l'augmentation de la conductivité.

Il existe une corrélation positive moyenne entre la conductivité à J10 et le nombre de chironomes émergents à J14 ($R = 0.55$), J16 ($R = 0.62$) et J17 ($R = 0.47$). En fonction des émergences à J19,

le coefficient de corrélation est seulement de 0.33. La bioturbation des chironomes ne semble donc pas être le principal facteur expliquant la variabilité de la conductivité.

La corrélation entre le nombre total d'émergents et la conductivité à Jx diminue lorsque x augmente. Il n'y a pas de corrélation à J21 ($R = 0.04$). La part de la variabilité de la conductivité liée aux chironomes est donc faible et semble donc diminuer avec le temps.

Une analyse dans laquelle on prendrait en compte les données témoins de nombreuses expériences permettraient de tester les hypothèses proposées.

Essai dynamique

Le renouvellement d'eau permet d'améliorer la réplicabilité du paramètre conductivité. En effet, les coefficients de variation des systèmes témoins à chaque jour de mesure sont compris en 0.5% et 2% tout au long de l'essai D.

4.1.6.2 Effet du cadmium

Evolution

Essai statique

Dans l'expérience S, la moyenne de la conductivité dans les traitements avec cadmium est inférieure à celle des témoins à J0 et J3. On peut mettre en évidence une différence significative de conductivité moyenne entre les différents traitements à ces deux jours (anova, $p = 0.01$ et $p = 0.027$). A J0, tous les traitements diffèrent statistiquement des témoins sauf le traitement pour lequel $C_m = 2.5 \mu\text{g.l}^{-1}$ (test de Dunnett). A J3, la conductivité est significativement inférieure à celle des témoins pour les concentrations moyennes en cadmium de 1.5 et 2.5 $\mu\text{g.l}^{-1}$.

A partir de J7, on ne peut plus mettre en évidence de différence significative globale entre traitements (anova, $p \geq 0.11$). En dehors des témoins, la conductivité moyenne par traitement augmente avec la concentration en cadmium (anova, $p \leq 0.067$). Pour les deux plus faibles concentrations en cadmium, la moyenne de la conductivité est inférieure à celle des témoins, alors qu'elle est supérieure pour les concentrations en cadmium les plus fortes.

On pourrait expliquer la plus faible conductivité moyenne dans les microcosmes avec 1.5 et 2.5 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de cadmium en moyenne par une augmentation des prélèvements par les producteurs primaires ou une diminution de l'activité de bioturbation des organismes benthiques. Au vu de l'ensemble des résultats, il semblerait que l'accroissement de la croissance algale et la diminution des émergences explique cette évolution. Pour le réplicat 101 ($C_m = 1.5 \mu\text{g.l}^{-1}$), la conductivité est beaucoup la plus faible du traitement alors que le pic de croissance algal est le plus fort, le nombre de daphnies survivantes est le plus important et le nombre de chironomes émergents est le plus faible. Pour le réplicat 201 ($C_m = 2.5 \mu\text{g.l}^{-1}$), la conductivité est beaucoup la plus faible du traitement alors que le pic de croissance algal est le plus fort et le nombre de chironomes émergents est un des plus faibles.

Inversement, on pourrait expliquer la plus forte conductivité moyenne dans les microcosmes avec 5.0 et 11.3 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de cadmium en moyenne par une diminution des prélèvements par les producteurs

primaires ou une augmentation de l'activité de bioturbation des organismes benthiques. La diminution des prélèvements par les algues et les lentilles d'eau semble expliquer cette augmentation de la conductivité. En effet, le cadmium a un impact sur la croissance des lentilles d'eau. De plus, le cadmium entraîne une diminution de la croissance, la reproduction et la survie des daphnies ainsi que de la survie des hyalelles. Le nombre d'algues broutées est donc moins important lorsque la concentration en cadmium augmente. Or le nombre de particules en suspension est ne diffère pas d'un traitement à l'autre. Les algues prélèvent donc moins d'ions pour se multiplier dans les systèmes les plus contaminés.

Essai dynamique

Dans l'essai dynamique, nous ne pouvons pas identifier un traitement, dont la conductivité moyenne est statistiquement différente de celle des témoins. Le renouvellement d'eau crée donc des conditions similaires entre les traitements pour ce paramètre.

Répliquabilité

Dans l'essai S, la répliquabilité de la conductivité est globalement meilleure en présence de contaminant. Mais ceci est principalement du à un réplicat (04). On ne peut donc pas généraliser sans effectuer une comparaison avec d'autres résultats.

Dans l'essai S, notons que l'intensité de liaison entre la conductivité à J10 et le nombre de chironomes émergents à J21 est plus forte dans les essais où la concentration en cadmium est plus importante ($R = 0.33, 0.34, 0.93, 0.84$ et 0.74 pour $C_m = 0, 1.5, 2.5, 5.0$ et 11.3 respectivement).

Dans l'essai D, la répliquabilité est très bonne avec et sans contaminant. Elle est très légèrement supérieure avec contaminant.

4.1.7 Dureté

4.1.7.1 Systèmes témoins

Evolution

Essai statique

Dans l'essai S, la dureté de l'eau surnageante augmente presque linéairement au cours de l'expérience (figure 4.9). La dureté est de 91 mg.l^{-1} de CaCO_3 ($CV = 1\%$) à J0 et de 165 mg.l^{-1} de CaCO_3 ($CV = 7\%$) à J20. On retrouve cette évolution dans tous les essais LAMs réalisés.

L'évolution de la dureté est principalement corrélée au relargage des ions calcium ($R = 0.99$ au lieu de 0.68 pour le magnésium dans les témoins). Les teneurs en ions calcium et magnésium dans la colonne d'eau augmentent significativement entre J0 et J20. L'amplitude de variation de la concentration moyenne en magnésium est faible : elle augmente de 5.7 mg.l^{-1} ($CV = 1.0\%$) à J0 à 6.0 mg.l^{-1} ($CV = 1.2\%$) à J20. Par contre, la concentration moyenne en calcium dans les témoins double : elle augmente de 27.1 mg.l^{-1} ($CV = 1.7\%$) à J0 à 56.0 mg.l^{-1} ($CV = 8.0\%$) à J20. Dans les expériences préliminaires, on constatait la même évolution. Dans l'expérience FFE2,

la concentration moyenne en calcium dans les microcosmes contenant de l'eau reconstituée à partir d'eau déminéralisée passe de 28.7 mg.l⁻¹ (CV = 3%) à J0 à 51.7 mg.l⁻¹ (CV = 6.9%) à J21.

Ce phénomène n'était pas observé dans les travaux de Triffault-Bouchet [160]. Les teneurs en anions et cations sont stables dans la colonne d'eau des microcosmes LAMs au cours de ses essais. En comparant les témoins de 3 essais, elle observe que la concentration moyenne Ca²⁺ est de 26.2 mg.l⁻¹ (CV = 15.0 %) à J10 et de 25.3 mg.l⁻¹ (CV = 21.9 %) à J30. La concentration moyenne en Mg²⁺ est de 3.8 mg.l⁻¹ à J10 et à J30 (CV = 6.9 et 7.5% respectivement). Seulement, 6 des 7 essais retenus pour l'analyse des témoins étaient réalisés avec un sédiment différent du notre (sédiment naturel du lac d'Aiguebelette). Il est possible que les 3 essais sélectionnés soient réalisés avec ce sédiment et qu'il ne relargue pas des ions calcium comme le sédiment artificiel utilisé lors de ce travail.

Essai dynamique

Lorsque la colonne d'eau des microcosmes est continuellement renouvelée, la dureté reste stable au cours de l'essai. Dans l'expérience D, la dureté moyenne dans les témoins est de 66 mg.l⁻¹ de CaCO₃ (CV = 1.6%) à J20, comme dans l'eau en entrée. La teneur en ion calcium moyenne dans les témoins est également stable : elle est de 20.4 mg.l⁻¹ à J14 et 19.5 mg.l⁻¹ à J20. Le renouvellement d'eau permet d'évacuer le calcium relargué par le sédiment et ainsi de stabiliser la dureté dans la colonne d'eau.

Répliquabilité

En condition statique, on observe que la variabilité de la concentration en ion calcium et de la dureté augmente au cours de l'essai. Triffault-Bouchet [160] obtenait le même résultat. On peut supposer que les interactions entre eau et sédiment varient d'un système à l'autre en fonction de l'activité des organismes, en particulier les organismes benthiques. Cette activité se développant au cours de l'essai, on peut émettre l'hypothèse qu'elle est à l'origine de la variabilité croissante du relargage de calcium dans l'eau.

Avec renouvellement d'eau, la répliquabilité de la dureté est nettement améliorée en fin d'essai. A J20, les coefficients de variation pour la dureté des témoins sont de 6.8% dans l'essai S et 1.6% dans l'essai D.

4.1.7.2 Effet du cadmium

Dans l'essai S, l'évolution de la dureté dans les différents traitements est proche de celle de la conductivité. Cela confirme le fait que la variabilité de la conductivité est surtout due à celle de la concentration en calcium dans l'eau. A partir de J3, les différences entre la dureté et la conductivité sont principalement due aux prélèvements d'ions par les producteurs primaires.

A J0, la dureté décroît très significativement avec la concentration en cadmium (anova, $p = 2.9 \cdot 10^{-5}$). Il est possible que la concentration en cadmium influence les équilibres entre la phase sédimentaire et la colonne d'eau, en particulier l'équilibre du calcium. Il faudrait utiliser un modèle géo-chimique pour le vérifier.

Dans l'essai D, on ne met pas en évidence de différence entre la dureté de l'eau des témoins et des microcosmes contaminés.

4.1.8 Orthophosphate

4.1.8.1 Systèmes témoins

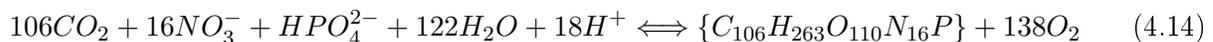
Evolution

Essai statique

Dans l'essai S, la concentration en orthophosphate décroît au cours de l'essai (figure 4.11). Dans les témoins, elle chute fortement entre J0 ($m = 0.14 \text{ mg.l}^{-1}$, $CV = 35\%$) et J3 ($m = 0.06 \text{ mg.l}^{-1}$, $CV = 39\%$). Le milieu est pratiquement épuisé en orthophosphate en fin d'expérience. La concentration moyenne à J20 dans les témoins est de 0.02 mg.l^{-1} ($CV = 67\%$). La moyenne des coefficients de variation pour chaque microcosme témoin au cours du temps est de 92% ($CV = 16\%$).

On observe que la concentration en PO_4^{3-} est importante en fin d'essai dans le réplicat 02, réplicat dans lequel la croissance des lentilles d'eau est beaucoup plus forte que dans les autres microcosmes. Nous verrons dans la section 4.2.2 qu'il existe une corrélation entre la concentration en orthophosphate et le nombre de lentilles d'eau.

En effet, les ions orthophosphates PO_4^{3-} , tout comme les ions nitrates NO_3^- , sont nécessaires à la photosynthèse des producteurs primaires. D'après Sigg *et al.* [144], la stoechiométrie correspond à peu près à l'équilibre 4.14, bien qu'elle soit différente pour chaque système aquatique et chaque algue. La dynamique photosynthèse-respiration est généralement régie par la relation 4.15. Le flux d'énergie nécessaire est accompagné par le cycle des nutriments et des éléments traces. L'orthophosphate PO_4^{3-} est souvent l'élément limitant la croissance algale, d'où l'intérêt de connaître sa dynamique.



$$\Delta C : \Delta N : \Delta P \approx 106 : 16 : 1 \quad (4.15)$$

Essai dynamique

Dans l'essai D, la moyenne des coefficients de variation pour chaque microcosme témoin au cours du temps est de 45% ($CV = 31\%$). Ce paramètre est donc 2 fois plus stable dans l'essai D. Le renouvellement d'eau permet donc de stabiliser la concentration en orthophosphate au cours de l'essai.

La concentration en orthophosphate en fin d'essai est plus importante que dans l'essai S. A J20, la concentration moyenne est de 0.06 mg.l^{-1} ($CV = 43\%$). Le renouvellement d'eau permet donc d'atténuer l'épuisement du microcosme en PO_4^{3-} , d'autant plus que la croissance algale est *a priori* plus importante dans l'essai D que dans l'essai S en fin d'expérience (section 4.2.1).

Répliquabilité

Dans l'expérience S, les coefficients de variation de la concentration en PO_4^{3-} sont compris entre 35% (à J0) et 107% (à J7). La plus forte variabilité pourrait être due à des décalages de pic de croissance algale (section 4.2.1).

Dans l'essai D, la répliquabilité de ce paramètre est bien meilleure : le coefficient de variation moyen de la concentration en orthophosphate à chaque jour de mesure est de 21%. A J7, le coefficient de variation est seulement de 20%.

4.1.8.2 Effet du cadmium

A J0, la concentration en orthophosphate décroît très significativement lorsque la concentration en cadmium augmente (anova, $p = 7.0 \cdot 10^{-5}$). A J3, la concentration en orthophosphate dans les microcosmes contaminés est significativement supérieure à celle des témoins (anova, $p = 0.0023$). Cela illustre bien le fait que l'orthophosphate est en équilibre dynamique entre sa forme libre dissoute et sa forme particulaire. La concentration en cadmium semble jouer un rôle dans cet équilibre.

4.1.9 Ammoniaque

4.1.9.1 Systèmes témoins

Evolution

L'évolution de la teneur en ammoniaque dans la colonne d'eau des microcosmes témoins est similaire dans les expériences S et D. Cette teneur, qui passe par un pic à J3, est très faible en fin d'essai (figure 4.12).

On désigne par l'expression "ammoniaque non ionisé" toutes les formes aqueuses de l'ammoniaque sauf l'ion ammonium (NH_4^+), correspondant à l'ammoniaque ionisé. Lorsque rien n'est précisé, on parle d'ammoniaque total. L'ammoniaque ionisé sous forme d'ion ammonium (NH_4^+) est une source d'azote assimilable par les producteurs primaires. Il est transformé en nitrites (NO_2^-) puis en nitrates (NO_3^-). Les nitrates sont nécessaires à la photosynthèse comme les ions orthophosphates (PO_4^{3-}) (relation 4.15). L'ammoniaque est principalement issu de la minéralisation de l'azote organique par les microorganismes. On peut émettre l'hypothèse que le pic d'ammoniaque est dû à une intensification de cette activité à partir de J0. En effet, les systèmes sont éclairés à partir de ce jour. De plus, on peut supposer que des microorganismes supplémentaires sont introduits dans les microcosmes en même temps que les organismes d'élevage. Enfin, l'activité des organismes introduits dans les microcosmes à J0 génère de la matière organique à dégrader. On pourrait ensuite expliquer la diminution de la teneur en ammoniaque dans les microcosmes à partir de J3 par le prélèvement d'ions nitrates pour la photosynthèse et le déplacement des autres équilibres du cycle de l'azote. La consommation de la matière organique initialement introduite dans le sédiment (TétraMin®) par les organismes benthiques a peut-être également une influence.

Par rapport au travail de Triffault-Bouchet [160], nous avons mis en évidence la présence d'un pic d'ammoniaque au début de la phase d'exposition. Il serait intéressant, dans une future expérience,

de faire des mesures journalières entre J0 et J5 pour déterminer précisément à quel moment a lieu ce pic d'ammoniaque.

La teneur en ammoniaque dans les systèmes témoins est inférieure à 1.77 mg.l^{-1} dans l'expérience S et 1.26 mg.l^{-1} dans l'expérience D.

Le pH et la température sont les principaux facteurs qui régissent l'équilibre entre l'ammoniaque ionisé et non ionisé. La forme non ionisée serait plus toxique car la neutralité de la molécule lui permettrait de mieux traverser les membranes biologiques que les autres formes [168]. Outre le pH et la température, la teneur en oxygène dissous, la force ionique, la salinité, l'exposition, la présence d'autres substances toxiques et l'acclimatation antérieure des organismes influencent la toxicité de l'ammoniaque non ionisé.

D'après la relation d'Emerson *et al.* [66], qui prend en compte le pH et la température, les pourcentages d'ammoniaque non ionisé sont compris entre 2 et 12% dans l'essai S et entre 3 et 15% dans l'essai D. Les teneurs en ammoniaque non ionisé passent par un maximum à J7. Les teneurs maximales sont de 0.17 et 0.07 mg.l^{-1} dans les essais S et D respectivement. Par contre, le pic d'ammonium est atteint à J3 : les teneurs maximales sont de 1.8 et 1.29 mg.l^{-1} dans les essais S et D respectivement.

Les teneurs maximales en ammoniaque non ionisé mesurées dans nos essais sont réalistes. Des concentrations supérieures à nos valeurs ont été retrouvées dans des eaux douces du Canada [38]. Cependant, nos teneurs dépassent la recommandation canadienne pour la qualité des eaux visant à protéger la vie aquatique dulçaquicole de 2010, qui est de ne pas dépasser 0.019 mg.l^{-1} d'ammoniaque non ionisé [38].

Dans la thèse de Triffault-Bouchet [160], la concentration moyenne en ammonium dans l'eau des témoins de 4 essais était de 6.51 mg.l^{-1} (CV = 104%) à J10 et de 5.70 mg.l^{-1} (CV = 111%) à J22. Nos teneurs en ammonium moyennes, 0.59 mg.l^{-1} (CV = 120%) à J10 et de 0.19 mg.l^{-1} (CV = 77%) à J20, sont donc bien inférieures à celles observées dans les essais LAMs antérieurs. Ceci peut être expliqué par le fait que nous n'avons pas apporté de Tétramin® en cours d'essai comme c'était le cas dans les essais de Triffault-Bouchet [160].

Il existe un grand nombre de données sur la toxicité de l'ammoniaque pour les organismes aquatiques. Des LC50 ont été estimées entre 1.1 et 17.4 mg.l^{-1} de NH_3 non ionisé pour les différents organismes du microcosme [181, 25, 52, 8, 47]. D'après ces données, les hyalles sont les organismes les plus sensibles à l'ammoniaque avec une LC50 de 1.1 mg.l^{-1} de NH_3 non ionisé après 4 semaines d'exposition.

Nos valeurs sont bien inférieures à ces LC50. Néanmoins, il est possible qu'il y ait des effets sublétaux sur les organismes en début d'expérience et que la présence d'ammoniaque non ionisé accentue l'effet du cadmium sur les organismes dans certains microcosmes, par exemple pour les daphnies dont la mortalité apparaît durant les 3 premiers jours dans l'essai S. Les concentrations maximales en ammoniaque étant moins importante dans l'essai D, grâce au renouvellement de l'eau qui permet d'évacuer une partie des molécules issues de la dégradation de la matière organique, l'effet nocif sur les organismes devrait être moins marqué.

La moyenne des coefficients de variation de la teneur en NH_3 de chaque microcosme témoin au cours du temps est de 81% dans l'expérience S et de 47% dans l'expérience D. Le renouvellement de l'eau permet donc de stabiliser la concentration en NH_3 au cours de l'essai.

Répliquabilité

Essai statique

La concentration en ammoniacque est beaucoup plus variable que la plupart des autres paramètres abiotiques. Dans l'essai statique S, on observe que le pic d'ammoniacque n'est pas présent dans tous les microcosmes témoins. Dans les répliqués 04 et 05, la teneur en ammoniacque n'excède pas 0.2 mg.l^{-1} après J0, alors qu'elle est en moyenne de 1.5 mg.l^{-1} dans les 3 autres répliqués à J3. La répliquabilité de ce paramètre est donc très faible. Les coefficients de variation à un temps donné de la teneur en ammoniacque sont compris entre 55% et 121% avec une moyenne de 85%. Du fait de cette variabilité, les tests classiques ne permettent pas de mettre en évidence de différence significative entre la moyenne de la concentration en ammoniacque à chaque jour de mesure dans les expériences S et D ($p > 0.06$).

On peut supposer que cette variabilité est due à une différence d'activité microbienne entre les systèmes. Une des sources de variation de cette activité microbienne pourrait être une différence dans la répartition de la matière organique initialement introduite dans le sédiment artificiel. On observe que la variabilité de l'ammoniacque est plus importante à J0 qu'à J-6 (figure 4.12). Ceci montre l'existence de l'activité microbienne durant la phase de maturation du sédiment artificiel. Mais on voit également que cette première phase introduit de la variabilité au début de phase d'exposition.

Il est probable que cette variabilité ait des conséquences sur de nombreux compartiments du microcosme. Nous avons vu que d'une part, l'ammoniacque ionisé (ammonium), transformé en nitrite puis en nitrate par les bactéries, peut être source de nutriments pour les producteurs primaires. D'autre part, l'ammoniacque non ionisé peut aussi être toxique pour les différents organismes. On peut donc supposer que la variabilité en NH_3 , et ses différentes formes, entraîne une variabilité du développement des organismes du microcosme. Ceci peut alors induire une variabilité supplémentaire des autres paramètres physico-chimiques. Inversement, une variabilité des autres paramètres peut entraîner une variabilité de la concentration en ammoniacque.

Dans l'expérience S, on observe que, dans le microcosme témoin où la concentration en ammoniacque non ionisé est la plus importante à J3 et J7 (répliqué 03), la survie des chironomes (50%) est bien inférieure à celle des 4 autres répliqués (80%). Le seul microcosme dans lequel toutes les hyalles ont survécu (répliqué 05, aussi noté 203) est un des deux répliqués (04 et 05) dans lesquels la concentration en ammoniacque non ionisé est inférieure à 0.02 mg.l^{-1} au cours de l'expérience. Le coefficient de corrélation entre la teneur en ammoniacque non ionisée à J10 et le nombre de hyalles survivantes à J21 est de -0.87. Si on exclut ces 2 répliqués 04 et 05, on observe que le nombre de frondes en fin d'essai est inversement corrélé à la concentration en ammoniacque à J3 ($R = -0.98$). La corrélation à la concentration en ammoniacque non ionisée est moins marquée. Toujours en excluant les répliqués 04 et 05, on note que la concentration en ammoniacque non ionisée à J7 est particulièrement corrélée à la concentration en particules en suspension dans la colonne d'eau, qui donne une

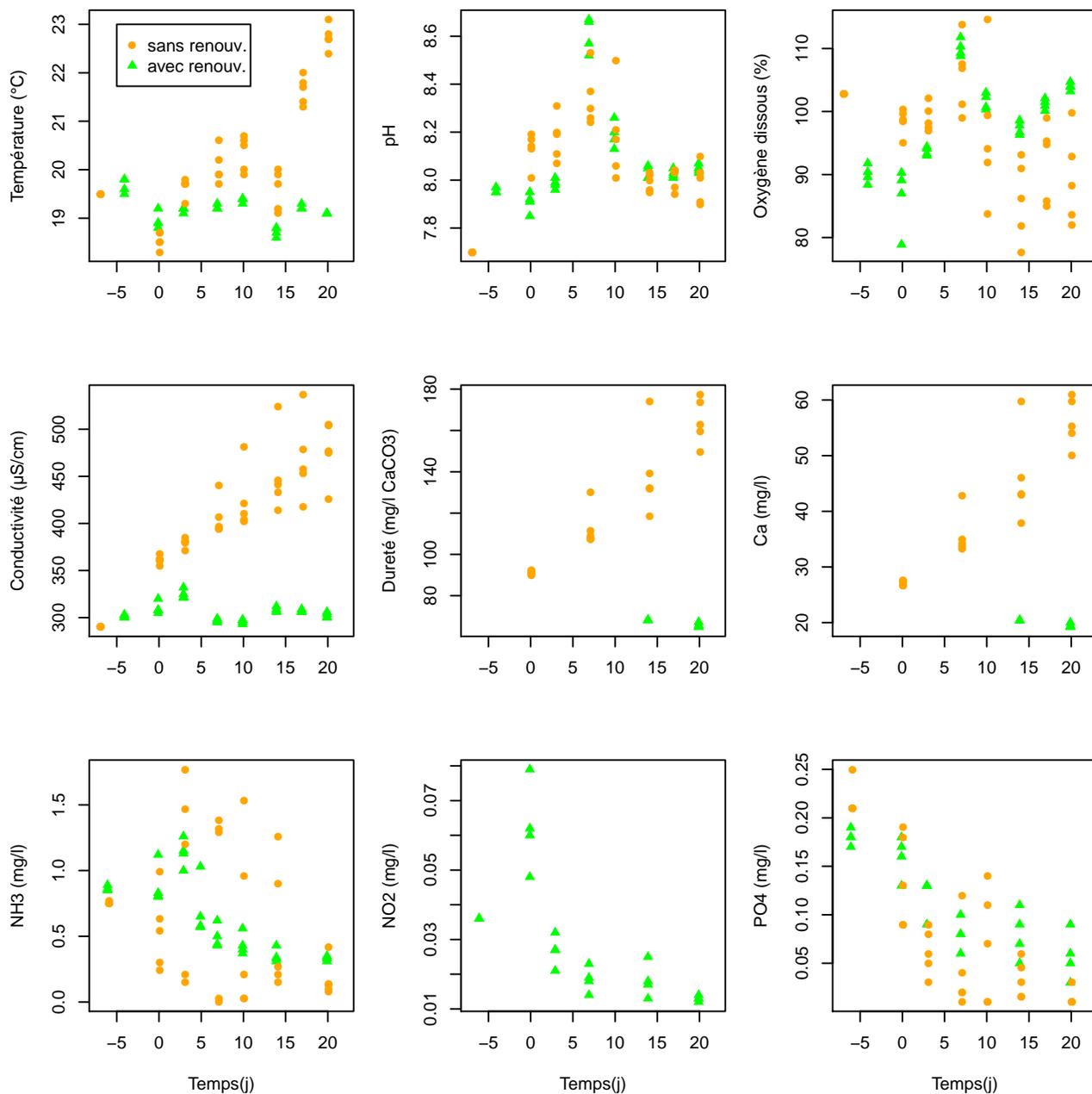


FIGURE 4.13 – Evolution des paramètres physico-chimiques mesurés dans la colonne d'eau des microcosmes témoins sans (S) et avec (D) renouvellement d'eau (points expérimentaux, pas de mesure de NO_2 dans l'expérience S)

bonne représentation de la densité algale, à J8, J9 et J10 ($R \geq 0.99$). Cet effet pourrait être un effet indirect de la toxicité sur les lentilles d'eau, qui sont en compétition avec les algues.

Toutes ces observations semblent montrer que l'ammoniaque non ionisé pourrait avoir un effet direct ou indirect sur le développement des organismes dans les microcosmes témoins, même à nos concentrations. La variabilité de ce paramètre pourrait donc avoir un impact sur la variabilité d'autres paramètres. Ces observations restent néanmoins très ponctuelles et sont à confronter à d'autres résultats. En présence d'un contaminant, il pourrait alors parfois y avoir un effet toxique cumulé du contaminant et de l'ammoniaque. A ce stade, il paraît important de continuer à suivre ce paramètre dans les essais en microcosme afin de pouvoir le prendre en compte dans l'interprétation des résultats.

Essai dynamique

La réplicabilité de la concentration en ammoniaque est bien meilleure lorsque l'eau du microcosme est renouvelée. Dans les témoins de l'essai D, les coefficients de variation à un temps donné sont compris entre 5% et 31%, avec une moyenne de 16%.

4.1.9.2 Effet du cadmium

On n'observe aucun effet significatif du traitement sur la teneur en ammoniaque dans la colonne d'eau dans les essais S et D à partir de J0 (anova, $p > 0.33$).

4.2 Paramètres biotiques

4.2.1 Algues

4.2.1.1 Estimation de la densité algale

Le matériel dont nous disposions ne nous permettait pas de suivre l'évolution exacte de la population de *P. subcapitata*, cependant, des expériences préliminaires ont montré que le nombre de particules en suspension dans la colonne d'eau donne une bonne représentation de la dynamique algale dans la colonne d'eau du microcosme.

Nous avons par exemple réalisé une expérience au LEHNA, dans les mêmes conditions que l'essai S, sauf que nous avons testé 4 eaux différentes : l'eau du réseau (ER), l'eau de nappe (EN) pompée sous le laboratoire, et l'eau reconstituée (EM) réalisée à partir d'eau distillée et d'eau déminéralisée (essai FFE2). Le but de cette expérience était de comparer le développement des organismes dans ces différentes eaux. L'eau de nappe est très pauvre en nutriments. La concentration de particules en suspension au moment du pic de croissance algal (J7) reste inférieure à $5.1 \cdot 10^4$ cel.ml⁻¹ dans les 3 réplicats pour le traitement EN (figure 4.14). Ceci montre bien que les particules en suspension dénombrées lors du pic correspondent principalement à des algues. Le pic correspond à un pic de croissance algale.

Nous avons réalisé une autre expérience préliminaire au CEAEQ avec différentes concentrations de kaolin dans le sédiment artificiel et seulement des organismes benthiques (essai E4). L'objectif était d'évaluer l'impact des hyalelles et des chironomes sur la remise en suspension du kaolin, en

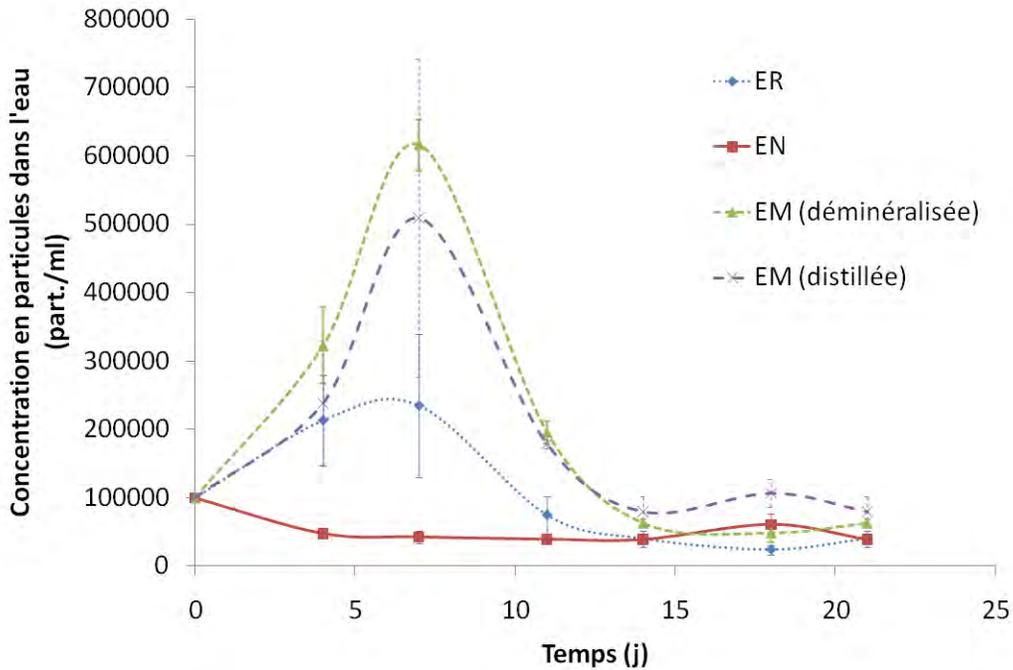


FIGURE 4.14 – Evolution de la concentration en particules en suspension lors de l’essai en microcosme préliminaire FFE2 en fonction de l’eau (ER : eau du réseau, EN : eau de nappe, EM : eau microcosme réalisée à partir d’eau distillée ou déminéralisée ; moyennes et écart-types)

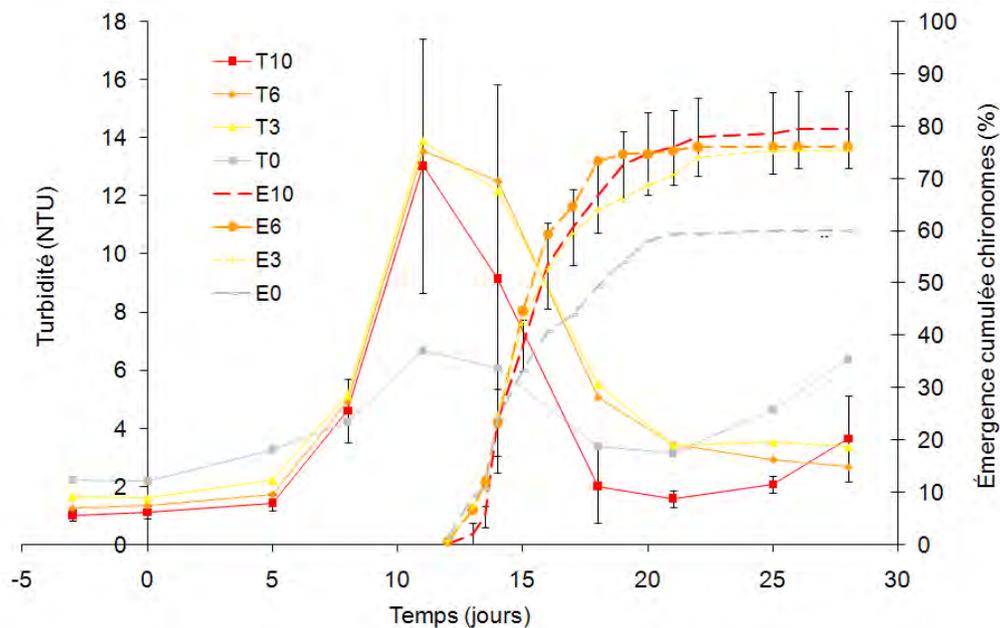


FIGURE 4.15 – Evolution de la turbidité de la colonne d’eau et émergence des chironomes au cours du temps (T : turbidité ; E : émergence ; 10, 6, 3, 0 : pourcentage massique de kaolin présent dans le sédiment pour le traitement considéré ; moyennes et écart-types)

fonction de sa concentration. Nous avons mis en évidence un pic de turbidité dans la colonne d'eau entre J8 et J18 avec un maximum à J10, soit juste avant l'émergence des chironomes (figure 4.15). Il semble donc que la formation des nymphes favorise la remise en suspension de particules du sédiment.

Néanmoins, dans les essais réalisés au LEHNA, nous n'avons pas de kaolin dans la phase sédimentaire. L'essai FFE2 montre qu'avec le sédiment artificiel utilisé et le seuil de mesure retenu, nous dénombrons principalement des cellules algales lors de l'essai. Par contre, il est fort probable que l'activité des chironomes précédant leur émergence favorise la remise en suspension des algues ayant sédimenté. Les particules en suspension dénombrées dans la colonne d'eau correspondraient donc aux algues provenant de la division cellulaire dans l'eau et de la remise en suspension d'algues sédimentées (vivantes et mortes). Il est probable que les algues vivantes remises en suspension dans la colonne d'eau se divisent également.

4.2.1.2 Systèmes témoins

Evolution

Essai statique

Dans l'essai S, on observe une importante augmentation de la densité algale au bout d'une semaine, avec un pic entre J8 et J10 dans les différents microcosmes témoins, puis une diminution (figure 4.16). La concentration moyenne en particules en suspension est de $4.8 \cdot 10^5$ part.ml⁻¹ (CV = 60%) à J10, de $1.5 \cdot 10^4$ part.ml⁻¹ (CV = 66%) à J17 et de $1.1 \cdot 10^4$ part.ml⁻¹ (CV = 31%) à J20. La moyenne des coefficients de variation du nombre de particules en suspension de chaque microcosme témoin au cours du temps est de 107% (CV = 7%). Ce paramètre n'est pas du tout stable dans les microcosmes statiques.

Interactions

Les algues sont soumises à de nombreuses interactions dans les microcosmes schématisées sur la figure 4.17 et dans le modèle conceptuel de la dynamique algale réalisé avec Velluet [172] à partir de la dynamique des systèmes (figure 4.18). Elles se développent grâce à (1) l'énergie lumineuse, (2) le CO₂ contenu dans l'eau en équilibre avec l'atmosphère et issu de la respiration des invertébrés ainsi que (3) les nutriments contenus dans l'eau et issus de la dégradation de la matière organique par les bactéries. Elles sédimentent au cours de l'essai, mais, comme nous l'avons vu, les invertébrés en remettent une partie en suspension dans la colonne d'eau par leurs mouvements. Elles sont en compétition avec les lentilles d'eau pour les nutriments. Elles sont broutées par les consommateurs primaires : par les daphnies dans la colonne d'eau et par l'ensemble des invertébrés à la surface du sédiment.

L'évolution de la densité algale dans la colonne d'eau découle de la combinaison variable de ces interactions. Le pic de densité peut être expliqué par une importante croissance, un faible broutage et une remise en suspension par les organismes benthiques. La diminution de la densité algale en fin d'expérience pourrait provenir de :

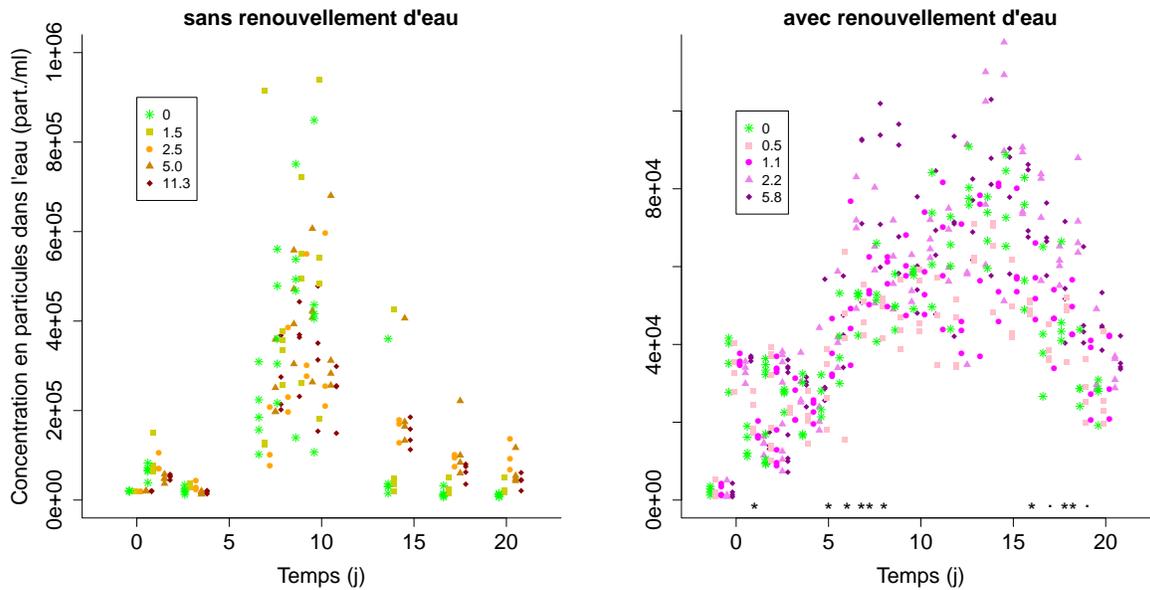


FIGURE 4.16 – Evolution du nombre de particules en suspension dans la colonne d’eau des microcosmes (seuil du compteur de particules : 3.2) au cours des essais sans et avec renouvellement d’eau en fonction de la concentration moyenne en cadmium dans le microcosme durant la période d’exposition (points expérimentaux et différences significatives entre traitements représentées par des étoiles)

- une diminution de la croissance algale due à l’épuisement en éléments nutritifs (le phosphore devient probablement limitant),
- une augmentation du broutage par les consommateurs primaires du fait de l’augmentation de la taille des organismes et de la reproduction des daphnies,
- une diminution de la remise en suspension des algues par les organismes benthiques.

Dans les témoins de l’essai S, on observe une faible corrélation négative entre le nombre de fronde à Jx et la concentration en particules à Jx (pour tout x, $|R| < 0.34$), qui va dans le sens d’une compétition entre algues et lentilles d’eau.

Il existe une corrélation négative moyenne entre le nombre de daphnies mères et la concentration en particules à Jx : $R = -0.61$ à J7 et $|R| < 0.37$ entre J10 et J17. La consommation des algues par les daphnies semble donc en partie contrôler la croissance algale avant J10.

Il existe également une corrélation forte entre le nombre de chironomes émergent total et la concentration en particules au cours de l’essai. Ce qui peut paraître surprenant, c’est que cette corrélation est également négative. On peut supposer que plus il y a de chironomes, plus les algues sédimentées sont consommées et moins le nombre d’algues remises en suspension est important. Cette corrélation est supérieure à 0.82, en valeur absolue, entre J7 et J17. Elle est même de -1.0 à J14, lorsque les larves de chironomes atteignent leur taille maximale. Par contre, elle est seulement de -0.55 à J21, lorsque tous les chironomes ont émergés depuis plusieurs jours (fin des émergences à J17, sauf un chironome à J19).

Enfin, il existe une faible corrélation entre le nombre de hyalelles vivantes à la fin de l’essai et la concentration en particules au cours de l’essai. Par contre, cette corrélation est positive à partir

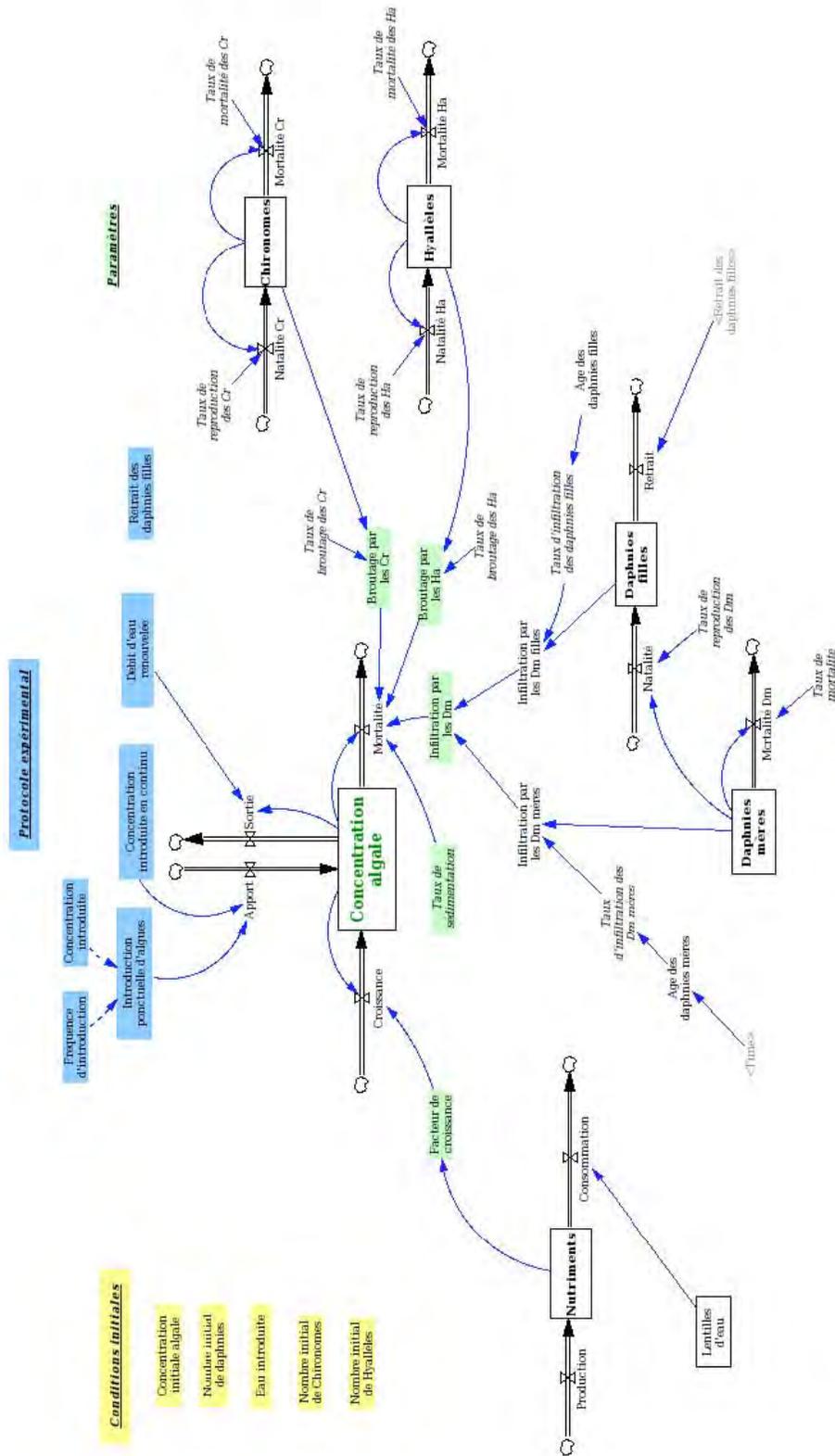


FIGURE 4.18 – Modèle conceptuel de la dynamique algale au sein des microcosmes [172]

de J10. La corrélation est de 0.41 à J10. Dans les microcosmes contaminés, on observe également une corrélation positive entre le nombre de hyalles vivantes et la concentration en particules à J10 ($R = 0.62, 0.80$ et 0.91 pour $C_m = 1.5, 2.5$ et $5.0 \mu\text{g.l}^{-1}$ de Cd). C'est à dire que l'influence des hyalles serait plus liée à la remise en suspension des algues qu'à leur consommation, qui serait négligeable par rapport à celle des autres invertébrés (chironomes mais aussi daphnies, surtout en fin d'essai puisque la colonne d'eau est épuisée). On peut donc supposer qu'il y a une diminution de la remise en suspension des algues, due à la diminution de la bioturbation par les chironomes au fur et à mesure des émergences mais aussi la diminution des algues à la surface du sédiment, liée à une augmentation du broutage par les invertébrés.

Essai dynamique

La densité algale est deux fois plus constante dans le temps avec renouvellement d'eau (figure 4.16). La moyenne des coefficients de variation du nombre de particules en suspension de chaque microcosme témoin au cours du temps est de 46% (CV = 6%).

La densité maximale atteinte dans les témoins, de $9.1 \cdot 10^4 \text{ part.ml}^{-1}$, est presque 10 fois plus faible que dans l'essai S. Ce maximum est atteint à J13 et non J10, comme dans l'essai S. Nous pourrions expliquer ce décalage par le fait que l'émergence des chironomes est retardée de 3 jours dans l'essai D par rapport à l'essai S.

La concentration en particules moyenne à J13 est de $8.1 \cdot 10^4 \text{ part.ml}^{-1}$ (CV = 8%). Par contre, elle est de $2.7 \cdot 10^4 \text{ part.ml}^{-1}$ (CV = 19%) à J20, soit 2.5 fois plus importante que dans l'essai S. L'amplitude de variation de la densité algale est donc moins importante lorsque l'eau est renouvelée. On peut supposer que cette différence est principalement expliquée par l'évacuation d'algues en suspension avec l'eau. On peut également supposer que le broutage des algues par les daphnies est plus important que dans l'essai S, car la survie, la croissance et la reproduction des daphnies est meilleure dans l'essai D (section 4.2.3). Néanmoins, malgré l'évacuation et l'important broutage des algues, il reste plus de particules en suspension à la fin de l'essai D. On peut supposer que ceci est dû au fait que tous les chironomes n'ont pas émergé à J20 et surtout à l'apport en continu de nutriments, qui peut favoriser la croissance algale.

Répliquabilité

Dans l'essai S, la concentration en particules en suspension est très variable, surtout à la fin du pic, à J14. Le coefficient de variation moyen des témoins est alors de 158%. Le coefficient de variation moyen des témoins sur l'ensemble des jours est de 55% (ET = 41%, CV = 73%).

La densité algale est beaucoup moins variable entre répliquats avec le renouvellement continu de l'eau (figure 4.16). Dans l'essai avec renouvellement d'eau D, le coefficient de variation de la densité algale maximal est de 35% à J17. Le coefficient de variation moyen des témoins sur l'ensemble des jours est de 18% (ET = 8%, CV = 46%). Le renouvellement d'eau améliore nettement la répliquabilité de ce paramètre.

4.2.1.3 Effet du cadmium

Evolution

Essai statique

Dans l'expérience sans renouvellement d'eau S, aucun effet du cadmium sur l'évolution de la concentration algale n'a pu être mis en évidence.

On aurait pu s'attendre à observer un effet, car les concentrations à J0 sont comprises entre 3.0 et 22.1 $\mu\text{g.l}^{-1}$ et les concentrations moyennes sur la période d'exposition (J0 - J21) sont entre 1.5 et 11.3 $\mu\text{g.l}^{-1}$, concentrations auxquelles on observe un effet dans des tests mono-spécifiques. Des EC50 ont pu être estimées à 7.0 et 9.2 $\mu\text{g.l}^{-1}$ lors d'essais mono-spécifiques préliminaires (fonction drm, package drc, modèle logistique à 3 paramètres). Ces résultats sont en concordance avec les EC50 estimées dans le même milieu au CEAEQ en 2005, lors du développement du test d'inhibition de la croissance algale ($9.3 \pm 2.0 \mu\text{g.l}^{-1}$, non publié) et par Maloney [113] (9.4 $\mu\text{g.l}^{-1}$ avec $\text{IC}_{95\%}$: [8.8 - 10.0 $\mu\text{g.l}^{-1}$]).

Ce résultat peut être en partie expliqué par la différence de composition du milieu d'essai algues du CEAEQ [42] utilisé pour les tests mono-spécifiques et du milieu microcosme utilisé pour l'essai multi-spécifique. En effet, comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, la toxicité du cadmium dépend notamment de la spéciation dans le milieu, qui varie avec la composition.

Il se pourrait également que la diminution de la croissance des algues en présence de cadmium soit compensée par la diminution de la prédation dans les systèmes contenant du cadmium. En effet, les algues, organismes à la base de la chaîne alimentaire, sont en interaction forte avec les autres espèces. Or ces interactions, en particulier la prédation par les invertébrés, peuvent être affectées par la présence de cadmium. En effet, les algues sont consommées par les daphnies, les hyalles et les chironomes, dont la survie diminue lorsque la concentration en cadmium augmente. La population de *D. magna* dans les systèmes est donc beaucoup moins importante pour les fortes concentrations en cadmium. De plus, Taylor *et al.* [158] montrent que le cadmium affecte le taux d'ingestion des algues par les daphnies en présence d'algues contaminées à partir d'une concentration totale en cadmium de 2.5 $\mu\text{g.l}^{-1}$. D'après Taylor *et al.* [158], les causes seraient une contamination du système digestif ou une interférence avec les mécanismes de nutrition, comme une inhibition de la filtration ou le rejet de la nourriture collectée.

L'absence d'effet significatif peut également être expliquée par la forte variabilité de la densité algale dans l'essai S.

Essai dynamique

Dans l'expérience avec renouvellement d'eau, on peut mettre en évidence un effet du cadmium sur la concentration algale à plusieurs temps (anova : $p(\text{J1}) = 0.017$, $p(\text{J5}) = 0.023$, $p(\text{J6}) = 0.029$, $p(\text{J7}) = 0.0049$, $p(\text{J8}) = 0.015$, $p(\text{J16}) = 0.035$, $p(\text{J17}) = 0.059$, $p(\text{J18}) = 0.0097$, $p(\text{J19}) = 0.088$).

Un premier élément d'explication est que la concentration algale est beaucoup moins variable entre réplicats avec renouvellement d'eau que dans l'expérience statique. De plus, les concentrations testées sont plus faibles que dans l'essai statique (0.5 à 5.8 $\mu\text{g.l}^{-1}$ en moyenne sur la durée d'exposition) et à ces concentrations, l'effet du cadmium sur la croissance algale est faible, d'après les essais

mono-spécifiques [106].

Par contre, on observe un effet de cette gamme de concentrations en cadmium sur la survie, le développement et la reproduction des daphnies ainsi que la croissance des lentilles d'eau. On peut donc supposer qu'il y a un effet indirect du cadmium sur les algues.

Dans les systèmes, on observe plusieurs tendances des concentrations moyennes. Dans les essais en microcosme, il est difficile d'évaluer l'effet direct du cadmium sur les algues étant donné les nombreuses interactions qu'il existe avec les autres organismes et le milieu. L'effet observé peut être dû à un effet direct sur les algues auquel il faut ajouter des effets indirects en lien avec la prédation par les consommateurs primaires et la compétition avec les lentilles d'eau. Plus les systèmes évoluent, plus les interactions se complexifient et moins l'interprétation des résultats est évidente.

A J5 et J6, on observe que la densité algale moyenne augmente légèrement avec la concentration en cadmium dans les systèmes. C'est également le cas à J7 et J8, sauf pour la concentration en cadmium la plus basse. On peut donc supposer que, dans cette première phase, l'effet direct du cadmium sur les algues (inhibition de la croissance avec la concentration en cadmium) est légèrement négligeable devant l'effet indirect en lien avec la prédation ou la compétition (augmentation de la croissance avec la concentration en cadmium). On peut également supposer que le principal effet indirect lors de cette première phase est lié à la croissance des lentilles d'eau. En effet, lors de la première semaine d'exposition, la croissance des lentilles d'eau est affectée par le cadmium. Le prélèvement de nutriments dans le milieu en présence de cadmium est donc moins important ce qui peut favoriser la croissance des algues. D'un autre côté, lors de cette première semaine, la survie des daphnies n'est pas encore affectée et les daphnies n'ont pas encore atteint leur maturité sexuelle, donc il n'y a pas de variation de la population de daphnies d'un microcosme à l'autre. Par contre, on peut que supposer le taux d'ingestion des algues par les daphnies est légèrement réduit à ces concentrations [158].

Après J12, la croissance moyenne des algues est plutôt inhibée par rapport aux témoins, aux faibles concentrations en cadmium alors qu'elle est plutôt favorisée aux plus fortes concentrations. Ce résultat peut être expliqué par des combinaisons variables d'effets aux conséquences contradictoires que sont l'inhibition directe de la croissance des algues par le cadmium d'une part et la diminution de la prédation par les invertébrés ainsi que de la compétition avec les lentilles d'eau - qui entraînent une augmentation de la densité algale - d'autre part. Suivant le poids de chaque inhibition, la position du témoin par rapport aux autres traitements varie.

Répliquabilité

Le cadmium n'augmente pas la variabilité de la densité algale entre réplicats à un jour donné. Dans l'essai S, le coefficient de variation moyen sur l'ensemble des traitements et l'ensemble des jours est de 44% (ET = 31%, CV = 71%) alors qu'il est de 19% (ET = 11%, CV = 56%) dans l'essai D. Dans l'essai S, il n'y a pas de différence significative de variabilité entre les coefficients de variation en fonction de la concentration en cadmium (anova, $p = 0.08$).

4.2.2 Lentilles d'eau

4.2.2.1 Systèmes témoins

Evolution

Essai statique

Le nombre de frondes moyen à J21 dans les microcosmes statiques témoins est de 96 (CV = 35%).

Dans la thèse de Triffault-Bouchet [160], le nombre moyen de frondes atteint à J30 dans les microcosmes témoins de 5 expériences était de 91 (CV = 53%).

Dans 4 des microcosmes statiques témoins, la croissance des lentilles d'eau suit un modèle logistique. On observe une phase d'accélération de l'augmentation de la taille de la population, un point d'inflexion puis une phase de décélération. On peut supposer que dans les microcosmes statiques, la croissance est limitée par l'épuisement progressif en éléments nutritifs, en particulier en phosphore. Le jour auquel le point d'inflexion est atteint varie suivant les systèmes. Dans un système, la croissance n'est pas limitée, le point d'inflexion n'est pas atteint au cours des 21 jours de l'essai, la croissance reste dans la phase exponentielle.

On montre qu'il existe une forte corrélation positive entre la concentration en orthophosphate à J14 et le nombre de frondes à partir de J14 ($R = 0.70, 0.98, 0.96$ à J14, J17 et J21). Ceci semble bien confirmer l'hypothèse d'une limitation de la croissance des lentilles d'eau par le phosphore dans certains microcosmes à partir de J14.

Il existe également une forte corrélation positive entre la concentration en ammonium et le nombre de frondes. Cette corrélation est croissante au cours de l'essai : $R = 0.67, 0.81$ et 0.91 à J7, J10 et J21 respectivement. La croissance des lentilles d'eau est donc favorisée en fin d'essai par la présence d'éléments nutritifs.

Interactions

Nous ne pouvons pas mettre directement en évidence la compétition entre les algues et les lentilles d'eau car nous n'avons pas de mesure directe de la croissance algale. Néanmoins, on observe par exemple une forte corrélation positive entre le nombre de daphnies et le nombre de frondes au début de l'essai ($R = 0.87$ à J7). Dans une expérience préliminaire, réalisée au CEAEQ avec seulement les organismes pélagiques dans l'eau (E2), on remarquait que la croissance des lentilles d'eau était plus importante dans les systèmes contenant des daphnies que dans ceux qui en étaient dépourvus. Cette corrélation est sûrement en lien avec le contrôle de la population algale par les daphnies.

Szabo et ses collaborateurs montrent qu'il existe une compétition entre les algues et les lentilles d'eau [154]. Les espèces étudiées ne sont pas les mêmes que celles utilisées dans les essais en microcosme, mais il est vraisemblable que les mécanismes de compétition soient similaires. D'après Szabo *et al.* [154], la croissance de *Lemna gibba* est fortement inhibée par différentes espèces d'algues unicellulaires (*Scenedesmus conspicua*, *Chlorella sp.*, *Chlamydomonas sp.*). La chlorophylle contenue dans les frondes diminue également en présence d'algues. Cette inhibition est principalement due (1) à la consommation par les algues de certains éléments nutritifs majeurs (N et P) et des éléments

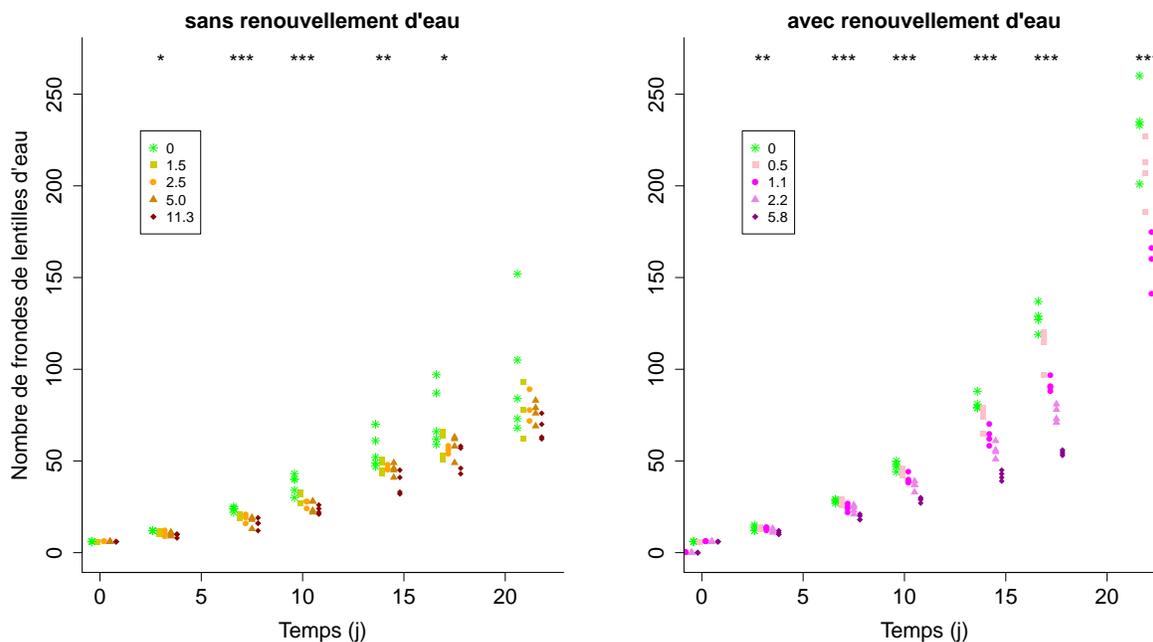


FIGURE 4.19 – Evolution du nombre de frondes total de lentilles d'eau au cours des essais sans et avec renouvellement d'eau en fonction de la concentration moyenne en cadmium dans le microcosme durant la période d'exposition (points expérimentaux et différences significatives entre traitements représentées par des étoiles)

traces (Fe et Mn) ainsi que (2) à l'augmentation du pH induite par l'activité photosynthétique des algues. Ils classent les sources d'inhibition de la croissance des lentilles ainsi :

Réduction N > augmentation pH > réduction P > réduction Fe > réduction Mn

L'impact des algues sur la croissance des lentilles est plus important lorsque la croissance algale n'est pas favorisée, par exemple dans les milieux peu chargés en azote ou lorsque la luminosité est faible.

Essai dynamique

Le nombre de frondes moyen à J21 dans les microcosmes dynamiques témoins est de 232 (CV = 10%). La croissance des lentilles d'eau est donc plus de 2 fois plus importante avec renouvellement d'eau que dans les systèmes statiques (figure 4.19). On peut mettre en évidence un effet significatif du renouvellement d'eau sur le nombre de frondes et la longueur des racines de lentilles d'eau à J21 (test de Wilcoxon, $p = 0.016$ et $p = 0.019$ respectivement). On peut supposer que le renouvellement d'eau permet principalement de limiter l'épuisement du milieu en éléments nutritifs et en particulier en phosphore. Le renouvellement de l'eau permet également d'évacuer des substances qui pourraient s'accumuler dans l'eau et ainsi limiter la croissance des lentilles d'eau. L'éclairage plus important dans l'expérience avec renouvellement de l'eau a également pu favoriser la croissance des lentilles d'eau.

Comparaison aux essais monospécifiques

La croissance des lentilles témoins est plus faible dans l'essai S que dans les essais monospécifiques. A J10, le nombre de frondes atteint une moyenne de 165 dans les témoins d'un essai monospécifique préliminaire, alors qu'il n'est que de 37 dans les microcosmes témoins au cours de l'expérience S. Ceci peut être expliqué par une concentration en éléments nutritifs disponibles pour les lentilles d'eau plus faible dans les essais en microcosme par rapport à l'essai monospécifique.

Répliquabilité

Dans l'essai S, la variabilité du nombre de frondes témoins, à chaque jour de mesure, augmente presque linéairement avec le temps.

La variabilité à J10 est plus faible dans l'essai monospécifique préliminaire FLm ($CV = 1\%$) que dans l'essai en microcosme S ($CV = 14\%$). La plus grande variabilité dans l'essai en microcosme peut être expliquée par la plus grande complexité et le plus grand nombre d'interactions dans le système.

Par contre, la croissance des lentilles d'eau est beaucoup moins variable lorsque l'eau est renouvelée. A J21, le coefficient de variation du nombre total de frondes est de 10% avec renouvellement d'eau et de 35% sans renouvellement. Si l'on admet qu'il existe une compétition entre les lentilles d'eau et les algues, au détriment des lentilles d'eau, on peut émettre l'hypothèse que la stabilisation de la densité algale contribue à la diminution de la variabilité de la croissance des lentilles d'eau.

4.2.2.2 Effet du cadmium

Nous avons suivi différents paramètres pour évaluer l'effet du cadmium sur la croissance des lentilles d'eau : le nombre de frondes au cours du temps ainsi que la masse fraîche, la surface des frondes et la longueur des racines à la fin de l'essai (figures 4.20 et 4.21).

Nous avons estimé les NOEC et EC50 à la fin des expériences S et D en fonction des concentrations nominales (C), des concentrations moyennes mesurées à J0 (C_0) et des concentrations moyennes mesurées durant la phase d'exposition des organismes (C_m) (tableau 4.5).

Essai statique

Dans l'essai en microcosme statique, aucun effet significatif du cadmium sur le nombre de frondes de lentilles d'eau n'a pu être mis en évidence en fin d'essai (anova, $p = 0.30$). Par contre, nous avons pu mettre en évidence un effet très significatif sur les autres traits dès la première concentration testée ($C_m = 1.5 \mu\text{g.l}^{-1}$), que l'on considère la relation dose-réponse monotone ou non (test de Williams ou Dunnett), excepté pour la surface des frondes.

Il n'a été possible d'estimer une EC50 avec le modèle logistique à 3 paramètres que pour le paramètre longueur des racines. L'importante variabilité des autres paramètres dans les systèmes témoins pourrait expliquer ce résultat. Les coefficients de variation dans les systèmes témoins sont respectivement de 35%, 31% et 36% respectivement pour le nombre de frondes, la masse fraîche totale et la surface des frondes alors qu'il n'est que de 12% pour le paramètre longueur maximale des racines. La EC_{m50} à J21 a été estimée à $4.3 \mu\text{g.l}^{-1}$.

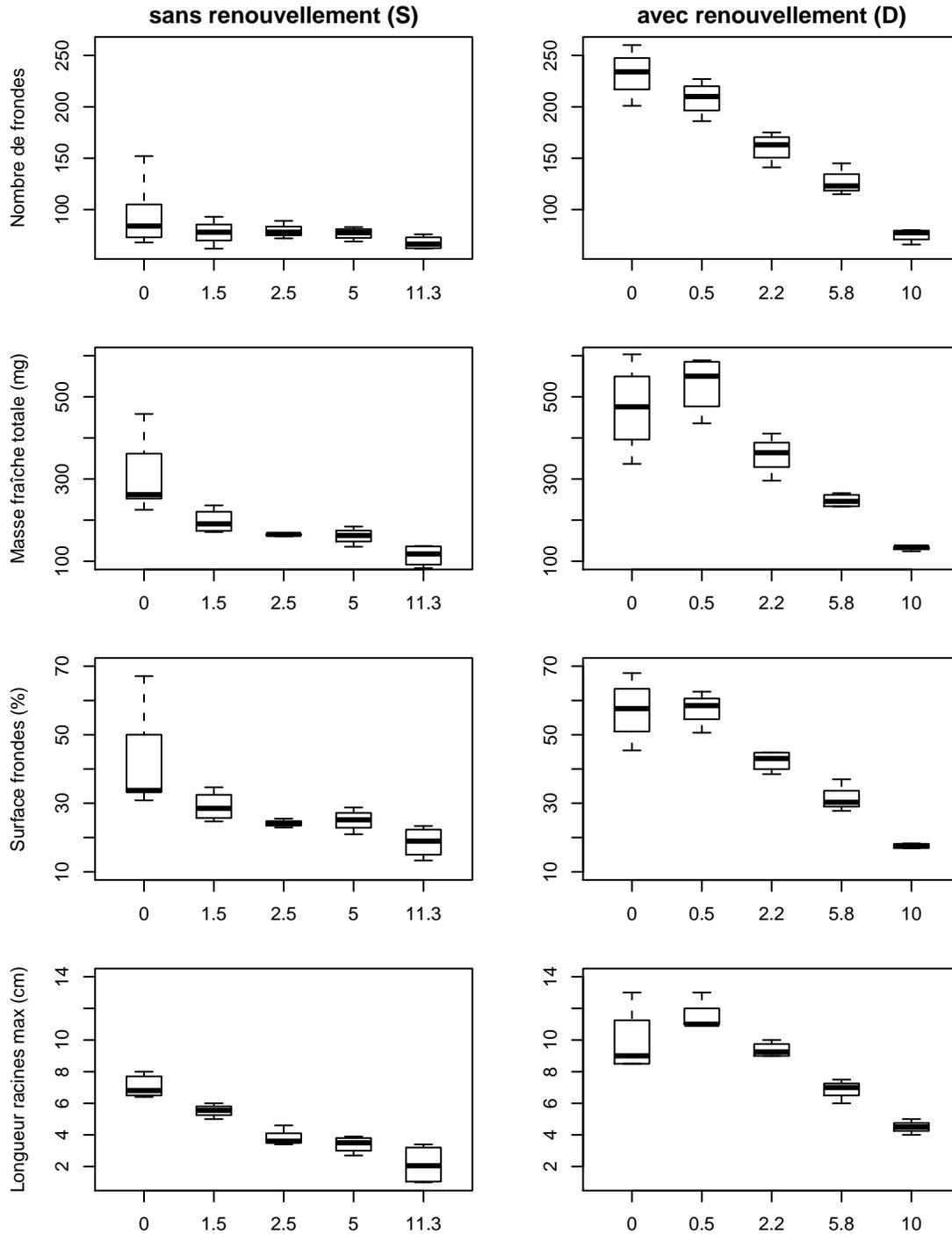


FIGURE 4.20 – Effet de la concentration moyenne en cadmium dans l'eau mesurée pendant la période d'exposition ($\mu\text{g.l}^{-1}$) sur la croissance des lentilles d'eau (nombre de frondes, masse fraîche totale, surface couverte par les frondes et longueur maximale de racines) à la fin des essais en microcosme statique (S) et avec renouvellement d'eau (D) (boxplot)

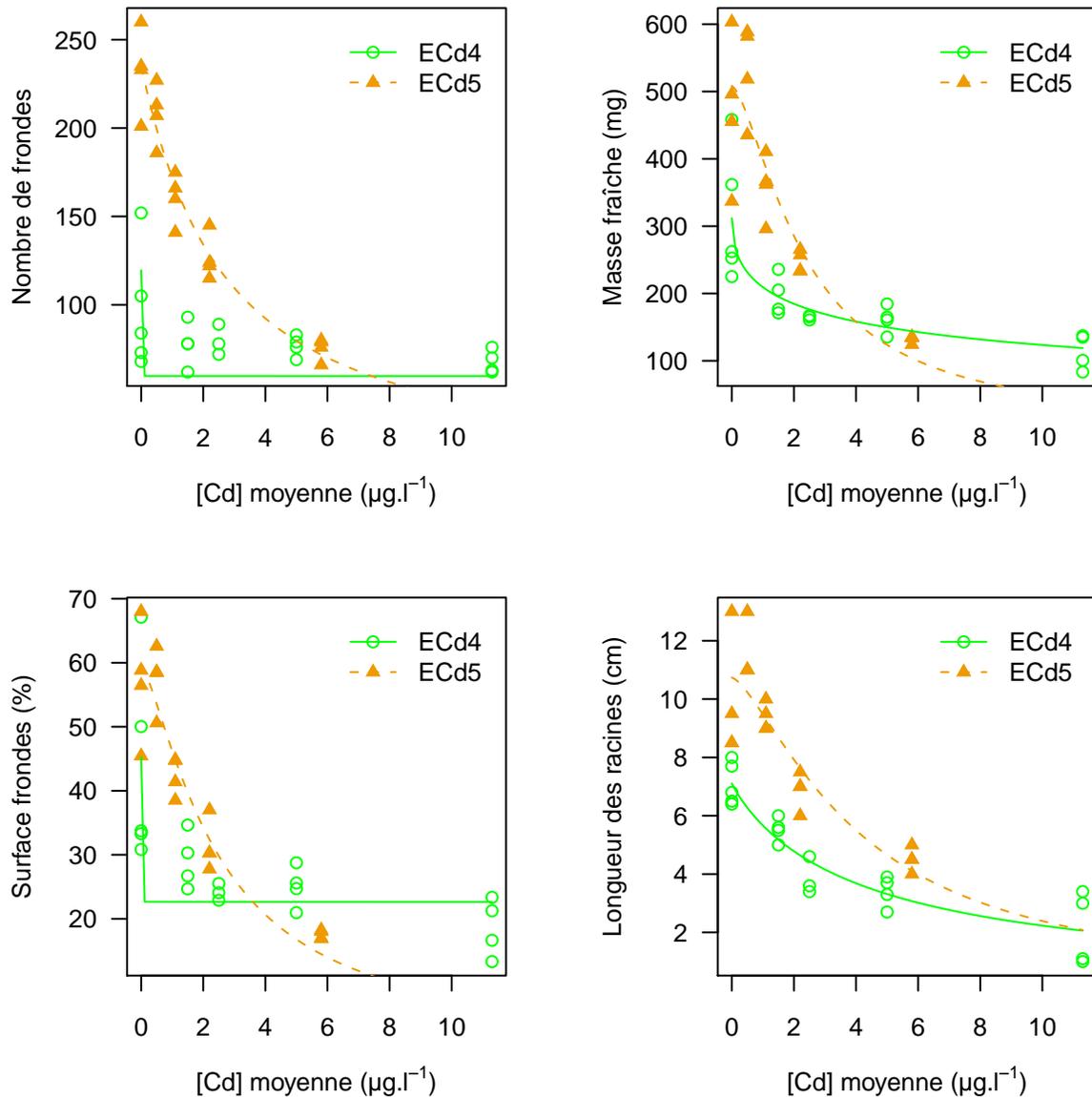


FIGURE 4.21 – Inhibition de la croissance des lentilles d’eau (nombre de frondes, masse fraîche totale, surface couverte par les frondes et longueur maximale des racines) à la fin des essais en microcosme statique (S = ECd4) et avec renouvellement d’eau (D=ECd5), en fonction de la concentration moyenne mesurée dans l’eau pendant la période d’exposition (points expérimentaux et modèles logistiques à 3 paramètres)

TABLE 4.5 – Effet du cadmium sur la croissance des lentilles d'eau (nombre de frondes, masse fraîche totale (mg), surface couverte par les frondes (%)) et longueur maximale des racines (cm) à la fin des essais en microcosme statique (S) et avec renouvellement d'eau (D) (concentrations en $\mu\text{g.l}^{-1}$)

essai		test	transfo.	NOEC	NOEC ₀	NOEC _m	EC50	EC ₀ 50	EC _m 50
S	Nb frondes	anova	-	≥ 80	≥ 22.1	≥ 11.3	-	-	-
	Masse fraîche	Dunnett	-	≤ 10	≤ 3.0	≤ 1.5	-	-	-
		William		≤ 10	≤ 3.0	≤ 1.5			
	Surface frondes	Dunnett	log	10	3.0	1.5	-	-	-
		William		≤ 10	≤ 3.0	≤ 1.5			
	Longueur racines	Dunnett	-	≤ 10	≤ 3.0	≤ 1.5	32.4	9.1	4.3
		William		≤ 10	≤ 3.0	≤ 1.5			
D	Nb frondes	Dunnett	-	1.25	0.7	0.5	5.5	3.7	2.6
		William		≤ 1.25	≤ 0.7	≤ 0.5			
	Masse fraîche	Dunnett	-	2.5	1.6	1.1	5.0	3.5	2.4
		William		≤ 1.25	≤ 0.7	≤ 0.5			
	Surface frondes	Dunnett	-	1.25	0.7	0.5	5.5	3.8	2.5
		William		≤ 1.25	≤ 0.7	≤ 0.5			
	Longueur racines	Dunnett	log	2.5	1.6	1.1	7.8	5.4	4.1
		William		1.25	0.7	0.5			

TABLE 4.6 – Concentrations d'effet du cadmium sur les lentilles d'eau dans les essais mono-spécifiques. NOEC et LOEC (anova et test de Dunnett, transfo : transformation des données), EC10, EC20, EC50, en $\mu\text{g.l}^{-1}$ (modèle logistique à 3 paramètres, erreur standard entre parenthèse)

Paramètre	J	labo	exp.	transfo	NOEC	LOEC	EC10	EC20	EC50
nb frondes	7	CEAEQ	1	-	200	400	101 (62)	169 (75)	410 (102)
		LSE	1	log	100	200	77 (38)	132 (47)	326 (64)
	10	CEAEQ	1	-	200	400	109 (25)	160 (27)	305 (29)
		CEAEQ	2	\sqrt{d}	< 50	≤ 50	54 (12)	80 (13)	158 (12)
		LSE	1	log	100	200	107 (19)	150 (19)	265 (16)
masse fraîche	10	CEAEQ	1	-	50	100	44 (13)	67 (15)	136 (21)
		CEAEQ	2	-	100	200	92 (15)	111 (13)	155 (10)
masse sèche	10	CEAEQ	1	-	200	400	108 (36)	153 (38)	277 (40)
		CEAEQ	2	-	100	200	75 (16)	101 (15)	167 (13)
		LSE	1	-	50	100	92 (17)	135 (18)	256 (18)

Selon les expériences réalisées par Bishop et Perry [22], pour 4 polluants sur 5, dont le cuivre, la longueur des racines est le paramètre le plus sensible. Mais ils soulignent qu'utiliser ce paramètre pour estimer la croissance des lentilles d'eau génère plusieurs problèmes. Cette mesure est chronophage et difficile à réaliser étant donnée la fragilité des racines de *Lemna minor*. De plus ils soulèvent la question du rôle fonctionnel de la racine dans la croissance des lentilles d'eau, car il a été montré que les frondes peuvent capter des nutriments directement et les lentilles peuvent croître dans des milieux qui bloquent la croissance des racines. Ils remettent également en cause l'évaluation de la croissance des lentilles par pesée, l'écart reflétant, selon eux, souvent une différence de teneur en amidon plutôt qu'une différence de croissance. Les mesures les plus sûres pour estimer la croissance des lentilles seraient donc le nombre (ou la surface) des frondes.

Dans l'essai S, on observe également un effet du cadmium sur la réplicabilité du nombre de frondes dans les microcosmes en fin d'essai. A J21, le coefficient de variation du nombre de frondes pour les différents traitements décroît de 35% à 7% à mesure que la concentration nominale en cadmium augmente.

Essai dynamique

Dans l'essai en microcosme avec renouvellement d'eau, nous avons pu mettre en évidence un effet très significatif du cadmium sur l'ensemble des paramètres mesurés sur les lentilles d'eau à J22 à partir de concentrations moyennes comprises entre 0.5 et 2.2 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Les figures 4.22 et 4.23 mettent bien en évidence l'effet du cadmium sur la surface couverte par les frondes. La longueur des racines est, dans cette expérience, le paramètre le moins sensible ($EC_{m50} = 4.1 \mu\text{g.l}^{-1}$ de Cd). A la fin de l'essai D, le nombre de frondes ($EC_{m50} = 2.6 \mu\text{g.l}^{-1}$ de Cd), la surface des frondes ($EC_{m50} = 2.4 \mu\text{g.l}^{-1}$ de Cd) et la masse fraîche ($EC_{m50} = 2.5 \mu\text{g.l}^{-1}$ de Cd) sont des paramètres aussi sensibles.

Essais mono-spécifiques

Des essais mono-spécifiques d'inhibition de la croissance des lentilles d'eau par le cadmium ont été réalisés dans les deux laboratoires (essais Lm1 et Lm2 au CEAEQ et FLm au LEHNA). Les paramètres suivis étaient le nombre de frondes au cours du temps et la masse sèche au temps final (J10). Au CEAEQ, la masse fraîche finale a également été mesurée. La masse par fronde a été calculée à partir des mesures précédentes. Nous avons également observés, lors des différentes expériences, que le cadmium affectait la longueur des racines des lentilles d'eau. Mais ce paramètre n'a pas été suivi quantitativement dans les essais mono-spécifiques. Il a par contre été mesuré dans les essais en microcosme.

Le tableau 4.6 rassemble les valeurs des NOEC, LOEC et EC10, EC20, EC50 estimées pour différentes expériences. Ces valeurs ont été déterminées à partir de la concentration nominale en cadmium dans l'eau.

L'effet du cadmium sur la masse sèche moyenne par fronde ne peut être modélisé de la même manière que les autres paramètres biologiques afin de calculer une EC50.

Les EC50 (J10) estimées pour l'ensemble de ces expériences et des paramètres mesurés sont comprises entre 136 et 305 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de Cd. Drost *et al.* [62] estiment la EC50 (J7) à 214 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de Cd

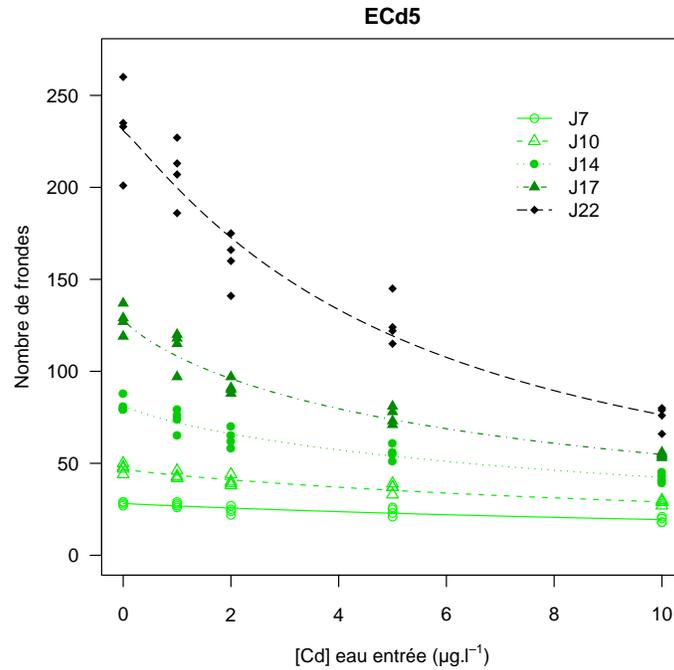


FIGURE 4.22 – Inhibition de la croissance des lentilles d’eau dans les microcosmes avec renouvellement d’eau (D) en fonction de la concentration nominale en cadmium dans l’eau entrante (points expérimentaux et modèle logistique à 3 paramètres)

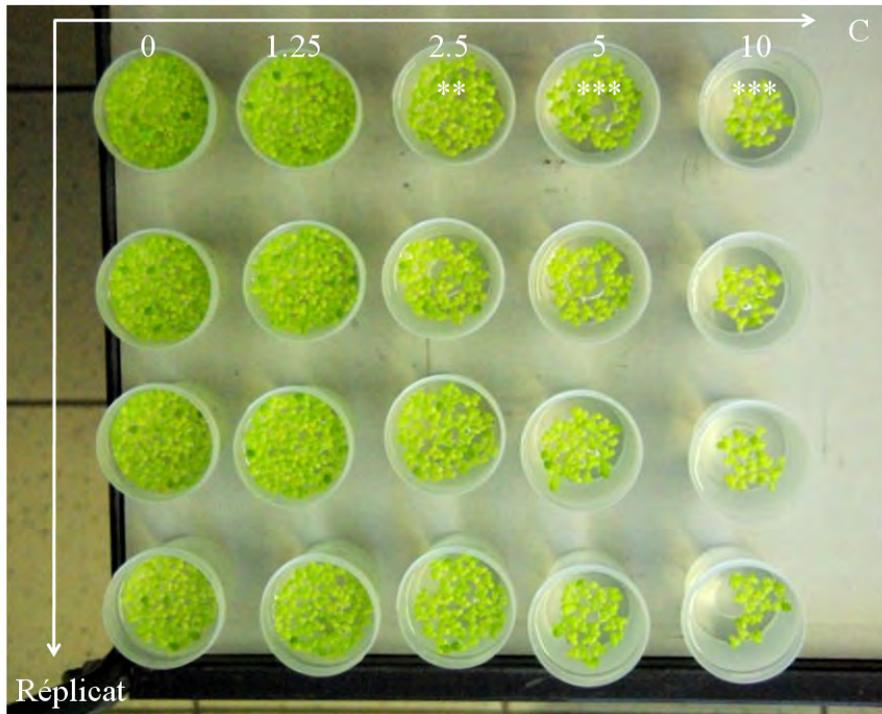


FIGURE 4.23 – Photographie montrant l’impact du cadmium (C : concentration nominale en cadmium en µg.l⁻¹) sur la croissance des lentilles d’eau à la fin (J22) de l’expérience avec renouvellement d’eau D

et Kwan et Smith [105] estiment la EC50 (J10) à $169 \mu\text{g.l}^{-1}$ de Cd. Ces concentrations d'effet sont comprises dans l'intervalle des valeurs issues de nos expériences.

Influence de l'exposition

Il peut paraître surprenant que le cadmium ait un effet à des concentrations bien plus faibles dans les essais en microcosme que dans les essais mono-spécifiques. La différence de concentration d'effet peut tout d'abord être expliquée par la différence de durée d'exposition. En effet, l'expérience D confirme que l'effet du cadmium sur le nombre de frondes évolue avec la durée d'exposition (figure 4.22). Les EC50 à J7, J10, J14, J17 et J22 sont respectivement de 22.8, 17.1, 11.0, 7.1 et $5.3 \mu\text{g.l}^{-1}$ (modèle logistique à 3 paramètres corrigé). Or les essais mono-spécifiques standards de toxicité chronique sur les lentilles d'eau n'ont été réalisés que sur 10 jours.

Cependant, cet argument n'est pas suffisant pour expliquer les écarts observés entre les essais mono-spécifiques et les essais en microcosme. Les écarts peuvent être expliqués par une différence d'exposition des lentilles et notamment une différence de spéciation du cadmium dans le milieu. Dans l'essai mono-spécifique, le milieu SIS contient de l'EDTA. Or il a été montré que l'EDTA diminuait la sensibilité des essais en complexant une partie des métaux [58]. Un calcul de spéciation permettrait d'estimer la concentration en ions Cd^{2+} libres dans le milieu SIS pour chaque traitement. Les NOEC des différentes expériences seraient probablement beaucoup plus proches si elles étaient exprimées en fonction de la concentration en cadmium libre en solution.

On observe également une différence entre les résultats des essais en microcosme avec et sans renouvellement d'eau : on détecte des effets pour des concentrations plus basses avec renouvellement d'eau. Néanmoins, cette différence est faible si l'on calcule les seuils à partir de la concentration moyenne en cadmium mesurée dans l'eau durant la phase d'exposition (C_m). L'utilisation de la concentration moyenne C_m semble être adaptée à la comparaison des expériences, cependant, elle ne reflète pas les profils d'exposition. Comme nous l'avons vu dans la section 4.1.1, la concentration totale en cadmium dans l'eau évolue fortement au cours du temps dans l'essai statique alors qu'elle est pratiquement constante dans l'expérience avec renouvellement d'eau. Le calcul de NEC (No Effect Concentration) avec un modèle permettant d'intégrer les différents profils d'exposition, comme cela a été réalisé pour les daphnies (section 4.2.3), permettrait une meilleure comparaison des résultats.

La spéciation du cadmium en solution est également différente entre les expériences S et D. Bien que la composition de l'eau soit initialement identique dans les deux expériences, le renouvellement de l'eau stabilise les paramètres physico-chimiques de la colonne d'eau des microcosmes (section 4.1). La teneur en carbone organique dissous n'a pas pu être mesurée dans l'expérience D, l'appareil ne fonctionnant pas, mais on peut supposer qu'elle était stabilisée par le renouvellement d'eau, tout comme la dureté. Or ces deux paramètres augmentent fortement dans les systèmes statiques et il a été montré qu'ils conduisaient tous deux à réduire la sensibilité des essais.

Influence du développement des organismes

Des hypothèses relatives au développement des lentilles d'eau pourraient également expliquer les différences observées entre les essais S et D. Comme nous l'avons vu précédemment, la croissance des

lentilles d'eau témoins est favorisée par le renouvellement d'eau. On peut émettre l'hypothèse que le stress occasionné par le cadmium sur la croissance est donc mis en évidence pour de plus faibles concentrations.

Influence de la réplicabilité

Il est plus difficile de mettre en évidence des effets significatifs du cadmium sur les lentilles d'eau dans l'expérience S que dans l'expérience D. Ceci peut être expliqué par la plus forte variabilité des résultats dans l'essai statique. Nous avons vu qu'en dehors de la longueur maximale des racines de lentilles d'eau, les coefficients de variation moyen des paramètres mesurés sur les lentilles d'eau témoins sont compris entre 31 et 36% à la fin de l'essai S. A la fin de l'expérience D (J22), les paramètres mesurés sur les lentilles d'eau sont plus réplicables. Le nombre de frondes est le paramètre le moins variable (CV par traitement entre 8 et 10%, $CV_{moyen} = 9\%$), suivi de la surface couverte par les frondes ($CV \subset [4\%, 16\%]$, $CV_{moyen} = 10\%$) puis de la longueur maximale des racines ($CV \subset [5\%, 22\%]$, $CV_{moyen} = 11\%$) et de la masse fraîche totale ($CV \subset [4\%, 23\%]$, $CV_{moyen} = 12\%$).

4.2.3 Daphnies

4.2.3.1 Survie des daphnies

Systemes témoins

Les conditions expérimentales mises en place se sont avérées favorables à la survie des daphnies témoins (figure 4.24). Le pourcentage de survie des daphnies mères témoins en fin d'expérience (J20) est de 92% (CV = 9%) dans l'essai S et de 98 % (CV = 5%) dans l'essai D. Dans l'essai avec renouvellement d'eau, les daphnies témoins sont plus colorées, plus mobiles. Elles semblent donc être en meilleure forme, bien que ces critères soient qualitatifs.

Apport du développement de l'essai LAMs

La survie dans l'essai S est très bonne et peu variable en regard des autres essais LAMs réalisés au LEHNA ou au CEAEQ. On peut supposer que ce progrès est dû aux améliorations expérimentales apportées au cours de la thèse.

Dans les essais LAMs réalisés en dehors de cette thèse, la survie des daphnies mères dans les microcosmes témoins est généralement supérieure à 80% [160, 41, 132]. Dans certains microcosmes, elle est néanmoins plus faible. Dans l'étude réalisée par Renard [134], la survie moyenne des daphnies mères témoins à 21 jours dépasse à peine 70%. Il arrive même que toutes les daphnies d'un microcosme témoin meurent en cours d'essai. Dans un essai antérieur réalisé au LEHNA, la survie en fin d'essai atteignait à peine 5%.

La variabilité de la survie des mères dépend de l'expérience. Elle va d'environ 10% à 70%, voire 200% pour une expérience où la mortalité était très forte. Dans l'essai TBT3, réalisé par Triffault-Bouchet au CEAEQ en 2006 (non publié), la survie moyenne à J28 est de 87% (CV = 12.4%) alors qu'elle est encore de 96% (CV = 8.3%) à J21. La diminution de la survie en fin d'expérience peut être expliquée par le fait que, lors de la 4ème semaine d'essai, la concentration algale devient très

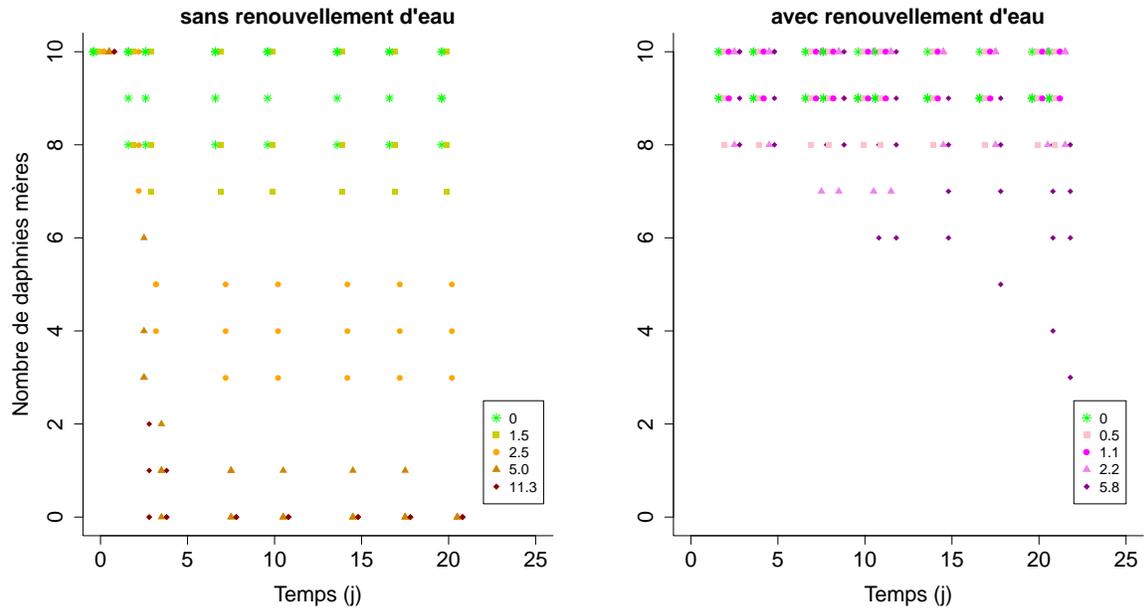


FIGURE 4.24 – Evolution du nombre de daphnies mères vivantes au cours des essais sans et avec renouvellement d'eau en fonction de la concentration moyenne en cadmium dans le microcosme durant la période d'exposition (points expérimentaux)

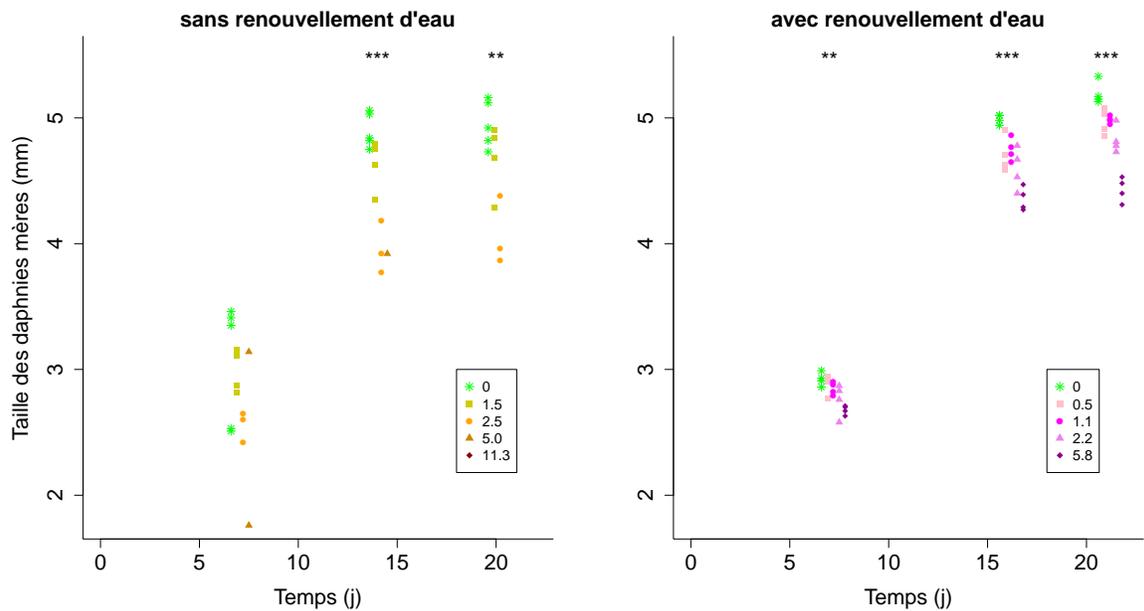


FIGURE 4.25 – Evolution de la longueur des daphnies mères au cours des essais sans et avec renouvellement d'eau en fonction de la concentration moyenne en cadmium dans le microcosme durant la période d'exposition (points expérimentaux et différences significatives entre traitements représentées par des étoiles)

TABLE 4.7 – Coefficients de variation CV (%) de la survie, la croissance et la reproduction (nombre de jeunes par mère cumulés) des daphnies pour les expériences S et D à différents temps, en fonction du traitement

		ECd4			ECd5				
		0	10	20	0	1	2	5	10
Survie	J7	9	17	25	0	0	5	0	6
	J14	9	17	25	5	5	5	0	17
	J20	9	17	25	5	5	5	0	37
Croissance	J7	16	11	14	4	8	4	8	3
	J14/16	4	5	9	3	3	2	8	4
	J20/21	11	6	8	3	2	2	7	4
	moy.	14	16	9	3	5	3	7	4
Reproduction	J10	22	27	24	4	6	9	23	35
	J14	20	41	39	6	6	7	8	29
	J17	29	33	28	4	13	9	6	16
	J20	35	24	25	3	19	8	10	8
	moy.	26	31	29	4	11	8	12	22

TABLE 4.8 – Survie des daphnies dans différents essais en microcosme réalisés au cours de la thèse ($t_{thèse}$: temps écoulé depuis le premier jour de la thèse, n°_{essai} : numéro de l'essai réalisé par le même expérimentateur, m : moyenne, CV : coefficient de variation)

essai	$t_{thèse}$	n°_{essai}	n	J	m (%)	CV (%)
E5	147	6	6	14	33	103
EV	258	7	8	21	40	88
ECd1	300	9	9	21	76	44
ECd2	327	10	6	19	90	12
				22	75	45
S	976	26	5	20	92	9

faible dans les microcosmes. C'est pour cette raison que nous avons raccourci la durée d'exposition de l'essai statique à 21 jours.

Dans le tableau 4.8, on observe que la survie des daphnies mères augmente et que la variabilité de ce paramètre diminue avec l'expérience de l'expérimentateur.

Apport du renouvellement d'eau sur la survie des daphnies

Les tests statistiques utilisés (test du log-rank ou modèle de Cox) ne permettent pas de mettre en évidence un effet du renouvellement d'eau sur la survie des daphnies mères témoins au cours de l'expérience ($p > 0.2$). Par contre, avec le cadre de modélisation développé par les collègues du LBBE nous avons obtenu un taux de mortalité plus important dans l'essai S que l'essai D (figure 4.26 et tableau 4.11), ce qui signifie que la survie des daphnies dans l'essai D est meilleure que dans l'essai S, indépendamment des conditions d'exposition [21].

Effet du cadmium

Essai statique S

Dans l'expérience S, l'effet du cadmium sur la survie des daphnies initialement introduites est aigu. Les jeunes daphnies les plus faibles meurent dans les 3 premiers jours d'essai, puis les populations de mères se stabilisent (figure 4.24). Il est donc approprié d'exprimer également les résultats en fonction de la concentration à J0 (C_0). Les NOEC, NOEC₀ et NOEC_m sont respectivement de 10, 3 et 1.5 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de J3 à J20 (tableau 4.9). A J20, la LC₀₅₀ (J20) est de 4.6 $\mu\text{g.l}^{-1}$.

Les coefficients de variation de la survie des daphnies mères augmentent avec la concentration en cadmium. Dans l'expérience S, les coefficients de variation sont respectivement de 9%, 17% et 25% pour les concentrations moyennes (C_m) de 0, 1.5 et 2.5 $\mu\text{g.l}^{-1}$.

Comparaison à d'autres essais statiques

D'après Enserink et ses collaborateurs [67], pour des *D. magna* exposées au cadmium durant 21 jours, les LC50 sont comprises entre 3.3 et 8.3 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (dureté de 225 mg.l^{-1} de CaCO_3). D'après les expériences de Suedel et ses collaborateurs (1997), la NOEC est de 5 $\mu\text{g.l}^{-1}$ et la LC50 est comprise entre 8.6 et 9.9 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de cadmium après 7 à 14 jours d'exposition (dureté de 69 - 87 mg.l^{-1} de CaCO_3) [151]. Nos résultats sont donc cohérents avec les données issues de ces travaux antérieurs.

La rapide mortalité des daphnies est cohérente avec les résultats de Suedel *et al.* [151], qui montrent que, passé une semaine, la durée d'exposition (7, 10 ou 14 jours) des daphnies *D. magna* au cadmium n'a pas d'impact sur la survie des daphnies. Ce résultat peut être expliqué par le schéma de contamination. En effet, dans l'expérience sans renouvellement d'eau, les daphnies sont exposées à des concentrations décroissantes en cadmium dans le temps (section 4.1.1). Pour indication, d'après le modèle exponentiel retenu pour modéliser l'évolution de la concentration en cadmium totale dans la colonne d'eau dans l'expérience S (équation 4.1), il reste 17% de la concentration initiale dans l'eau, 3 jours après l'introduction des organismes. Les daphnies ayant survécu aux premiers jours d'exposition n'ont donc pas connu d'effets sublétaux trop sérieux et/ou ont été capables de mettre en place des mécanismes de réparation leur permettant de survivre jusqu'à la fin de l'essai. En effet,

TABLE 4.9 – Effet chronique du cadmium sur la survie des daphnies en fonction du temps d'exposition (NOEC et LCx en $\mu\text{g.l}^{-1}$; C : concentration nominale; C_0 : concentration à J0; C_m : concentration moyenne mesurée de J0 à J20)

Exp.	J	NOEC	NOEC ₀	NOEC _m	LC _{m10}	LC _{m20}	LC _{m50}
S	2	20	5.8	2.5	1.0	1.7	4.3
	3	10	3.0	1.5	0.6	1.0	2.2
	7	10	3.0	1.5	0.6	1.0	2.1
	10	10	3.0	1.5	0.6	1.0	2.0
	14	10	3.0	1.5	0.6	1.0	2.0
	20	10	3.0	1.5	0.5	0.8	1.8
D	2	≥ 10	≥ 7.9	≥ 5.8	-	-	-
	7	≥ 10	≥ 7.9	≥ 5.8	-	-	-
	10	≥ 10	≥ 7.9	≥ 5.8	6.2	13.7	53.3
	14	5	3.8	2.3	4.2	6.9	16.3
	20	5	3.8	2.3	3.2	4.7	8.8

TABLE 4.10 – Concentrations en cadmium au jour d'introduction des organismes (C_0) et concentrations moyennes sur la période d'exposition (C_m) entraînant 10, 20 et 50% d'inhibition de la survie, croissance et reproduction des daphnies femelles à la fin des expériences S et D ($\mu\text{g.l}^{-1}$)

	Exp.	EC ₀₁₀	EC ₀₂₀	EC ₀₅₀	EC _{m10}	EC _{m20}	EC _{m50}
Survie	S	0.9	1.5	3.8	0.5	0.8	1.8
	D	4.2	5.8	10.1	3.2	4.7	8.8
Croissance	S	2.7	3.6	-	1.9	2.7	-
	D	6.0	8.6	-	5.2	7.3	-
Reproduction	S	2.0	3.1	6.3	1.1	1.5	2.7
	D	3.5	4.3	6.0	2.0	2.8	4.8

chez les cladocères *Daphnia magna*, les métallothionéines sont induites par l'exposition au cadmium et cette induction dépend de la concentration d'exposition [83, 70]. Or les métallothionéines jouent un rôle important dans les mécanismes de contrôle homéostatiques des éléments essentiels et les processus de détoxification des métaux non essentiels [6], en particulier la détoxification du cadmium chez *Daphnia magna* [74].

Essai dynamique

Dans l'expérience D, l'effet est chronique (figure 4.24). Il semble donc plus approprié d'exprimer l'effet en fonction des concentrations moyennes mesurées durant la durée d'exposition (C_m). L'expérience permet de mettre en évidence un effet statistiquement significatif du cadmium sur la survie des daphnies mères à partir du 14^{ème} jour d'exposition pour la concentration testée la plus élevée (test de Cochran). La $NOEC_m$ à J14 et J20 est donc de $2.3 \mu\text{g.l}^{-1}$ ($NOEC_0 = 3.8 \mu\text{g.l}^{-1}$; $NOEC = 5 \mu\text{g.l}^{-1}$). Sur la période d'essai, aucun impact sur la survie des daphnies mères n'a pu être mis en évidence pour les concentrations moyennes (C_m) inférieures ou égales à $2.3 \mu\text{g.l}^{-1}$. La LC_m50 (J20) est de $8.8 \mu\text{g.l}^{-1}$ (tableau 4.9).

Il y a peu d'effets létaux dans cette dernière expérience car les concentrations testées sont faibles et les daphnies se développent bien en condition témoin. L'apparition d'effets chroniques peut être expliquée par le profil de contamination. Grâce à l'apport de cadmium en continu, la concentration en cadmium dans l'eau diminue peu au cours du temps ce qui nous a permis de tester des concentrations initiales plus faibles que dans l'expérience S.

Comparaison des expériences S et D

Il est difficile de comparer les valeurs de NOEC ou LCx des deux expériences car les profils de contamination sont très différents. C'est pourquoi la modélisation développée par Billoir *et al.* [20], qui prend en compte la dynamique d'exposition, est particulièrement intéressante. Elle permet donc de comparer des expériences entre lesquelles le patron d'exposition diffère. Les NEC_s estimées pour la survie sont très proches dans les deux expériences (figure 4.26). La NEC_s de l'essai D est légèrement supérieure à celle de l'essai S [20].

4.2.3.2 Croissance des daphnies

Systemes témoins

La taille des daphnies mères témoins se stabilise vers la fin de la deuxième semaine et atteint, à J20, 5.0 mm en moyenne ($CV = 11\%$) dans l'essai S et 5.2 mm ($CV = 3\%$) dans l'essai D. Dans l'expérience D, la croissance moyenne est donc supérieure et la variabilité plus faible pour ce paramètre. Nous n'avons cependant pas pu mettre en évidence de différence de croissance entre les expériences S et D par les tests statistiques classiques aux différents temps de mesure ($p > 0.12$). Par contre, d'après le cadre de modélisation dynamique, la longueur maximale de daphnies (L_m) est supérieure dans l'essai D (5.5 mm [5.1 - 5.9]) par rapport à l'essai S (5.1 mm [4.8 - 5.5]) (tableau 4.11).

TABLE 4.11 – Paramètres du cadre de modélisation dynamique développé par Billoir *et al.* [21]. Les 5 premiers paramètres sont non-toxicologiques, les suivants sont les paramètres toxicologiques.

Symbol	Dimension	Interpretation	Prior distribution	Posterior distribution - S case	Posterior distribution - D case
m	d^{-1}	blank mortality rate	logUnif ($-10, -4.5$)	0.0033 [0.0015-0.0062]	0.00064 [0.00011-0.0020]
L_m	mm	maximum body length	N orm (4.77, 0.59 ²) T (1,)	5.1 [4.8-5.5]	5.5 [5.1-5.9]
γ	d^{-1}	von Bertalanffy growth rate	N orm (0.11, 0.03 ²) T (0,)	0.11 [0.097-0.14]	0.11 [0.086-0.14]
l_p	(-)	scaled length at puberty	N orm (0.49, 0.07 ²) T (0.25,)	0.54 [0.46-0.61]	0.48 [0.43-0.57]
R_m	$\#d^{-1}$	maximum reproduction rate	N orm (10.74, 3.62 ²) T (0,)	15 [12-19]	19 [16-23]
k_e	d^{-1}	elimination rate	logUnif ($-5, 1$)	0.90 [0.79-1.06]	0.81 [0.20-1.8]
NEC_s	$\mu g.L^{-1}$	No Effect Concentration for survival	logUnif ($-3, 3$)	1.8 [1.2-2.3]	2.2 [0.26-4.0]
k_s	$\mu g^{-1}.L$	survival effect intensity coefficient	logUnif ($-5, 5$)	13 [7.0-30]	19 [3.5-110]
NEC_{GR}	$\mu g.L^{-1}$	No Effect Concentration for growth and reproduction	logUnif ($-3, 3$)	0.15 [0.052-1.1]	0.14 [0.052-1.1]
k_{GR}	$\mu g^{-1}.L$	growth and reproduction effect intensity coefficient	logUnif ($-5, 5$)	0.032 [0.019-0.046]	0.038 [0.029-0.059]

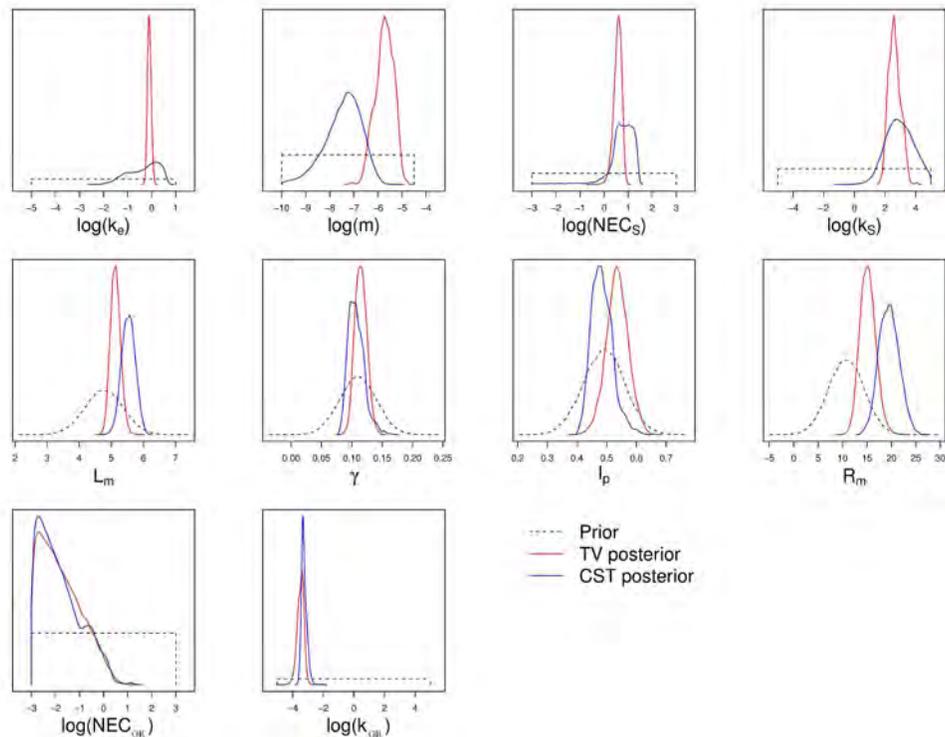


FIGURE 4.26 – Distribution des paramètres du cadre de modélisation *a priori* (lignes pointillé) et *a posteriori* obtenues à partir de l'expérience statique S (TV, rouge) ou dynamique D (CST, bleu) [21]

Effet du cadmium

On observe un effet monotone du cadmium sur la croissance des daphnies femelles (figure 4.25). Un effet global statistiquement significatif peut être mis en évidence (anova) après 14 et 20 (ou 21) jours d'exposition dans les deux expériences et également après une semaine d'exposition dans l'expérience avec renouvellement d'eau D.

Dans l'expérience S, à J20, la croissance des daphnies dans les microcosmes contaminés diffère statistiquement de celle des témoins pour toutes les concentrations si l'on utilise un test paramétrique en supposant que la relation dose-réponse est monotone (test de Williams). Par contre, si on utilise un test paramétrique sans supposer que la relation est monotone (test de Dunnett) ou si on utilise un test non paramétrique en supposant la relation monotone (Jonckheere-Terpstra), on obtient une $NOEC_m(J20)$ de $1.5 \mu\text{g.l}^{-1}$.

Dans l'expérience D, à J21, on montre que la croissance des daphnies exposées au cadmium diffère statistiquement de celle des daphnies témoins pour tous les traitements, quelle que soit la méthode statistique employée (William, Dunnett, Jonckheere, Dunn's test).

La croissance des daphnies est plus variable dans l'expérience S que l'expérience D. Les coefficients de variations moyens sur l'expérience sont de 16% et 9% pour les concentrations moyennes 1.5 et $2.5 \mu\text{g.l}^{-1}$ dans l'expérience S et de 5%, 3%, 7% et 4% pour les différents traitements de l'expérience D, par ordre croissant de contamination.

Les concentrations pour lesquelles on observe 10 ou 20% d'effet sur la croissance sont calculées à partir de la taille des daphnies femelles survivantes et exprimées en fonction de la concentration moyenne durant la période d'exposition. Les EC_{m50} ne sont pas données car aucune daphnie survivante n'avait une taille inférieure à 67% de la taille moyenne des daphnies témoins à J21. Les EC_{m20} sont respectivement de 2.7 et $7.3 \mu\text{g.l}^{-1}$ en fin des expériences S et D (tableau 4.10).

Les NEC_{GR} estimées avec le cadre de modélisation dynamique sont pratiquement identiques dans les deux expériences (tableau 4.11 et figure 4.26).

4.2.3.3 Reproduction des daphnies

Systemes témoins

Les daphnies néonates apparaissent à partir de J8 dans l'expérience S et J7 dans l'expérience D. A J20, le nombre de daphnies filles par mère cumulé est de 105 ($CV = 36\%$) dans l'expérience S et de 138 ($CV = 4\%$) dans l'expérience D (figure 4.27).

Amélioration de l'essai statique

D'après la synthèse réalisée par Clément [53] sur les essais LAMs antérieurs à cette thèse, en excluant 6 essais sur 24 pour lesquels la reproduction est anormalement basse, le nombre de jeunes cumulé par mère témoin est d'environ 50 au cours d'un essai. Les coefficients de variation moyens sont compris entre 40 et 52%. Nous avons donc réussi à augmenter le taux de reproduction et à diminuer la variabilité de ce paramètre en améliorant la méthodologie d'essai LAMs. La variabilité de ce paramètre reste néanmoins élevée.

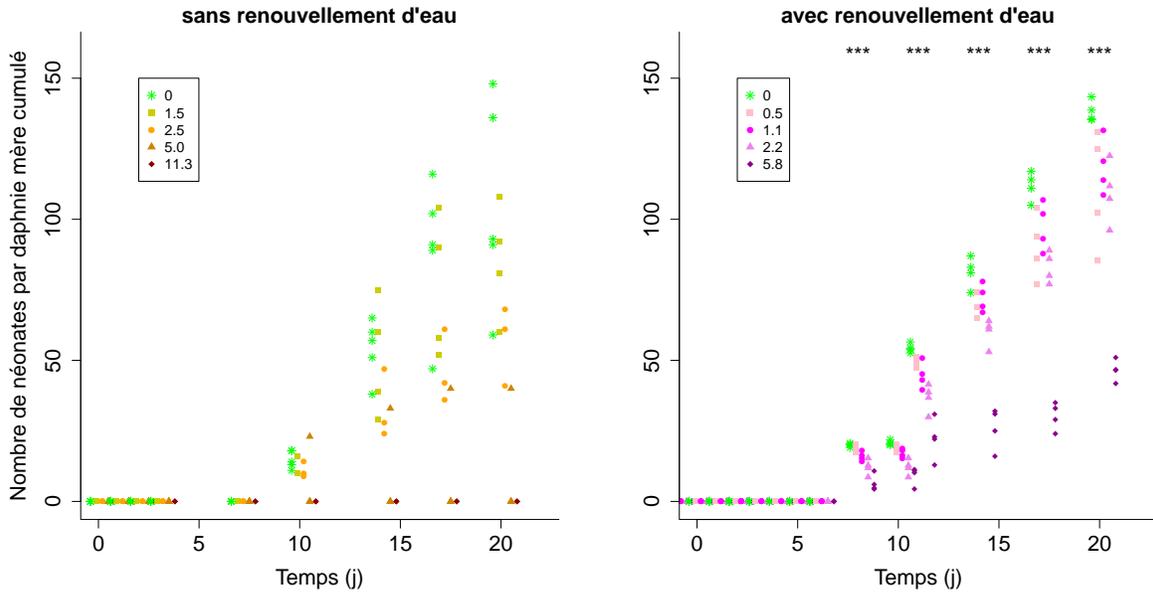


FIGURE 4.27 – Evolution du nombre de néonates par daphnie mère cumulé au cours des essais sans et avec renouvellement d’eau en fonction de la concentration moyenne en cadmium dans le microcosme durant la période d’exposition (points expérimentaux et différences significatives entre traitements représentées par des étoiles)

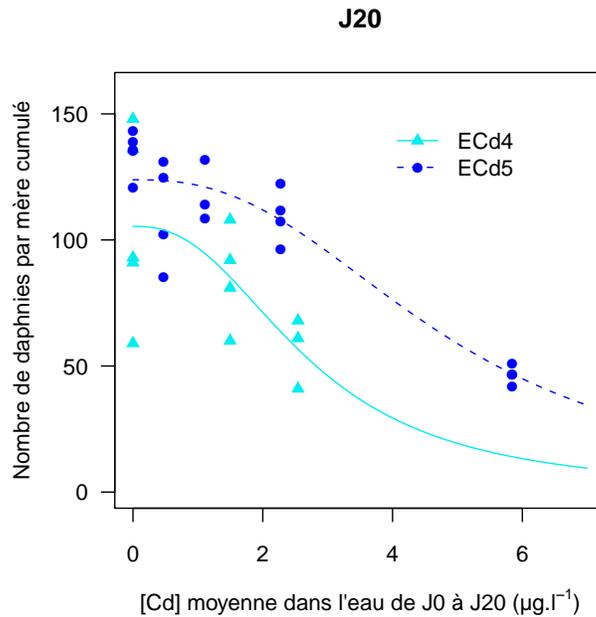


FIGURE 4.28 – Nombre de jeunes daphnies par mère cumulé à la fin des expériences S (ECd4) et D (ECd5) en fonction de la concentration moyenne en cadmium dans l’eau au cours de la période d’exposition (points expérimentaux et modèle logisitique à 3 paramètres)

Apport du renouvellement d'eau

La reproduction moyenne des daphnies en condition témoin est plus importante et surtout beaucoup moins variable dans l'essai D par rapport à l'essai S. Nous ne pouvons mettre en évidence de différence significative avec les tests statistiques classiques ($p > 0.1$) à cause de la variabilité de ce paramètre dans l'essai sans renouvellement d'eau. Par contre, le taux de reproduction maximum estimé *a posteriori*, avec le cadre de modélisation dynamique, est supérieur dans le cas de l'essai D (figure 4.26 et tableau 4.11). La population de daphnies se développe donc mieux dans les systèmes où l'eau est renouvelée.

La variabilité de ce paramètre dans l'essai D n'est que de 4% ce qui est très bas par rapport à l'ensemble des essais LAMs réalisés jusqu'à présent. Clément [53] précise qu'il est souvent difficile de mettre en évidence un effet sur la reproduction des daphnies à cause de la forte variabilité de ce paramètre. L'inhibition de la reproduction est donc un critère d'effet subléthal, qui parfois ne permet pas de mettre en évidence un effet avec les tests classiques, alors même qu'il y a un effet léthal. Or la reproduction des daphnies est le paramètre biologique le plus coûteux, en temps de mesure, sur l'ensemble de l'essai : pour un expérimentateur entraîné, il faut compter environ 15 minutes de mesure par système pour les témoins. Il n'était donc pas optimal de passer autant de temps par expérience à mesurer un paramètre qui, souvent, ne permettait pas de conclure, du fait de sa variabilité. La forte diminution de la variabilité de ce paramètre constitue donc une avancée majeure.

Dans l'essai S, la reproduction diminue en fin d'expérience : pour les témoins, le nombre moyen de néonates par mère journalier était de 10 entre J10 et J14, de 12 entre J14 et J17 et de 5 entre J17 et J20. Ce phénomène n'est pas observé dans l'essai D, où le nombre moyen de néonates par mère journalier est relativement constant. Il est de 11, 9, 10 et 9 respectivement entre J8 et J11, J11 et J14, J14 et J17, J17 et J20. Dans l'essai D, la croissance de la population de daphnies témoins peut être modélisée par une relation linéaire. On peut faire l'hypothèse que la diminution du taux de reproduction des daphnies dans l'essai statique est due à l'épuisement du milieu en algues. Les daphnies n'auraient alors plus assez d'énergie pour maintenir la reproduction à un taux optimal. Selon cette hypothèse, le renouvellement d'eau, qui permet de stabiliser la concentration algale, permettrait alors de stabiliser également le taux de reproduction des daphnies au cours de l'essai.

Effet du cadmium

Essai statique

Dans l'expérience S, le nombre moyen cumulé de daphnies néonates par mère diminue avec la concentration en cadmium : à J20, il est de 85, 57 et 10 respectivement pour les concentrations moyennes en cadmium de 1.5, 2.5 et 5.0 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Cependant, aucune différence significative entre ces moyennes ne peut être mise en évidence avec les tests statistiques classiques au cours de l'expérience, à cause de la variabilité des résultats (anova, $p > 0.1$). A J20, la EC_m50 est estimée à 2.7 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de cadmium pour ce paramètre et la EC_050 à 6.3 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (figure 4.28). Les EC_m10 (J20) et EC_010 (J20) sont estimées à 1.1 et 2.0 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Comme nous l'avons vu, la NEC_{GR} est estimée à 0.15 [0.05 - 1.1] $\mu\text{g.l}^{-1}$ (tableau 4.11).

Dans l'expérience S, il n'existe pas de relation générale entre la variabilité de la reproduction et

le temps ou la concentration en cadmium.

Essai dynamique

Dans l'expérience D, un effet global du cadmium sur la reproduction des daphnies (nombre cumulé de jeunes par mère) est mis en évidence pour tous les jours de mesure (anova, $10^{-6} < p < 10^{-10}$). L'analyse des résidus montre que l'on peut utiliser ce test paramétrique avec une nuance à J10 où on observe une influence importante du traitement sur la répartition des résidus. L'effet du cadmium sur la reproduction des daphnies étant monotone (figure 4.27), on peut utiliser un test de Williams pour déterminer quels traitements diffèrent du témoin. Mais l'utilisation de différents tests, paramétriques ou non, supposant un effet monotone ou non (Williams, Dunnett, Jonckheere, Dunn's test), conduisent au même résultat : tous les traitements diffèrent du témoin. On met donc en évidence un effet du cadmium sur la reproduction des daphnies à partir de la première concentration testée. La $LOEC_m$ est donc de $0.5 \mu\text{g.l}^{-1}$. Nous ne sommes donc pas en mesure de déterminer une NOEC. La NEC_{GR} est estimée à $0.14 [0.052 - 1.1] \mu\text{g.l}^{-1}$ (tableau 4.11).

Dans l'expérience avec un flux continu d'eau, la reproduction est plus variable en présence de cadmium que dans les témoins. La variabilité de la reproduction augmente avec la concentration en cadmium, mais cette différence tend à s'estomper au fur et à mesure du temps (tableau 4.7). Dans l'essai réalisé avec renouvellement d'eau, la reproduction des daphnies est tellement répliquable qu'il semble possible de mettre en évidence une variabilité additionnelle due à la présence de contaminant (tableau 4.7).

Comparaison des essais S et D

En considérant la reproduction, la sensibilité des daphnies au cadmium est similaire dans les deux expériences. Les NEC_{GR} , qui intègrent le profil d'exposition, sont pratiquement identiques. Les EC_{050} sont également très proches dans les expériences S et D.

Par contre, il n'est pas possible d'estimer des NOEC dans l'expérience S, car la variabilité est trop importante. Avec renouvellement d'eau, la reproduction des daphnies est moins variable dans les systèmes témoins et contaminés (tableau 4.7). Ceci permet de mettre en évidence des effets plus fins du cadmium sur la reproduction avec les tests classiques.

Comparaison à la littérature

D'après Suedel *et al.* [151], qui se base sur 3 études, l'effet du cadmium sur la reproduction de *D. magna* est mis en évidence pour des concentrations allant de 0.35 à $2.0 \mu\text{g.l}^{-1}$. Knops *et al.* [97] estiment une EC_{10} à J17 de $3.1 \mu\text{g.l}^{-1}$ de cadmium. Guilhermino *et al.* [86] ont conduit des essais monospécifiques de reproduction de *D. magna* selon les recommandations de l'OCDE. Ils estiment la EC_{50} à J21 à $6.1 \mu\text{g.l}^{-1}$. Ces valeurs sont légèrement supérieures à nos estimations en fonction de la concentration moyenne durant la période d'exposition mais proche des valeurs estimées en fonction de la concentration en cadmium à J0. De plus, on ne peut comparer précisément ces valeurs car il existe de nombreuses différences entre les essais : la composition de l'eau reconstituée (ADaM pour [97], ASTM pour [86], EM), la présence ou non de sédiment, la présence d'autres organismes, le renouvellement de l'eau, l'apport de contaminant, la quantité de nourriture présente, la durée

d'exposition, ... Etant donné l'ensemble des différences entre les essais, on peut considérer que nos résultats sont très cohérents avec ceux de la littérature.

4.2.3.4 Discussion

Comparaison des paramètres

Dans l'expérience S, la reproduction des daphnies mères témoins est moins répliquable que leur croissance et leur survie ($CV_{repro} > CV_{croiss} > CV_{surv}$).

Dans les autres essais réalisés LAMs, la reproduction est également plus variable que la croissance. Selon Triffault-Bouchet [160], le nombre moyen de daphnies filles par mère cumulé en fin d'essai (J30) va de 57 à 169, avec un coefficient de variation inter-essais de 41.6%. A J22, le coefficient de variation inter-essais n'est que de 33.1%. Dans son expérience TBT3 (CEAEQ, 2006, non publié), la reproduction moyenne à J28 est de 109 jeunes par mère, avec un coefficient de variation de 51.2%. La variabilité est souvent trop importante pour pouvoir mettre en évidence un effet sur la survie ou la reproduction des daphnies.

Interactions

Il existe une forte interaction entre les algues et les daphnies puisque les *P. subcapitata* sont la principale source de nourriture des cladocères dans ces microcosmes. Ces interactions ont été largement étudiées et modélisées dans la littérature [104, 139, 4, 55, 140]. Les autres invertébrés (hyalles et chironomes) se développant principalement dans le sédiment, ils ont peu d'interactions avec les daphnies. Ils sont néanmoins en compétition pour la nourriture, comme nous l'avons vu à la section 4.2.1. L'interaction entre les daphnies et les lentilles d'eau est (1) directe, car les racines des lentilles d'eau sont un support de développement pour des microorganismes, source de nourriture pour les daphnies et (2) indirecte, puisque, comme nous l'avons vu précédemment, les daphnies impactent la croissance des lentilles d'eau en régulant la densité algale dans le milieu.

4.2.4 Hyalles

4.2.4.1 Systèmes témoins

Essai statique

La survie moyenne des hyalles témoins à la fin de l'essai S est de 88% ($CV = 11\%$). Ce résultat est satisfaisant par rapport aux résultats de la littérature et aux essais préliminaires.

Lors de l'essai préliminaire ECd2, la survie moyenne sur 6 réplicats est de 85% ($CV = 12\%$). Dans sa thèse, Cauzzi [41] obtient des taux de survie compris entre 60 et 78% pour les témoins. Raevel [132] obtient un taux de survie moyen dans les témoins de 80% ($CV = 21.7\%$) mais Renard [134] obtient seulement un taux de 60% avec une forte variabilité. Clément [53] a calculé que la survie des hyalles dans 271 microcosmes témoins est supérieure à 80% pour 69% des valeurs considérées.

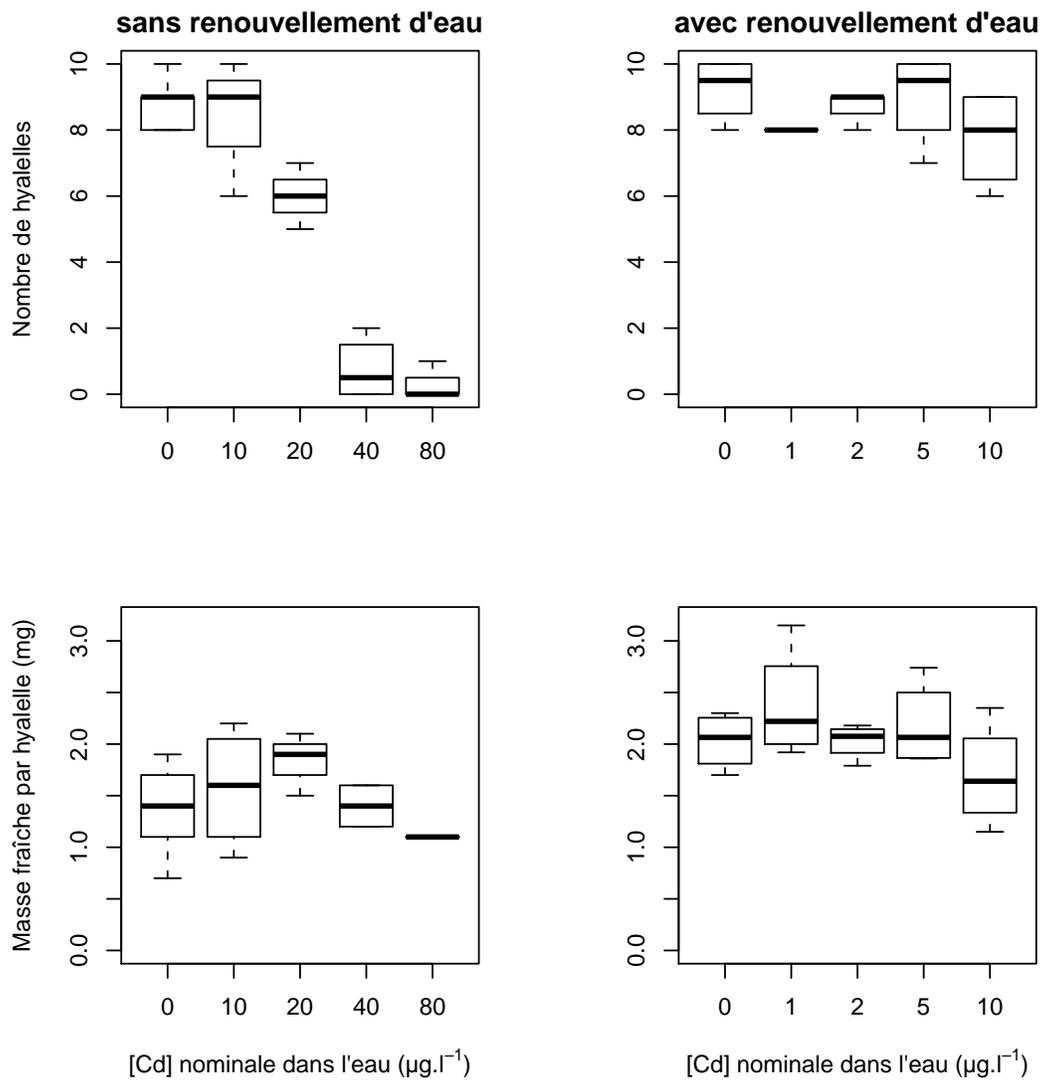


FIGURE 4.29 – Nombre de hyalles vivantes et masse fraîche individuelle en fin d'essai sans et avec renouvellement d'eau en fonction de la concentration nominale en cadmium (boxplot)

En enlevant les valeurs de survies inférieures à 60%, il trouve une survie moyenne de 84% (CV = 20%). On peut supposer que l'expérimentateur a une influence sur la survie des hyaelles témoins.

On peut également émettre l'hypothèse que la sous-espèce et la fréquence d'apport de nourriture influence la survie des hyaelles. En effet, la moyenne de la survie à J30 dans 4 essais réalisés par Triffault-Bouchet lors de sa thèse au LSE est de 96% (CV = 6%) [160]. Dans ces expériences, du Tétramin® pilé était alors apporté 2 fois par semaine. Dans une expérience menée au CEAEQ par Triffault-Bouchet (2005, non publié), avec seulement 3 apports de Tétramin® au cours de la première semaine, la survie moyenne des hyaelles à J28 est de 68% (CV = 29%).

Essai dynamique

La survie moyenne des hyaelles en condition témoin est légèrement plus importante dans l'expérience avec renouvellement d'eau. En fin d'expérience, le pourcentage de hyaelles survivantes est de 93% (CV = 10%) dans l'expérience D. Nos résultats ne permettent pas de mettre en évidence une différence significative entre les deux expériences en ce qui concerne la survie des hyaelles témoins ($p = 0.73$, test de Fisher).

La croissance moyenne des hyaelles témoins en fin d'expérience est plus importante et moins variable dans l'expérience D. La masse fraîche individuelle des hyaelles témoins en fin d'essai est en moyenne de 1.4 mg (CV = 36%) dans l'expérience S et 2.0 mg (CV = 13%) dans l'expérience D.

Interactions

Les hyaelles se développent dans les deux compartiments abiotiques mais elles sont généralement enfouies dans le sédiment. Les hyaelles sont des organismes épiphytiques, c'est à dire qu'elles trouvent l'essentiel de leur nourriture dans les algues à la surface du sédiment et des macrophytes plutôt que dans le matériel détritique du sédiment [53]. Elles sont en compétition avec les chironomes pour la nourriture et éventuellement l'espace, et dans une moindre mesure avec les daphnies. D'après l'expérience préliminaire E4 réalisée au cours de cette thèse pour évaluer l'influence de la teneur en kaolin sur le développement des organismes benthiques, il semblerait qu'en présence d'une faible quantité de nourriture, les chironomes se développent mieux que les hyaelles.

4.2.4.2 Effet du cadmium

La survie des hyaelles est affectée par le cadmium dans l'expérience S (figure 4.29). La NOEC à J21 est de $10 \mu\text{g.l}^{-1}$ (tests de Cochran-Armitage ou Fisher avec correction de Bonferroni-Holm). La concentration entraînant 50% de mortalité à J21 est de 20.1, 3.8 ou $1.9 \mu\text{g.l}^{-1}$ suivant que l'on parle de la concentration en cadmium dans l'eau nominale (C), moyenne mesurée à J0 (C_0) ou moyenne mesurée durant la période d'exposition des hyaelles (C_m). Par contre, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effet dans l'expérience D. Aucun effet sur la croissance (masse fraîche par hyaelle) n'a pu être mis en évidence dans les expériences.

Comparaison à la littérature

Les essais préliminaires monospécifiques réalisés permettent de mettre en évidence un effet du cadmium sur la survie des hyalelles après 14 et 28 jours d'exposition. Les NOEC sont de 4.4 et 10 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (test de Cochran-Armitage) et les LC50 de 34 et 42 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (modèle log-logistique à 2 paramètres) à 14 et 28 jours respectivement.

Après 10 jours d'exposition des hyalelles au cadmium en présence d'une phase sédimentaire, Nebeker *et al.* [124] estime la LC50 à 80 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de cadmium.

Les différences peuvent être notamment expliquées par la composition des milieux abiotiques (eau et sédiment), et donc la spéciation du cadmium, les conditions et la durée d'exposition ainsi que la sensibilité intrinsèque des organismes.

4.2.5 Chironomes

4.2.5.1 Systèmes témoins

Essai statique

Dans l'essai S, les chironomes commençaient en moyenne à émerger au 13^e jour (CV = 4%) et 74% (CV = 18%) des chironomes avaient émergé à J21.

D'après Clément [53], on observe les émergences à partir du 14^e jour (CV = 5%). La survie des chironomes est supérieure à 60% dans 85% des 61 microcosmes témoins analysés quel que soit le jour considéré. Elle est supérieure à 80% dans 56% des cas à J21. Le coefficient de variation moyen de la survie à J21 est de 21%. Dans sa thèse, Triffault-Bouchet [161] trouvait une survie à 30 jours de 84.6% (CV = 7.7%) sur 4 essais en microcosme. Dans un essai réalisé par Triffault-Bouchet au CEAEQ en 2005, l'émergence des chironomes à J28 est de 93% (CV = 7.2%). Nos résultats sont donc globalement cohérents avec les résultats moyens des essais en microcosme réalisés préalablement. Les meilleurs résultats dans les essais réalisés par Triffault-Bouchet peuvent être expliqués par l'apport de Tétramin® en cours d'essai.

Essai dynamique

La survie des chironomes témoins en fin d'expérience est significativement meilleure dans les microcosmes où l'eau est renouvelée ($p = 0.0097$, test de Fisher). Elle est également moins variable (CV = 11% dans l'essai D au lieu de 18% dans l'essai S). Par contre, l'émergence des diptères témoins est retardée dans les systèmes dynamiques. Elle commence à J13 dans l'expérience S et à J16 dans l'expérience D. Il en résulte que l'émergence cumulée des chironomes témoins à chaque jour est significativement supérieure dans l'essai S ($p(\text{J14}) = 7.5 \cdot 10^{-5}$, $p(\text{J16}) = 5.3 \cdot 10^{-10}$, $p(\text{J19}) = 1.1 \cdot 10^{-4}$, $p(\text{J21}) = 0.016$, test de Fisher). Notons néanmoins qu'à la fin de l'expérience S, tous les chironomes témoins vivants ont émergé. Si l'on compare le nombre d'émergent cumulé à J21 dans l'expérience S et J22 dans l'expérience D, on ne trouve pas de différence significative ($p = 0.26$, test de Fisher).

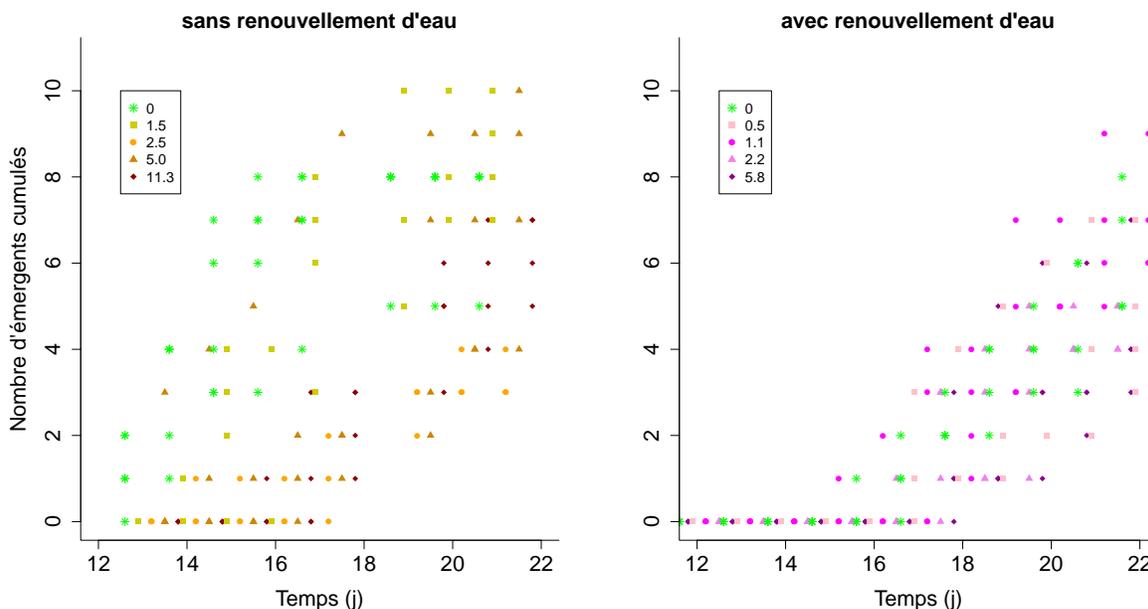


FIGURE 4.30 – Evolution du nombre de chironomes émergents total cumulé au cours des essais sans et avec renouvellement d’eau en fonction de la concentration moyenne en cadmium dans le microcosme durant la période d’exposition (points expérimentaux)

La meilleure survie des chironomes témoins dans l’expérience D peut être expliquée par l’amélioration des conditions d’essai, et notamment l’évacuation d’un certain nombre de substances toxiques contenues dans l’eau. On peut supposer qu’il existe des échanges entre la colonne d’eau et l’eau interstitielle du sédiment, favorisés par le brassage du sédiment par les organismes benthiques, et que le renouvellement de la colonne d’eau a alors un effet indirect sur l’eau interstitielle du sédiment.

Le retard de l’émergence des chironomes peut être en partie expliqué par une différence d’âge des larves initialement introduites. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait réaliser un essai témoin, avec les mêmes masses initiales, avec 2 traitements : avec et sans renouvellement d’eau. Néanmoins, cette hypothèse ne peut pas expliquer un décalage de 3 jours. Une deuxième hypothèse est que ce retard est dû à un plus faible apport de nourriture dans l’expérience D autour du 10^{ème} jour de l’essai. En effet, avec le renouvellement de l’eau, la quantité d’algues accumulée à la surface du sédiment est plus faible (observation qualitative), car une bonne partie des algues sont évacuées avec l’eau. Dans les microcosmes statiques, un dépôt important d’algues se forme suite au bloom survenant autour du 7^{ème} jour de l’essai. Ceci constitue une importante réserve de nourriture pour les organismes benthiques.

4.2.5.2 Effet du cadmium

Aucun effet n’a pu être mis en évidence, avec des tests d’hypothèse sur la survie des chironomes à la fin des expériences S et D. En ce qui concerne l’émergence cumulée des chironomes, il y a un effet global dans l’expérience S de J14 à J21 (anova), mais on ne peut mettre en évidence de différence entre un traitement particulier et les témoins. Dans l’expérience D, aucun effet sur l’émergence cumulée n’a pu être montré. Pour les deux paramètres, les $NOEC_m$ sont donc supérieures à 11.3 et

5.8 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de cadmium dans les expériences S et D respectivement ($\text{NOEC} > 80$ et $10 \mu\text{g.l}^{-1}$).

Dans ces essais en microcosme, les chironomes sont donc moins sensibles au cadmium que les hyalles et les daphnies, ce qui est cohérent avec les résultats de la littérature [151, 117].

Chapitre 5

Conclusion

Synthèse des principaux résultats

Apport du développement de la méthodologie d'essai LAMs

Le développement méthodologique préalable de l'essai en microcosme statique LAMs nous a permis d'améliorer la survie et le développement de certains organismes ainsi que la réplicabilité de certains paramètres. Le suivi de la densité algale mis en place donne des informations intéressantes. Néanmoins, la variabilité de cet essai reste importante et dépendante de l'expérience de l'expérimentateur. L'étude de cette variabilité nous a permis de mieux comprendre le fonctionnement des microcosmes.

Apport du renouvellement d'eau

La mise en place du renouvellement d'eau permet de résoudre un grand nombre des problèmes précédemment soulevés [53]. L'essai LAMd permet de stabiliser certains paramètres physico-chimiques (conductivité, concentration en calcium et en nutriments) et d'éliminer les métabolites issues de la dégradation de la matière organique. Il permet également de stabiliser la densité algale dans la colonne d'eau au cours de l'essai. La croissance des producteurs primaires ainsi que la survie des consommateurs primaires est meilleure dans les microcosmes où l'eau est renouvelée continuellement. La croissance et la reproduction des daphnies sont également améliorées par le renouvellement d'eau. Enfin, la réplicabilité des paramètres suivis est nettement meilleure dans l'essai LAMd développé au cours de ce travail. Le renouvellement de l'eau nous permet donc d'atteindre nos principaux objectifs initiaux : réduire la variabilité et améliorer le développement des organismes introduits.

De plus, le renouvellement d'eau offre un certain nombre de nouvelles possibilités. La stabilisation des conditions physico-chimiques et de la densité algale offre la possibilité de réaliser des essais sur une période plus longue. L'apport continu d'eau permet de prélever des échantillons d'eau plus importants pour effectuer des mesures, alors que nous étions relativement restreints dans le système statiques. Le renouvellement d'eau en continu permet de ne pas aérer les systèmes. Ceci élimine une source de variabilité étant donné que les systèmes de bullage ne permettraient pas de mettre en place une aération homogène dans l'ensemble des systèmes. De plus, on peut alors suivre la respiration des

systèmes, la teneur en oxygène dissous ne dépendant plus de l'aération (qui était variable). Il offre également de nouvelles possibilités d'exposition aux contaminants. On peut notamment maintenir une concentration constante en polluant dans l'eau ou introduire des contaminants de manières ponctuelles. Certains paramètres peuvent également être dosés en continus dans le flux sortant [116]. Enfin, cet essai devrait être moins sensible à la variabilité introduite par l'expérimentateur, aussi bien au début qu'en cours d'essai.

Apport du cadre de modélisation

La modélisation développée avec les collègues du LBBE permet de comparer des expériences avec des profils d'exposition différents, alors que ce n'est pas possible avec les analyses classiques (NOEC, EC50). Dans notre cas, on montre que la sensibilité des daphnies au cadmium est similaire dans l'expérience statique S, avec un apport ponctuel initial de cadmium et dans l'essai dynamique D, avec un apport continu de cadmium. Ce modèle nous permet également montrer que la survie, la croissance et la reproduction des daphnies est meilleure dans l'expérience avec renouvellement d'eau, alors que les tests statistiques classiques ne permettaient pas de conclure à des différences significatives.

Perspectives du développement de l'essai

Milieu microcosme

Dans un souci de standardisation de l'outil, l'EDTA a été retiré de la solution d'oligoéléments du milieu microcosme afin d'éviter la complexation d'éléments métalliques par cet agent chélatant, ce qui entrainerait une diminution de la capacité de l'essai à détecter un effet en présence d'effluents complexes de composition inconnue. Le problème est alors que la solution d'oligoéléments n'est pas entièrement dissoute et que des éléments précipitent et ne sont donc plus disponibles pour les organismes vivants. Ce problème est en partie résolu par l'apport continu d'oligoéléments lors des essais avec renouvellement d'eau.

Comme de nombreux autres agents complexants sont présents dans la colonne d'eau des microcosmes (matière organique, colloïdes et particules en suspension,...), il serait intéressant d'évaluer la part de métaux complexés par l'EDTA par rapport aux autres agents complexants dans le microcosme, grâce à un logiciel permettant de modéliser la spéciation. Dans le cas d'essais dont la composition de la matrice contaminée est connue, on pourrait envisager d'introduire de l'EDTA dans le milieu, car l'exposition peut alors être modélisée.

La composition actuelle du milieu microcosme étant basée sur d'anciennes références, il serait intéressant de retravailler cette composition avec l'aide de géochimistes. On pourrait également envisager de réaliser des tests avec le milieu COMBO, développé pour favoriser à la fois le développement d'algues et de zooplancton [95].

Introduction des organismes

Au lieu d'introduire les organismes à J0 dans des systèmes contaminés, on pourrait envisager de perturber des écosystèmes reconstitués préalablement, comme dans les essais en microcosme développés par Taub [156]. Ce choix peut permettre d'éliminer les systèmes dont le fonctionnement s'éloignerait de la moyenne avant contamination par une sélection initiale. De plus, il permet d'observer les effets de l'apport d'une matrice potentiellement toxique sur un système non contaminé. Cependant, ce choix serait surtout pertinent sur des systèmes de taille plus importante, avec des durées d'essai plus longue et l'observation de populations plus grandes.

Automatisation de certaines acquisitions

Le développement de l'automatisation de mesures physico-chimiques permettrait de faire gagner un temps précieux à l'expérimentateur qui pourrait alors se focaliser sur d'autres mesures. Un suivi en continu de certains paramètres physico-chimiques donnerait également plus d'informations sur l'évolution des microcosmes.

Choix des paramètres mesurés

Il serait intéressant de mener parallèlement une réflexion sur les paramètres à mesurer ainsi que la fréquence et le jour des mesures, en se basant sur les résultats obtenus jusqu'à ce jour, en fonction des questions auxquelles on souhaite répondre. On pourra envisager de suivre de nouveaux paramètres, comme des paramètres globaux (respiration), des paramètres sur les communautés microbiennes (notamment biomasse, diversité microbienne, activités enzymatiques) ou de nouveaux paramètres sublétaux sur certains organismes.

Fin d'essai

Il a été décidé de ne plus faire de sacrifices en cours d'essai. La difficulté de ce protocole sans sacrifice vient du fait qu'il est nécessaire de mesurer, dans un temps restreint, de nombreux paramètres sur un grand nombre de microcosmes à la fin de l'essai. Lorsque l'expérimentateur est seul, la fin de l'essai s'étale donc en réalité sur plusieurs jours, surtout si les organismes se sont abondamment développés. On pourrait donc tenir compte de cette réalité et prévoir une fin d'essai étalée dans le temps. Par exemple, on pourra mesurer à J19 les paramètres physico-chimiques, à J20 les paramètres sur les lentilles d'eau, à J21 la survie, la reproduction et la croissance des daphnies, à J22 récupérer les organismes benthiques (éventuellement les mesurer) et le sédiment. Ceci nécessite donc de démarrer l'essai en début de semaine.

Vers plus de réalisme

Les essais LAM permettent d'effectuer des évaluations d'impact environnemental sur des substances avant qu'elles ne soient rejetées dans l'environnement. Cependant, ces essais de laboratoire, réalisés dans des conditions artificielles, induisent parfois des comportements qui sont peu répandus

dans le milieu naturel. Dans les microcosmes, les hyalles restent, par exemple, soumise à une forte intensité lumineuse, et n'ont d'autre refuge que le sédiment [178]. Dans la mesure du possible, il est donc conseiller de les compléter par des investigations de terrain.

Accorder plus d'importance à l'exploitation des données recueillies et au développement théorique

Le protocole expérimental a été largement développé depuis la création de l'outil en 1998 et nous y avons contribué au cours de ce travail. Par contre, moins d'efforts ont été entrepris dans le traitement statistique des données, la modélisation et la compréhension théorique du fonctionnement du système et du stress chimique. Dans ce travail, seule une petite fraction des données collectées ont pu être analysées. Dans le souci de réduire l'utilisation des organismes et de tirer parti de l'ensemble des informations recueillies, il semble souhaitable, dans les prochains travaux, de réduire le nombre d'expériences conduites et de développer parallèlement l'exploitation qui en est faite. Il serait aussi judicieux de plus réfléchir à la manière d'analyser les données au moment de la définition du plan expérimental.

De nombreux auteurs plaident pour une meilleure intégration du développement théorique et de ses applications pour la prédiction et la gestion du stress chimique dans les systèmes naturels, comme Forbes et Calow [72]. Pour ces derniers, en 1997, l'étude de la réponse des populations aux stress chimique était une science très descriptive. C'est encore le cas aujourd'hui dans un certain nombre d'études. Etre capable de prédire les réponses des populations aux produits chimiques et de comprendre les mécanismes qui permettent aux organismes de s'adapter, peut contribuer au développement des théories dans le domaine de l'écologie et de l'évolution. Ceci pourrait également conduire à des approches plus efficaces pour minimiser les conséquences indésirables des stress générés par les polluants [72].

La constitution d'une base de données générale et l'analyse de l'ensemble des données récoltées jusqu'ici permettraient de répondre à de nombreuses questions restantes et de mieux appréhender le fonctionnement du système. La prise en compte des interactions au niveau du traitement des données permettrait de donner un résultat global de l'essai.

En terme de modélisation, il serait intéressant d'essayer de modéliser le microcosme avec un système d'équations différentielles afin de mieux comprendre les mécanismes. L'impact du cadmium sur le microcosme pourrait être modélisé grâce à une fonction stress. La modélisation devrait également nous permettre de déterminer si les systèmes sont chaotiques, de tester la sensibilité aux conditions initiales et de prévoir les bifurcations possibles.

Il serait aussi intéressant de poursuivre le travail de modélisation des effets entamé avec les daphnies et de voir s'il est possible de calculer une $NEC_{microcosme}$ qui serait un seuil d'effet intégrant la réponse des différents organismes du microcosme.

Bibliographie

- [1] Standard methods for the examination of water and wastewater - 15th edition, 1980.
- [2] AFNOR. Qualité de l'eau - dosage des ions fluorure, chlorure, nitrite, orthophosphate, bromure, nitrate et sulfate dissous, par chromatographie des ions en phase liquide - partie 1 : méthode applicable pour les eaux faiblement contaminées, norme nf t 90-042, 1995.
- [3] AFNOR. Qualité de l'eau - dosage par chromatographie ionique des ions Li^+ , NH_4^+ , K^+ , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} et Ba^{2+} dissous - méthode applicable pour l'eau et les eaux résiduaires, norme nf t 90-048, 1999.
- [4] A. A. Agrawal. Algal defense, grazers, and their interactions in aquatic trophic cascades. *Acta Oecologica*, 19(4) :331 – 337, 1998.
- [5] J. D. Allison and T. L. Allison. Partition coefficients for metals in surface water, soil, and waste. Technical report, United States Environmental Protection Agency, Chicago, IL., 2005.
- [6] J.-C. Amiard, C. Amiard-Triquet, S. Barka, J. Pellerin, and P.S. Rainbow. Metallothioneins in aquatic invertebrates : Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 76(2) :160 – 202, 2006.
- [7] G. T. Ankley, D. A. Benoit, R. A. Hoke, E. N. Leonard, C. W. West, G. L. Phipps, V. R. Mattson, and L. A. Anderson. Development and evaluation of test methods for benthic invertebrates and sediments : Effects of flow rate and feeding on water quality and exposure conditions. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 25 :12 – 19, 1993.
- [8] G.T. Ankley, M.K. Schubauer-Berigan, and P.D. Monson. Influence of pH and hardness on toxicity of ammonia to the amphipod *Hyaella azteca*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52 :2078 – 2083, 1996.
- [9] S. C. Antunes, B. B. Castro, and F. Gonçalves. Chronic responses of different clones of *Daphnia longispina* (field and ehippia) to different food levels. *Acta Oecologica*, 24(Supplement 1) :S325 – S332, 2003. Proceedings of the Plankton Symposium, Espinho, Portugal.
- [10] Donald J. B., Ian B., Mairead B., A. M. V. M. Soares, and P. Calow. A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 21(3) :257 – 265, 1991.
- [11] D. J. Baird, I. Barber, M. Bradley, P. Calow, and A. M. V. M. Soares. The *Daphnia* bioassay : a critique. *Hydrobiologia*, 188 - 189(1) :403 – 406, 1989.

- [12] C. Barata, S. J. Markich, D. J. Baird, G. Taylor, and A. M. V. M. Soares. Genetic variability in sublethal tolerance to mixtures of cadmium and zinc in clones of *Daphnia magna Straus*. *Aquatic Toxicology*, 60(1-2) :85 – 99, 2002.
- [13] Carlos Barata, Scott J. Markich, Donald J. Baird, and Amadeu M. V. M. Soares. The relative importance of water and food as cadmium sources to *Daphnia magna Straus*. *Aquatic Toxicology*, 61(3-4) :143 – 154, 2002.
- [14] I. Barber, D. J. Baird, and P. Calow. Clonal variation in general responses of *Daphnia magna Straus* to toxic stress. II. Physiological effects. *Functional Ecology*, 4(3) :409 – 414, 1990.
- [15] Larry Bartlett, Fred W. Rabe, and William H. Funk. Effects of copper, zinc and cadmium on *Selanastrum capricornutum*. *Water Research*, 8(3) :179 – 185, 1974.
- [16] Rémy Bayard. *Etude de l'adsorption/désorption de polluants organiques dans les sols. Approche méthodologique et application au pentachlorophénol et aux hydrocarbures aromatiques polycycliques*. PhD thesis, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, 1997.
- [17] C. Belgis and P. Guido. Cyst-based toxicity tests. XI. Influence of the type of food on the intrinsic growth rate of the rotifer *Brachionus calyciflorus* in short-chronic toxicity tests. *Chemosphere*, 50(3) :365 – 372, 2003.
- [18] R. B. Benjamin, R. Brown, M. Fraizer, B. M. Joab, R. E. Casey, and S. J. Klaine. Algal growth rate fluctuations observed under uniform ambient test conditions using static and semicontinuous assay techniques. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(3) :460 – 467, 1998.
- [19] R. J. Beyers and H. T. Odum. *Ecological microcosms*. Springer-Verlag, 1993.
- [20] E. Billoir, H. Delhayé, B. Clément, M.L. Delignette-Muller, and S. Charles. Bayesian modelling of daphnid responses to time-varying cadmium exposure in laboratory aquatic microcosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74 :693 – 702, 2010.
- [21] E. Billoir, H. Delhayé, C. Forfait, B. Clément, G. Triffault-Bouchet, S. Charles, and M. L. Delignette-Miller. Comparison of bioassays with different exposure time patterns : the added value of dynamic modelling in predictive ecotoxicology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 75 :80 – 86, 2011.
- [22] W. E. Bishop and R. L. Perry. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment : Fourth Conference*, chapter Development and Evaluation of a Flow-Trough Growth Inhibition Test with Duckweed (*Lemna minor*), pages 421 – 435. American Society for Testing and Materials, 1981.
- [23] C.W.M. Bodar, I. van Der Sluis, P.A. Voogt, and D.I. Zandee. Effects of cadmium on consumption, assimilation and biochemical parameters of *Daphnia magna* : possible implications for reproduction. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C : Comparative Pharmacology*, 90(2) :341 – 346, 1988.
- [24] C. Bonnet, M. Babut, J. F. Féraud, L. Martel, and J. Garric. Assessing the potential toxicity of resuspended sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(5) :1290 – 1296, 2000.
- [25] U. Borgmann. Chronic toxicity of ammonia to the amphipod *Hyaletta azteca* ; importance of ammonium ion and water hardness. *Environmental Pollution*, 86(3) :329 – 335, 1994.

- [26] B. T. A. Bossuyt and C. R. Janssen. Acclimation of *Daphnia magna* to environmentally realistic copper concentrations. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C : Toxicology & Pharmacology*, 136(3) :253 – 264, 2003.
- [27] M. Bray, M. Babut, B. Montuelle, B. Vollat, A. Devaux, C. Delolme, C. Durrieu, J.P. Bedell, and B. Clément B. Evaluation écotoxicologique de sédiments contaminés ou de matériaux de dragage. (iii). application au canal de l'est branche sud. Technical report, Cetmef, Drast et VNF, 2001.
- [28] D. L. Brockway, J. Hill, J. R. Maudsley, and R. R. Lassiter. Development, replicability and modeling of naturally derived microcosms. *International Journal of Environmental Studies*, 13(2) :149 – 158, 1979.
- [29] A. C. Brooks, P. N. Gaskell, and L. L. Maltby. Sublethal effects and predator-prey interactions : implications for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(11) :2449 – 2457, 2009.
- [30] R. L. Burks, E. Jeppesen, and D. M. Lodge. Littoral zone structures as textit *Daphnia* refugia against fish predators. *Limnology and Oceanography*, 46(2) :230 – 237, 2001.
- [31] R. L. Burks, D. M. Lodge, E. Jeppesen, and T. L. Lauridsen. Diel horizontal migration of zooplankton : costs and benefits of inhabiting the littoral. *Freshwater Biology*, 47 :343 – 365, 2002.
- [32] G. A. Jr. Burton. Artificial sediments : Current issues for standardization. Technical report, Institute for Environmental Quality - Wright State University - Dayton, Ohio, U.S.A, 1996.
- [33] A. Cambien. Une introduction à l'approche systémique. Technical report, Centre d'études sur les réseaux, les transports, l'urbanisme et les constructions publiques (CERTU), 2007.
- [34] P. G. C. Campbell and Y. Couillard. *Ecotoxicologie moléculaire. Principes fondamentaux et perspectives de développement*, chapter Prise en charge et detoxication des métaux chez les organismes aquatiques. Presses de l'Université du Québec, 2004.
- [35] P. G. C. Campbell, O. Errécalde, C. Fortin, V. P. Hiriart-Baer, and B. Vigneault. Metal bioavailability to phytoplankton - applicability of the biotic ligand model. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C : Toxicology & Pharmacology*, 133(1-2) :189 – 206, 2002.
- [36] Environnement Canada. Méthode d'essai biologique : essai de survie et de croissance des larves dulcicoles de chironomes (*Chironomus tentans* ou *Chironomus riparius*) dans les sédiments. spe 1/rm/32, 1997.
- [37] Environnement Canada. Méthode d'essai biologique : essai de survie et de croissance de l'amphipode dulcicole *Hyalella azteca* dans les sédiments. spe 1/rm/33, 1997.
- [38] Conseil canadien des ministres de l'environnement. Recommandations canadiennes pour la qualité des eaux : protection de la vie aquatique - ammoniac. pages 1 – 8, 2010.
- [39] M. Canli. Dietary and water-borne zn exposures affect energy reserves and subsequent zn tolerance of *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C : Toxicology & Pharmacology*, 141(1) :110 – 116, 2005.

- [40] T. Caquet, L. Lagadic, G. Monod, J.-C. Lacaze, and A. Couté. Variability of physicochemical and biological parameters between replicated outdoor freshwater lentic mesocosms. *Ecotoxicology*, 10(1) :51 – 66, February 2001.
- [41] N. Cauzzi. *Evaluation de l'éco-compatibilité de sédiments contaminés, traités et non traités par un procédé physico-chimique, dans le cadre d'un scénario de dépôt en gravière - Etude en microcosmes aquatiques*. PhD thesis, Université de Lyon - Institut National de Sciences Appliquées, 2007.
- [42] CEAEQ. Détermination de la toxicité : inhibition de la croissance chez l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata*, ma. 500 - p.sub 1.0, 2005.
- [43] CEAEQ. Méthode d'analyse : détermination de la toxicité létale cl50 48h - *Daphnia magna*, ma. 500 - d.mag 1.0, 2005.
- [44] G. T. Chandler, B. C. Coull, N. V. Schizas, and T. L. Donelan . A culture-based assessment of the effects of chlorpyrifos on multiple meiobenthic copepods using microcosms of intact estuarine sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16 :2339 – 2346, 1997.
- [45] P. M. Chapman, R. R. Goulet, and F. Wang. Response to borgmann et al. (2005) : Sediment toxicity testing with *Hyalella azteca*. *Chemosphere*, 61(11) :1744 – 1745, 2005.
- [46] A. L. Charles, S. J. Markich, J. L. Stauber, and L. F. De Filippis. The effect of water hardness on the toxicity of uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Aquatic Toxicology*, 60(1-2) :61 – 73, 2002.
- [47] P. Chazal. Evaluation de la toxicité de l'ammoniaque sur un macro-invertébré d'eau douce : *Chironomus riparius* en fonction du stade larvaire et du temps d'exposition. Master's thesis, 1999.
- [48] C. Y. Chen and K. C. Lin. Optimization and performance evaluation of the continuous algal toxicity test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16 :1337 – 1344, 1997.
- [49] Chung-Yuan Chen, Kuo-Ching Lin, and Der-Tai Yang. Comparison of the relative toxicity relationships based on batch and continuous algal toxicity tests. *Chemosphere*, 35(9) :1959 – 1965, 1997.
- [50] A. Ciutat, M. Gerino, N. Mesmer-Dudons, P. Anschutz, and A. Boudou. Cadmium bioaccumulation in tubificidae from the overlying water source and effects on bioturbation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(3) :237 – 246, 2005.
- [51] M. Cleuvers and H.-T. Ratte. Phytotoxicity of coloured substances : is lemna duckweed an alternative to the algal growth inhibition test ? *Chemosphere*, 49 :9 – 15, 2002.
- [52] B. Clément. *La toxicité aiguë des lixivats de décharge - Apports respectifs et complémentarité des approches biologiques et physico-chimiques*. PhD thesis, Université de Savoie, Chambéry, 1994.
- [53] B. Clément. *Apport des essais en microcosmes aquatiques lentiennes de laboratoire à l'évaluation écotoxicologique des polluants. Rapport HDR*. 2006.
- [54] B. Clément and C. Cadier. Development of a new laboratory freshwater/sediment microcosm test. *Ecotoxicology*, 7(5) :279 –290, 1998.

- [55] B. Clément and S. Zaid. A new protocol to measure the effects of toxicants on daphnid-algae interactions. *Chemosphere*, 55(10) :1429 – 1438, 2004.
- [56] S. A. Collyard, G. T. Ankley, R. A. Hoke, and T. Goldenstein. Influence of age on the relative sensitivity of *Hyalella azteca* to diazinon, alkylphenol ethoxylates, copper, cadmium, and zinc. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 26(1) :110 – 113, 1994.
- [57] Y. Crouau and L. Cazes. What causes variability in the folsomia candida reproduction test? *Applied Soil Ecology*, 22(2) :175 – 180, 2003.
- [58] N. Dirilgen. Effects of pH and chelator EDTA on Cr toxicity and accumulation in *Lemna minor*. *Chemosphere*, 37(4) :771 – 783, 1998.
- [59] G. Donnadieu, D. Durand, D. Neel, E. Nunez, and L. Saint-Paul. L'approche systémique : de quoi s'agit-il? Technical report, AFSCET, 2003.
- [60] J. Drexler, N. Fisher, G. Henningsen, R. Lanno, J. McGeer, and K. Sappington. Issue paper on the bioavailability and bioaccumulation of metals. Technical report, United States Environmental Protection Agency, Chicago, IL., 2003.
- [61] S. M. Driever, E. H. van N., and R. M.M. Roijackers. Growth limitation of *Lemna minor* due to high plant density. *Aquatic Botany*, 81(3) :245 – 251, 2005.
- [62] W. Drost, M. Matzke, and T. Backhaus. Heavy metal toxicity to *Lemna minor* : studies on the time dependence of growth inhibition and the recovery after exposure. *Chemosphere*, 67(1) :36 – 43, 2007.
- [63] Y. Duan, S. I. Guttman, J. T. Oris, and A. J. Bailer. Differential survivorship among allozyme genotypes of *Hyalella azteca* exposed to cadmium, zinc or low pH. *Aquatic Toxicology*, 54(1-2) :15 – 28, 2001.
- [64] B.-P. Elendt. Influence of water composition on the chronic toxicity of 3,4-dichloroaniline to *Daphnia magna*. *Water Research*, 24(9) :1169 – 1172, 1990.
- [65] B.-P. Elendt and W.-R. Bias. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *Daphnia magna*. *Water Research*, 24(9) :1157 – 1167, 1990.
- [66] K. Emerson, R.C. Russo, R.E. Lund, and R.V. Thurston. Aqueous ammonia equilibrium calculations : effect of ph and temperature. *Journal of Fisheries and Research Board of Canada*, 32 :2379 – 2383, 1975.
- [67] L. Enserink, M. de la Haye, and H. Maas. Reproductive strategy of *Daphnia magna* : implications for chronic toxicity tests. *Aquatic Toxicology*, 25(1-2) :111 – 123, 1993.
- [68] L. Enserink, W. Luttmer, and H. Maas-Diepeveen. Reproductive strategy of *Daphnia magna* affects the sensitivity of its progeny in acute toxicity tests. *Aquatic Toxicology*, 17(1) :15 – 25, 1990.
- [69] O. Errécalde, M. Seidl, and P. G. C. Campbell. Influence of a low weight metabolite (citrate) on the toxicity of cadmium and zinc to the unicellular green alga *selenastrum capricornutum* : an exception to the free-ion model. *Water Research*, 32 :419 – 429, 1998.

- [70] W.-H. Fan, G. Tang, C.-M. Zhao, Y. Duan, and R. Zhang. Metal accumulation and biomarker responses in *Daphnia magna* following cadmium and zinc exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(2) :305 – 310, 2009.
- [71] David A. Flemer, Barbara F. Ruth, Charles M. Bundrick, and James C. Moore. Laboratory effects of microcosm size and the pesticide chlorpyrifos on benthic macroinvertebrate colonization of soft estuarine sediments. *Marine Environmental Research*, 43(4) :243 – 263, 1997.
- [72] V. E. Forbes and P. Calow. *Environmental Stress, Adaptation and Evolution*, chapter Responses of aquatic organisms to pollutant stress : theoretical and practical implications. 1997.
- [73] V. E. Forbes and T. L. Forbes. *Ecotoxicologie - Théorie et applications*. 1997.
- [74] B. Fraysse, O. Geffard, B. Berthet, H. Quéau, S. Biagianti-Risbourg, and A. Geffard. Importance of metallothioneins in the cadmium detoxification process in *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C : Toxicology & Pharmacology*, 144(3) :286 – 293, 2006.
- [75] J. M. García. *Theory and Practical Exercises of System Dynamics*. 2006.
- [76] J. Gardiner. Complexation of trace metals by ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in natural waters. *Water Research*, 10(6) :507 – 514, 1976.
- [77] Olivier Geffard, Alain Geffard, Arnaud Chaumot, Bernard Vollat, Cathy Alvarez, Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin, and Jeanne Garric. Effect of chronic dietary and waterborne cadmium exposures on the contamination level and reproduction of *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(5) :1128 – 1134, 2008.
- [78] J. P. Giesy and P. M. Allred. *Multispecies Toxicity Testing*, chapter Replicability of aquatic Multispecies test systems, pages 187 – 247. 1985.
- [79] P. L. Gillis and C. M. Wood. The effect of extreme waterborne cadmium exposure on the internal concentrations of cadmium, calcium, and sodium in *Chironomus riparius* larvae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(1) :56 – 64, 2008.
- [80] Richard R. Goulet, Susannah Krack, Patrick J. Doyle, Landis Hare, Bernard Vigneault, and James C. McGeer. Dynamic multipathway modeling of cd bioaccumulation in *Daphnia magna* using waterborne and dietborne exposures. *Aquatic Toxicology*, 81(2) :117 – 125, 2007.
- [81] R. Grade, J. Gonzalez-Valero, P. Höcht, and V. Pfeifle. A higher tier flow-through toxicity test with the green alga *Selenastrum capricornutum*. *Science of The Total Environment*, 247(2-3) :355 – 361, 2000.
- [82] R. Guan and W.-X. Wang. Comparison between two clones of *Daphnia magna* : Effects of multigenerational cadmium exposure on toxicity, individual fitness, and biokinetics. *Aquatic Toxicology*, 76(3-4) :217 – 229, 2006.
- [83] Rui Guan and Wen-Xiong Wang. Cd and zn uptake kinetics in *Daphnia magna* in relation to cd exposure history. *Environmental Science & Technology*, 38(22) :6051 – 6058, 2004. PMID : 15573606.
- [84] L. Guilhermino, T. C. Diamantino, R. Ribeiro, F. Gonçalves, and A. M. V. M. Soares. Suitability of test media containing EDTA for the evaluation of acute metal toxicity to *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 38 :292 – 295, 1997.

- [85] L. Guilhermino, M. C. Lopes, A. P. Carvalho, and A. M.V.M. Soares. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 32(4) :721 – 738, 1996.
- [86] L. Guilhermino, O. Sobral, C. Chastinet, R. Ribeiro, F. Gonialves, M. C. Silva, and A. M. V. M. Soares. A *Daphnia magna* first-brood chronic test : An alternative to the conventional 21-day chronic bioassay? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 42 :67 – 74, 1999.
- [87] A. Hastings, C. L. Hom, S. Ellner, P. Turchin, and H. C. J. Godfray. Chaos in ecology : Is mother nature a strange attractor? *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24(1) :1 – 33, 1993.
- [88] D. O. Hessen, N. E.W. Alstad, and L. Skardal. Calcium limitation in *Daphnia magna*. *Journal of Plankton Research*, 22(3) :553 – 568, 2000.
- [89] W. S. Hillman. The lemnaceae, or duckweeds. *Botanical Review*, 27 :221 – 287, 1961.
- [90] W. S. Hillman. Calibrating duckweeds : light, clocks, metabolism, flowering. *Science*, 193 :453 – 458, 1976.
- [91] ICA. (2011). International Cadmium Association. Site Internet : <http://www.cadmium.org/>.
- [92] D. B. Huebert, B. S. Dyck, and J. M. Shay. The effect of EDTA on the assessment of Cu toxicity in the submerged aquatic macrophyte, *Lemna trisulca* L. *Aquatic Toxicology*, 24(3-4) :183 – 194, 1993.
- [93] B. P. Jackson, P. J. Lasier, W. P. Miller, and P. W. Winger. Effects of calcium, magnesium, and sodium on alleviating cadmium toxicity to *Hyaella azteca*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 64 :279 – 286, 2000.
- [94] N. E. Kemble, F. J. Dwyer, C. G. Ingersoll, T. D. Dawson, and T. J. Norberg-King. Tolerance of freshwater test organisms to formulated sediments for use as control materials in whole-sediment toxicity tests. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(2) :222 – 230, 1999.
- [95] S. Kilham, D. Kreeger, S. Lynn, C. Goulden, and L. Herrera. Combo : a defined freshwater culture medium for algae and zooplankton. *Hydrobiologia*, 377(1) :147 – 159, 1998.
- [96] S. D. Kim, H. Ma, H. E. Allen, and D. K. Cha. Influence of dissolved organic matter on the toxicity of copper to *C. dubia* : Effect of complexation kinetics. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18 :2433 – 2437, 1999.
- [97] M. Knops, R. Altenburger, and H. Segner. Alterations of physiological energetics, growth and reproduction of *Daphnia magna* under toxicant stress. *Aquatic Toxicology*, 53(2) :79 – 90, 2001.
- [98] S. Kooijman and J. Bedaux. *The analysis of aquatic toxicity data*. VU University Press, Amsterdam, 1996.
- [99] S. A. L. M. Kooijman and J. J. M. Bedaux. Some statistical properties of estimates of no-effect concentrations. *Water Research*, 30(7) :1724 – 1728, 1996.
- [100] J. A. Kostel, H. Wang, A. L. S. Amand, and K. A. Gray. 1. use of a novel laboratory stream system to study the ecological impact of pcb exposure in a periphytic biolayer. *Water Research*, 33 :3735 – 3748, 1999.

- [101] R. Kottelat. *Caractérisation physicochimique de microcosmes alimentés en continu et leur utilisation dans l'étude des voies d'exposition de Cd et Cr(III) chez Daphnia magna*. PhD thesis, Université de Genève - Institut F. A. Forel, 2008.
- [102] R. Kottelat, D. A. L. Vignati, A. Garcia-Bravo, J. Dominik, and B. J. D. Ferrari. Characterization of trace element geochemistry in continuous flow-through microcosms : A preliminary step to environmentally meaningful ecotoxicological experiments. *Chemosphere*, 81(11) :1407 – 1415, 2010.
- [103] B. Koukal, C. Guéguen, M. Pardos, and J. Dominik. Influence of humic substances on the toxic effects of cadmium and zinc to the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Chemosphere*, 53(8) :953 – 961, 2003.
- [104] M. Kretzschmar, R. M. Nisbet, and E. Mccauley. A predator-prey model for zooplankton grazing on competing algal populations. *Theoretical Population Biology*, 44(1) :32 – 66, 1993.
- [105] K. H. M. Kwan and S. Smith. Accumulated forms of thallium and cadmium in *Lemna minor*. i. distribution in aqueous soluble and insoluble fractions. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 2 :77 – 84, 1990.
- [106] S. Lagarde. Réalisation d'une batterie d'essais de toxicité aquatique en présence de cadmium. Master's thesis, CEAEQ, 2007.
- [107] W. Lampert. Feeding and nutrition in *Daphnia*. In R. H. Peters and R. De Bernardi, editors, *Daphnia*. 1987.
- [108] J. H. Larson, P. C. Frost, and G. A. Lamberti. Variable toxicity of ionic liquid-forming chemicals to *Lemna minor* and the influence of dissolved organic matter. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(3) :676 – 681, 2008.
- [109] J. R. Lauth, S. D. Dyer, S. E. Belanger, and D. S. Cherry. A novel flow-through method for toxicity assessments using *C. dubia*. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 11 :335 – 343, 1996.
- [110] K. C. Lin, C. I. Lin, and C. Y. Chen. The effect of limiting nutrient on metal toxicity to selenastrum capricornutum. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 56 :47 – 61, 1996.
- [111] K. R. Lum. *Cadmium in the aquatic environment*, chapter Cadmium in Fresh Waters : the Great Lakes and St Lawrence River, pages 35 –50. John Wiley and Sons, 1987.
- [112] H. Ma, S. D. Kim, D. K. Cha, and H. Allen. Effects of kinetics of complexation by humic acid on toxicity of copper to *c. dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18 :828 – 837, 1999.
- [113] F. Maloney. Influence de paramètres physico-chimiques (dureté, pH et présence d'un agent chélateur, l'EDTA) sur la réponse toxique au cadmium de l'algue verte d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata*. Master's thesis, Université du Québec - INRS-Eau, Terre et Environnement, 2007.
- [114] S. J. Markich, A. R. King, and S. P. Wilson. Non-effect of water hardness on the accumulation and toxicity of copper in a freshwater macrophyte (*Ceratophyllum demersum*) : How

- useful are hardness-modified copper guidelines for protecting freshwater biota? *Chemosphere*, 65(10) :1791 – 1800, 2006.
- [115] Mate. *Biologie et écologie des espèces végétales proliférant en France - Synthèse bibliographique*. Les études des Agences de l'Eau, 1997.
- [116] P. G. Meier, W.-H. Hong, and R. A. Deininger. Application of tracer techniques to continuous-flow toxicity testing. *Water Research*, 21(10) :1259 – 1264, 1987.
- [117] D. Milani, T. B. Reynoldson, U. Borgmann, and J. Kolasa. The relative sensitivity of four benthic invertebrates to metals in spiked-sediment exposures and application to contaminated field sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(4) :845 – 854, 2003.
- [118] T. Miller-Way and R. R. Twiley. Theory and operation of continuous flow systems for the study of benthic-pelagic coupling. *Marine Ecology-Progress Series*, 140 :257 – 269, 1996.
- [119] A. Münzinger and F. Monicelli. A comparison of the sensitivity of three *Daphnia magna* populations under chronic heavy metal stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 22(1) :24 – 31, 1991.
- [120] B. T. A. Muysen and C.R. Janssen. Age and exposure duration as a factor influencing cu and zn toxicity toward *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68(3) :436 – 442, 2007.
- [121] B. T. A. Muysen, M. Messiaen, and C. R. Janssen. Combined cadmium and temperature acclimation in *Daphnia magna* : Physiological and sub-cellular effects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(5) :735 – 742, 2010.
- [122] A. V. Nebeker, M. A. Cairns, S. T. Onjukka, and R. H. Titus. Effect of age on sensitivity of *Daphnia magna* to cadmium, copper and cyanazine. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 5(6) :527 – 530, 1986.
- [123] A. V. Nebeker, S. E. Dominguez, G. A. Chapman, S. T. Onjukka, and D. G. Stevens. Effects of low dissolved oxygen on survival, growth and reproduction of *Daphnia*, *Hyalella* and *Gammarus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11(3) :373 – 379, 1992.
- [124] A. V. Nebeker, S. T. Onjukka, M. A. Cairns, and D. F. Krawczyk. Survival of *Daphnia magna* and *Hyalella azteca* in cadmium-spiked water and sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 5(10) :933 – 938, 1986.
- [125] J. O. Nriagu and J. B. Spague. *Cadmium in the environment*. John Wiley & Sons, 1987.
- [126] OECD. Algal growth inhibition test, 201, oecd guideline for testing of chemicals., 1993.
- [127] OECD. Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test, proposal for updating guideline 20, oecd guidelines for the testing of chemicals, 2002.
- [128] OECD. Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicology data : a guidance to application, 2006.
- [129] A. Pavé. *Modélisation en biologie et en écologie*. Aléas, 1994.
- [130] J. E. Petersen, C.-C. Chen, and W. M. Kemp. Scaling aquatic primary productivity : Experiments under nutrient- and light-limited conditions. *Ecology*, 78(8) :2326 – 2338, 1997.

- [131] A. Picado, S. Chankova, A. Fernandes, F. Simões, D. Leverett, I. Johnson, R. Hernan, A. M. Pires, and J. Matos. Genetic variability in *Daphnia magna* and ecotoxicological evaluation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67(3) :406 – 410, 2007.
- [132] V. Raevel. Evaluation des risques écotoxicologiques des résidus d’assainissement routier : application à une boue de bassin d’infiltration. Master’s thesis, Institut National des Sciences Appliquées - Université de Lyon 1, 2007.
- [133] C.R. Rao, editor. *Handbook of statistics*. 2011.
- [134] O. Renard. Gestion des résidus d’assainissement routier : quels risques pour les écosystèmes aquatiques? Master’s thesis, Institut National des Sciences Appliquées - Université de Lyon 1, 2008.
- [135] C. Ritz and J. C. Streibig. Bioassay analysis using r. *Journal of Statistical Software*, 12, 2008.
- [136] K.A. Robinson, D.J. Baird, and F. J. Wrona. Surface metal adsorption on zooplankton carapaces : implications for exposure and effects in consumer organisms. *Environmental Pollution*, 122 :159 – 167, 2003.
- [137] Y. E. Roman, K. A. C. De Schamphelaere, L. T. H. Nguyen, and C. R. Janssen. 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, 2007.
- [138] H. Roussel, L. Ten-Hage, S. Joachim, R. Le Cohu, L. Gauthier, and J.-M. Bonzom. A long-term copper exposure on freshwater ecosystem using lotic mesocosms : Primary producer community responses. *Aquatic Toxicology*, 81(2) :168 – 182, 2007.
- [139] M. Scheffer, S. Rinaldi, Y. A. Kuznetsov, and E. H. van Nes. Seasonal dynamics of *Daphnia* and algae explained as a periodically forced predator-prey system. *Oikos*, 80(3) :519 – 532, 1997.
- [140] M. C.Th. Scholten, E. M. Foekema, H. P. van Dokkum, N. H. B. M. Kaag, and R. G. Jak. *Eutrophication management and ecotoxicology*. Springer Verlag Environmental Sciences Series, 2005.
- [141] G. S. Schuytema, P. O. Nelson, K. W. Malueg, A. V. Nebeker, D. F. Frawczyk, A. K. Ratcliff, and J. H. Gakstatter. Toxicity of cadmium in water and sediment slurries to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 3 :293 – 308, 1984.
- [142] Kim Seefeld and Ernst Linder. *Statistics using R with biological examples*, 2007.
- [143] F. Seguin, C. Leboulanger, F. Rimet, J. C. Druart, and A. Bérard. Effects of atrazine and nicosulfuron on phytoplankton in systems of increasing complexity. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 40 :198 – 208, 2001.
- [144] L. Sigg, P. Beha, and W. Stumm. *Chimie des milieux aquatiques - Chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l’environnement*. Dunod, 4 edition, 2006.
- [145] R. Smolders, M. Baillieul, and R. Blust. Relationship between the energy status of *Daphnia magna* and its sensitivity to environmental stress. *Aquatic Toxicology*, 73(2) :155 – 170, 2005.

- [146] A. Sofyan, J. R. Shaw, and W. J. Birge. Metal trophic transfer from algae to cladocerans and the relative importance of dietary metal exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(4) :1034 – 1041, 2006.
- [147] J. Sorvari and M. Sillanpää. Influence of metal complex formation on heavy metal and free EDTA and dtpa acute toxicity determined by *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 33(6) :1119 – 1127, 1996.
- [148] F. S. Stay, T. E. Flum, L. J. Shannon, and Yount J. D. *Aquatic toxicology and hazard assessment : 12th volume, ASTM STP 1027*, chapter An assessment of the precision and accuracy of SAM and MFC microcosms exposed to toxicants, pages 189 – 203. 1989.
- [149] A. Stuhlbacher, M. C. Bradley, C. Naylor, and P. Calow. Induction of cadmium tolerance in two clones of *Daphnia magna* Straus. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C : Comparative Pharmacology*, 101(3) :571 – 577, 1992.
- [150] B. C. Suedel and J. H. Rodgers Jr. Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13(7) :1163 – 1175, 1994.
- [151] B. C. Suedel, J. H. Rodgers, Jr., and E. Deaver. Experimental factors that may affect toxicity of cadmium to freshwater organisms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 33(2) :188 – 193, 1997.
- [152] K. Sugiura. The use of an aquatic microcosm for pollution effects assessment. *Water Research*, 30(8) :1801 – 1812, 1996.
- [153] K. Sugiura, M. Goto, and Y. Kurihara. Effect of Cu^{2+} stress on an aquatic microcosm : A holistic study. *Environmental Research*, 27(2) :307 – 315, 1982.
- [154] S. Szabó, M. Braun, S. Balázs, and O. Reisinger. Influences of nine algal species isolated from duckweed-covered sewage miniponds on *lemna gibba* l. *Aquatic Botany*, 60(2) :189 – 195, 1998.
- [155] J. E. Taraldsen and T. J. Norberg-King. New method for determining effluent toxicity using duckweed (*Lemna minor*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9(6) :761 – 767, 1990.
- [156] F. B. Taub. Standardized aquatic microcosm - development and testing in aquatic ecotoxicology : fundamentals, concepts and methodologies. In A. Boudou and F. Ribeyre, editors, *Aquatic ecotoxicology : fundamentals, concepts and methodologies*, volume 2, pages 47 – 91. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1989.
- [157] F. B. Taub. Unique information contributed by multispecies systems : examples from the standardized aquatic microcosm. *Ecological Applications*, 7(4) :1103 – 1110, 1997.
- [158] G. Taylor, D. J. Baird, and A. M. V. M. Soares. Surface binding of contaminants by algae : consequences for lethal toxicity and feeding to *Daphnia magna* Straus. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(3) :412 – 419, 1998.
- [159] C. Thellen, C. Blaise, Y. Roy, and C. Hickley . Round robin testing with the selenastrum capricornutum microplate toxicity assay. *Hydrobiologia*, pages 259 – 268, 1989.

- [160] G. Triffault-Bouchet. *Effets sur les écosystèmes aquatiques lenticques des émissions de polluants provenant de différents modes de valorisation/élimination de déchets - Application à des mâchefers d'UIOM et à des boues de dragage de canaux*. PhD thesis, Université de Savoie, 2004.
- [161] G. Triffault-Bouchet. Optimisation de l'outil microcosme. Technical report, CEAEQ, 2006.
- [162] G. Triffault-Bouchet, B. Clément, and G. Blake. Assessment of contaminated sediments with an indoor freshwater/sediment microcosm assay. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(9) :2243 – 2253, 2005.
- [163] G. Triffault-Bouchet, B. Clément, and G. Blake. Ecotoxicological assessment of pollutant flux released from bottom ash reused in road construction. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 8 :405 – 414, 2005.
- [164] G. Triffault-Bouchet, B. Clément, G. Blake, and Y. Perrodin. Evaluation du potentiel écotoxique de percolats de mâchefers d'incinération d'ordures ménagères au laboratoire : Comparaison de bioessais monospécifiques et d'un essai en microcosme. *Déchets sciences et techniques*, 33 :25 – 33, 2004.
- [165] M. T.K. Tsui, W.-X. Wang, and M. H. Wong. Influences of macroalga-derived dissolved organic carbon on the aquatic toxicity of copper and cadmium. *Chemosphere*, 65(10) :1831 – 1835, 2006.
- [166] S. C. Turbak, S. B. Olson, and G. A. McFeters. Comparison of algal assay systems for detecting waterborne herbicides and metals. *Water Research*, 20 :91 – 96, 1986.
- [167] J. Urabe, J. Clasen, and R. W. Sterner. Phosphorus limitation of *Daphnia* growth : Is it real ? *Limnology and Oceanography*, 42(6) :1436 – 1443, 1997.
- [168] USEPA. 1998 update of ambient water quality criteria for ammonia, 1998.
- [169] USEPA. Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. 600/r-99/064, 2000.
- [170] USEPA. 2001 update of ambient water quality criteria for cadmium, 2001.
- [171] USEPA. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms, 4th ed. epa-821-r-02-013, 2002.
- [172] C. Velluet. Modélisation de la dynamique algale dans un microcosme aquatique de laboratoire avec renouvellement d'eau. Master's thesis, Université de Lyon - ENTPE, 2009.
- [173] G. Verrhiest. *Toxicité de sédiments d'eau douce contaminés par des HAPs. Influence de la nature des sédiments sur la biodisponibilité des HAPs*. PhD thesis, Université de Savoie, 2001.
- [174] G. Verrhiest, B. Clément, and G. Merlin. Influence of sediment organic matter and fluoranthene-spiked sediments on some bacterial parameters in laboratory freshwater/formulated sediment microcosms. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 3(3) :359 – 368, 2000.
- [175] G. J. Verrhiest, S. Cortes, B. Clément, and B. Montuelle. Chemical and bacterial changes during laboratory conditioning of formulated and natural sediments. *Chemosphere*, 46(7) :961 – 974, 2002.

- [176] M. Vighi. Lead uptake and release in an experimental trophic chain. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 5(2) :177 – 193, 1981.
- [177] C. H. Walker, S. P. Hopkin, R. M. Sibly, and D. B. Peakall. *Principles of Ecotoxicology*. Taylor and Francis Group, 2006.
- [178] F. Wang, R. R. Goulet, and P. M. Chapman. Testing sediment biological effects with the freshwater amphipod *Hyaella azteca* : the gap between laboratory and nature. *Chemosphere*, 57(11) :1713 – 1724, 2004.
- [179] N. Wang, J. M. Besser, D. R. Buckler, J. L. Honegger, C. G. Ingersoll, B.T. Johnson, M. L. Kurtzweil, J. MacGregor, and M. J. McKee. Influence of sediment on the fate and toxicity of a polyethoxylated tallowamine surfactant system (mon 0818) in aquatic microcosms. *Chemosphere*, 59(4) :545 – 551, 2005.
- [180] W. Wang. Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical*, 11(1) :1 – 14, 1986.
- [181] W. Wang. Ammonia toxicity to macrophytes (common duckweed and rice) using static and renewal methods. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10 :1173 – 1177, 1991.
- [182] M. M. Watts and D. Pascoe. A comparative study of *Chironomus riparius Meigen* and *Chironomus tentans Fabricius* (diptera : Chironomidae) in aquatic toxicity tests. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39 :299 – 306, 2000.
- [183] R. W. Winner. Interactive effects of water hardness and humic acid on the chronic toxicity of cadmium to *Daphnia pulex*. *Aquatic Toxicology*, 8(4) :281 – 293, 1986.
- [184] R. W. Winner and J. D. Gauss. Relationship between chronic toxicity and bioaccumulation of copper, cadmium and zinc as affected by water hardness and humic acid. *Aquatic Toxicology*, 8(3) :149 – 161, 1986.
- [185] R. W. Winner, T. Keeling, R. Yeager, and M. P. Farrell. Effect of food type on the acute and chronic toxicity of copper to *Daphnia magna*. *Freshwater Biology*, 7(4) :343 – 349, 1977.
- [186] J. H. Yim, K. W. Kim, and S. D. Kim. Effect of hardness on acute toxicity of metal mixtures using *Daphnia magna* : Prediction of acid mine drainage toxicity. *Journal of Hazardous Materials*, 138(1) :16 – 21, 2006.
- [187] R.-Q. Yu and W.-X. Wang. Biokinetics of cadmium, selenium, and zinc in freshwater alga *Scenedesmus obliquus* under different phosphorus and nitrogen conditions and metal transfer to *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*, 129(3) :443 – 456, 2004.
- [188] V. Zitko and W. G. Carson. A mechanism of the effects of water hardness on the lethality of heavy metals to fish. *Chemosphere*, 5(5) :299 – 303, 1976.

Annexes

Tableaux récapitulatifs des expériences réalisées

TABLE 5.1 – Tableau récapitulatif des expériences répondant à l’objectif d’amélioration du protocole et de la compréhension de l’essai en microcosme

Objectif général	Exp.	Objectif précis
Optimisation du protocole statique	E1 - E2	Influence de la solution d’oligoéléments du milieu M4 sur le développement des organismes pélagiques
	LmO	Influence de différentes solutions d’oligoéléments et de l’EDTA sur le développement des lentilles d’eau
	E3 - E4	Influence du pourcentage de kaolin dans le sédiment sur la bioturbation et le développement des organismes benthiques
	E5	Influence de l’apport de nourriture en cours d’essai sur le développement des organismes
	EV	Influence de la concentration algale initiale et essai suivi 2ème génération de daphnies
	FFE1 - FFE2	Influence du type d’eau (comparaison eaux naturelles et reconstituées)
	FFS1 - FFS2	Influence de la méthode d’introduction de l’eau et du sédiment et influence concentration Tétramin®
Mise en place renouvellement d’eau	FOPs	Caractérisation de la dynamique algale avec renouvellement de l’eau
	FOE1	Caractérisation de la dynamique algale avec renouvellement d’eau dans différentes eaux en présence de sédiment
	FOS1 à FOS3	Comparaison de 3 débits
	FOS4 - FOS5	Essais témoins avec différents apports d’algues
Estimation de paramètres (pour modélisation)	EBDm1 à EBDm3	Estimation du broutage des daphnies
	ESPs1 - ESPs2	Estimation de la sédimentation des algues
	ECPs	Evaluation de la croissance algale

TABLE 5.2 – Tableau chronologique récapitulatif des expériences répondant à l’objectif de comparaison de la réponse des organismes à différents modes d’exposition au cadmium

Objectif général	Exp.	Objectif précis
Comparaison essais mono et multi-spécifiques (Cd)	Ps1 - Ps2	Toxicité chronique du Cd sur les algues
Essais mono-spécifiques	Lm1 - Lm2	Toxicité chronique du Cd sur les lentilles d’eau
	DmAP - DmA1 à DmA3 - DmC1 à DmC4	Toxicité du Cd sur les daphnies (essai préliminaire - toxicité aigüe - toxicité chronique)
	HaP - HaA - HaC	Toxicité du Cd sur les hyalles (essai préliminaire - toxicité aigüe - toxicité chronique)
	CrP - CrA - CrC	Toxicité du Cd sur les chironomes (essai préliminaire - toxicité aigüe - toxicité chronique)
Comparaison essais mono et multi-spécifiques (Cd)	ERCd1	Suivi de la répartition du Cd entre les compartiments abiotiques du microcosme - essai préparatoire
Essais multi-spécifiques	ECd1	1er essai multi-sp. avec Cd
	ECd2	2ème essai multi-sp. avec Cd (concentrations plus basses car effets létaux importants lors du premier essai)
	ECd3	3ème essai multi-sp. avec Cd (sans sédiment pour quantifier la croissance algale)
Comparaison sensibilité au Cd (LEHNA/CEAEQ)	FLm	Toxicité chronique du Cd sur les lentilles d’eau
Comparaison méthodes	FDmA1 à FDmA3	Toxicité aigüe du Cd sur les daphnies
Apport renouvellement d’eau	ERCd2	Suivi de la répartition du Cd entre les compartiments abiotiques du microcosme + évaluation de l’adsorption du Cd sur le matériel et précipitation
	ECd4 = S	Essai multi-spécifique statique (Cd)
	ECd5 = D	Essai multi-spécifique avec renouvellement d’eau (Cd)

Remerciements

Je remercie tous les hommes et les femmes qui m'ont accompagnée au cours de ce travail. Je tiens notamment à adresser une chaleureuse gratitude à l'ensemble des personnes rencontrées au cours de ce travail au LSE (LEHNA) et plus largement à l'ENTPE, au CEAEQ, au LBBE, à l'IPNL, à l'INSA de Lyon, à CPE, à l'IRSTEA, à l'INRS, à l'INRA, à l'Université Laval, à l'Université de Lyon, à l'Université de Toulouse, au Cete de Lyon, à la DREAL Rhône-Alpes,... Je remercie aussi ma famille ainsi que mes amis et toutes les autres personnes rencontrées pendant ces années de doctorat. Merci de m'avoir orientée, encouragée, soutenue mais aussi de m'avoir bousculée, destabilisée. Tout ceci m'a permis de progresser.

Plus largement, je remercie l'ensemble des êtres vivants avec lesquels j'ai travaillé, pour ce qu'ils m'ont appris.

Enfin, je remercie la vie pour tout ce qu'elle m'a permis d'expérimenter au travers de cette thèse.

FOLIO ADMINISTRATIF

THESE SOUTENUE DEVANT L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE LYON

NOM : DELHAYE

DATE de SOUTENANCE : 28 septembre 2012

Prénoms : Hélène Laurence Marie

TITRE : Développement d'un bioessai de toxicité chronique en microcosme aquatique de laboratoire et évaluation de l'outil au travers de l'étude des effets du cadmium

NATURE : Doctorat

Numéro d'ordre : 2012ISAL0090

Ecole doctorale : Chimie de Lyon

Spécialité : Environnement

RESUME :

Les approches physico-chimiques étant insuffisantes pour évaluer l'impact de la pollution sur les écosystèmes, de nombreux bioessais, variant de par le niveau d'organisation représenté, ont été développés. Parmi ces essais, on trouve les essais en microcosme aquatique de laboratoire qui sont un compromis entre (1) les essais mono-spécifiques standards de laboratoires, méthodes couramment employées mais très simplifiées et peu représentatives sur le plan écologique et (2) les essais en mésocosme extérieurs, plus représentatifs mais coûteux, lourds à mettre en œuvre, moins répliquables et plus difficile à interpréter.

Dans ce travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'essai initialement développé par Clément et Cadier (1998). Cet outil permet d'évaluer l'effet de substances ou de matrices potentiellement contaminées sur un écosystème artificiel composé d'eau et de sédiment, dans lesquels sont introduites simultanément 5 espèces aquatiques d'eau douce usuellement employées dans des essais de toxicité mono-spécifiques : l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata*, la lentille d'eau *Lemna minor*, la daphnie *Daphnia magna*, l'amphipode *Hyaella azteca* et l'insecte *Chironomus riparius*.

Cet essai en microcosme a été utilisé dans de nombreux projets depuis sa conception mais sa variabilité demeure la principale limite malgré les améliorations successives. Le principal objectif de ce travail était donc d'optimiser l'essai. La principale amélioration testée a été le renouvellement continu de l'eau du système qui a permis de stabiliser les paramètres physico-chimiques de la colonne d'eau des microcosmes et la densité algale, et ainsi d'améliorer le développement des organismes et la répliquabilité de l'essai. Le cadmium a été utilisé comme contaminant modèle afin d'évaluer les développements méthodologiques proposés. La diminution de la variabilité en présence de renouvellement d'eau augmente la capacité à détecter des effets sublétaux sur les organismes pélagiques avec des tests statistiques classiques. Le développement d'un cadre de modélisation dynamique a permis de comparer la sensibilité des daphnies au cadmium dans des expériences aux profils d'exposition différents.

The physico-chemical approaches are insufficient to assess the impact of pollution on ecosystems. Thus many bioassays, varying in the level of organization represented, have been developed, as laboratory aquatic microcosm tests. These tests are a compromise between single-species tests, which are standard laboratory methods commonly used but highly simplified and not very ecologically representative, and outdoor mesocosm tests, which are more representative but more expensive, heavy to implement, less replicable and more difficult to interpret.

In this work, we focused on the bioassay originally developed by Clement and Cadier (1998). This method allows to evaluate the effect of substances or potentially contaminated matrices on an artificial ecosystem consisting of water and sediment in which are introduced simultaneously five freshwater aquatic species commonly used in monospecific toxicity testing : the alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, the duckweed *Lemna minor*, the daphnia *Daphnia magna*, the amphipod *Hyaella azteca* and the insect *Chironomus riparius*.

This test was used in many projects since its conception but its variability remains the main limitation despite successive improvements. The main objective of this study was to optimize the test. The main improvement was continuous renewal of the water system, which helped to stabilize the physico-chemical parameters of the water column and algal density, and thus improve the development of organisms and replicability of the test. Cadmium was used as a model contaminant to evaluate the proposed methodological developments. The decrease in variability in flowthrough microcosms increases the ability to detect sublethal effects on pelagic organisms with conventional statistical tests. The development of a dynamic modeling framework was used to compare the sensitivity of *Daphnia* to cadmium in experiments with different exposure pattern.

MOTS-CLES : microcosme, optimisation, variabilité, renouvellement d'eau, cadmium
microcosm, optimization, variability, flow through system, cadmium

Laboratoire (s) de recherche : Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés
Centre d'expertise et d'analyse environnementale du Québec

Directeur de thèse: CLEMENT Bernard (Professeur des universités)

Président de jury : CHARLES Sandrine (Professeur des universités)

Composition du jury : LAGADIC Laurent (Directeur de recherche)
GAUTHIER Laury (MCF – HDR)
CLEMENT Bernard (Professeur des universités)
BAYARD Rémi (MCF – HDR)
PERRODIN Yves (Directeur de recherche)
TRIFFAULT-BOUCHET Gaëlle - invitée, excusée