



PREDIRE L'IMPACT DES HERBICIDES EN MELANGE ET A FAIBLE CONCENTRATION SUR LES COMMUNAUTES ALGALES PLANCTONIQUES ET BENTHIQUES LACUSTRES.

PREDICT THE IMPACT OF HERBICIDES IN MIXTURE AND AT LOW CONCENTRATION ON PLANKTONIC AND BENTHIC ALGAL COMMUNITIES IN LAKES.

Programme Evaluation et réduction des risques liés à l'utilisation des Pesticides
APR 2009
Rapport final- 01_2014

INRA - UMR CARTEL
Agnès BOUCHEZ
UMR CARTEL
75 avenue de Corzent,
74200 THONON

Date : 07/04/2014

N° de contrat : 29000506
Date du contrat : 11/01/2011



EVALUATION ET REDUCTION DES RISQUES LIES A L'UTILISATION DES PESTICIDES - APR 2009

IMPALAC
PREDIRE L'IMPACT DES HERBICIDES EN MELANGE ET A FAIBLE CONCENTRATION SUR LES COMMUNAUTES ALGALES PLANCTONIQUES ET BENTHIQUES LACUSTRES.

RAPPORT SCIENTIFIQUE

AGNES BOUCHEZ - INRA CARTEL

INRA CARTEL: Frédéric Rimet, Bernard Montuelle, Orlane Anneville, Christian Gillet, Nicolas Bernes, Floriane Larras, Vera Georgescu
UNI Lausanne (CH) : Nathalie Chèvre, Vincent Gregorio
EPFL (CH) : Felipe De Alencastro
Irstea Lyon: Stéphane Pesce



Sommaire

1. Introduction	26
2. Contexte scientifique	27
2.1. Evaluation du risque.....	27
2.2. Modèles pour l'évaluation du risque	28
2.3. Evaluation du risque des mélanges.....	28
2.4. Risque des herbicides.....	29
3. Bilan du projet IMPALAC	30
3.1. Prédiction du risque des mélanges (Approche <i>a priori</i>).....	33
3.1.1. Tests mono-spécifiques :	33
3.1.2. Utilisation des tests dose-effet pour dériver des courbes de distribution de sensibilité des espèces (SSD) et des seuils protecteurs (HC) :.....	37
3.1.3. Utilisation des modèles de mélanges sur les courbes SSD :	40
3.1.4. Courbes SSD basées sur données génériques ou spécifiques:.....	43
3.1.5. Evaluation « First Tier » du risque des mélanges :	45
3.2. Evaluation des impacts des mélanges (Approche <i>a posteriori</i>) :.....	45
3.2.1. Evaluation de l'impact des mélanges au niveau de l'espèce – approche en bioessais :	45
3.2.2. Evaluation de l'impact des mélanges au niveau des communautés – approche en microcosmes :	46
3.2.3. Evaluation de l'impact des mélanges au niveau des communautés naturelles – approches environnementales:	48
3.3. Confrontation des deux approches : écarts aux modèles de prédiction des risques	56
4. Conclusions	58
5. Annexes	63

1. Introduction

De nombreux écosystèmes aquatiques font l'objet d'une pollution diffuse par des mélanges de contaminants en provenance de leurs bassins versants. Parmi eux, les lacs sont d'importantes masses d'eau qui collectent et diluent fortement ces contaminants parmi lesquels de plus en plus de substances chimiques différentes sont désormais détectées.

Par exemple, le programme de surveillance des eaux du lac Léman réalisé par la CIPEL (Comité International de Protection des Eaux du Léman, CIPEL 2011) confirme en 2010 la contamination observée les années précédentes. Les concentrations en pesticides totaux dans le lac se stabilisent depuis 2008 et oscillent entre 0.1 et 0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ pour environ 50 substances décelées. Ces concentrations sont inférieures au seuil maximal de 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de pesticides totaux fixé par la législation suisse et française pour les eaux de boisson (Figure 1).

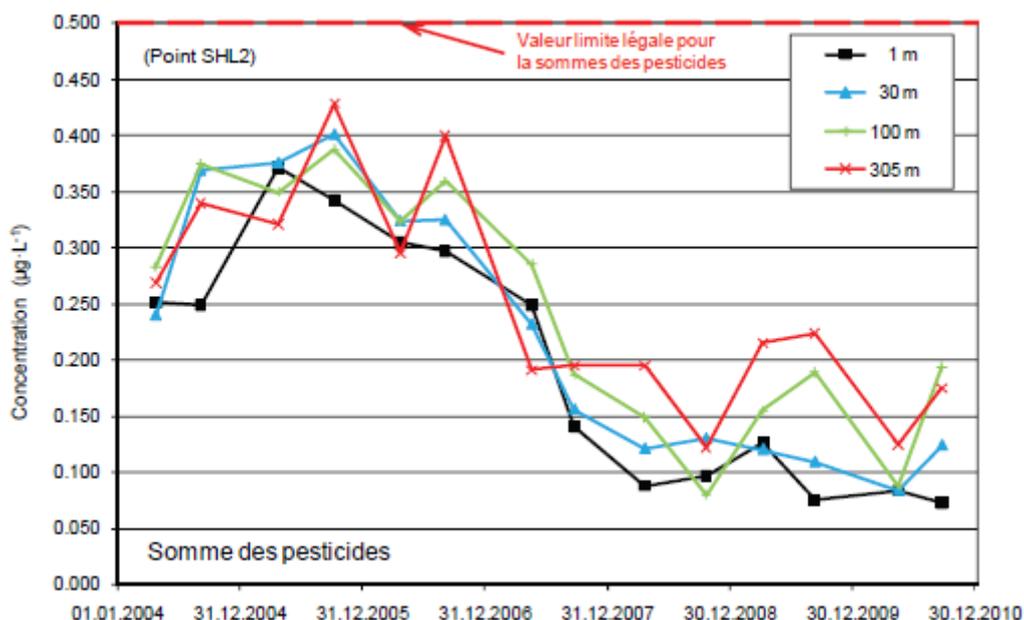


Figure 1 : Evolution des concentrations en pesticides totaux recherchés au centre du Léman de 2004 à 2010 (CIPEL 2011, Métaux et micropolluants organiques dans les rivières et les eaux du Léman)

Cette situation est donc satisfaisante du point de vue de la santé publique puisque la réglementation est respectée. Toutefois, l'interprétation de ces résultats doit se faire avec précaution car il est fort probable que d'autres substances actives - non suivies dans le programme de base - soient également présentes. Cela comprend entre autre les produits de dégradation (métabolites) des pesticides pour lesquels peu de données sont disponibles. De plus, l'évolution des pratiques agricoles et notamment l'abandon d'anciennes substances au profit de nouvelles molécules plus actives (par conséquent utilisées en quantités plus faibles) ne permet pas de conclure que le cocktail de pesticides rencontré en concentration globale plus faible est synonyme d'une diminution des effets écotoxicologiques de ces micropolluants sur l'environnement lacustre. Toutes les concentrations individuelles mesurées sont

inférieures à celles fixées pour les eaux de boisson ($0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ par composé) et 7 substances ont été mesurées à des concentrations supérieures à $0.010 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et représentent, à elles seules, plus de la moitié de la contamination en pesticides (5 herbicides : amidosulfuron, atrazine-deséthyl, éthoxysulfuron, foramsulfuron, metolachlor, et 2 fongicides : azaconazole, metalaxyl). (Figure 1)

Par rapport aux années précédentes, aucun nouveau pesticide n'a été décelé en concentration significative. Le faible renouvellement des eaux (11 ans pour le lac Léman) augmente les craintes quant aux impacts potentiels d'une telle pression de pollution.

Si la compréhension et la prédiction de l'effet individuel des substances progressent, l'effet des mélanges est encore peu abordé. De plus, la plupart des études mettent en évidence des effets à des concentrations relativement élevées, qui ne sont pas réalistes en comparaison des faibles doses rencontrées dans les lacs. Dans ce contexte, la compréhension et la prédiction des impacts représentent des enjeux majeurs pour la protection de ces milieux.

2. Contexte scientifique

2.1. Evaluation du risque

L'évaluation du risque environnemental s'intéresse aux impacts des substances et des mélanges de substances sur les organismes en évaluant à la fois l'exposition, résultant du rejet de polluants chimiques, et les effets de ceux-ci sur les structures et les fonctions de l'écosystème (Figure 2). L'évaluation du risque *a priori* (homologation des pesticides) se base sur la directive européenne 91/414/CEE, alors que l'évaluation du risque *à posteriori* suit généralement les principes du European Technical Guidance for Risk Assessment (European Commission, 2003). Cependant, historiquement, ces deux méthodes focalisent sur les substances isolées et ne tiennent que rarement compte des mélanges de composés chimiques. Il est donc nécessaire d'améliorer ces méthodes en tenant compte de ces mélanges.

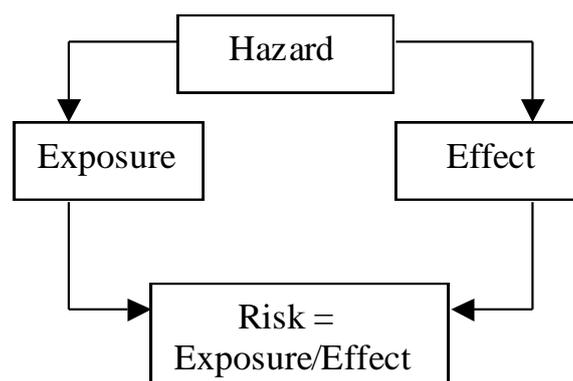


Figure 2 : Evaluation du risque

De plus, les prédictions d'évaluation du risque ont rarement été confrontées à des données de terrain à l'échelle des communautés (de Zwart, 2005). Pourtant une telle évaluation est cruciale pour (i) améliorer l'évaluation du risqué et (ii) obtenir des outils de gestion de l'environnement robustes.

Enfin, les communautés exposées sur le terrain à des contaminants peuvent présenter une adaptation à ces conditions de pression (adaptation physiologique, adaptation structurelle) leur conférant une moins grande sensibilité à ces toxiques. Cette adaptation est susceptible de brouiller la visibilité de l'impact au niveau des communautés.

2.2. Modèles pour l'évaluation du risque

La modélisation aussi bien que le monitoring permettent de déterminer l'exposition du système aquatique aux herbicides. Du côté des effets, les méthodologies classiquement proposées se basent largement sur l'évaluation de la « Predicted No-Effect Concentration » (PNEC). Cette concentration vise à assurer une protection globale de la vie aquatique à long-terme (voir par exemple les standards de qualité européens; Lepper, 2004). Ce paramètre est généralement estimé sur la base de la plus petite concentration d'effet connue sur les organismes aquatiques et d'un facteur de sécurité. Ce facteur de sécurité tient compte des nombreuses incertitudes dans l'estimation comme la variation inter-espèces, le ratio effets aigus-chroniques ou l'extrapolation du laboratoire à l'environnement. Le principal désavantage de cette approche est que la PNEC est dérivée de la valeur la plus faible d'un set de données connu et donc, dépend énormément de la qualité et de la quantité de ces données (voir Bishop et al., 1983; Chapman et al., 1998; Whitehouse, 2001). Plus récemment, certains auteurs ont proposé une alternative à la PNEC pour l'évaluation du risque. Il s'agit de la "Hazardous Concentration" (HCs) qui est dérivée des courbes de distribution de sensibilité des espèces (Species Sensitivity Distribution; SSD). Cette fonction statistique décrit la variation de la toxicité (généralement les « No-Observed Effect Concentration »; NOEC) d'une substance donnée en fonction des espèces. Les espèces prises en compte dans la courbe SSD devraient être représentatives de la diversité naturelle de l'écosystème étudié (Posthuma et al., 2002).

2.3. Evaluation du risque des mélanges

De plus, les évaluations du risque classiques se font généralement pour une seule substance. Or les organismes sont exposés, dans l'environnement à des mélanges de composés chimiques. Même si chacune de ces substances est présente dans une concentration inférieure à sa NOEC, elles peuvent exercer un effet significatif comme l'ont montré différents auteurs (Altenburger et al., 2000; Arrhenius et al., 2004; Silva et al., 2002). L'effet des mélanges de substances peut être décrit par des modèles tels que le modèle d'addition des concentrations (Concentration Addition, CA) ou le modèle d'indépendance des effets (Independent Action, IA). Ces modèles ont été initialement décrits par Loewe et Muischnek (1926), puis proposés en écotoxicologie par différents auteurs tels que Faust (Faust et al., 1994) ou lors du projet européen BEAM (Backhaus et al., 2003). De tels modèles ont été utilisés avec succès pour décrire les effets de mélange de substances agissant de manière similaire ou dissimilaire (par exemple : (Faust et al., 1999, Backhaus et al., 2000; Altenburger et al., 2000; Backhaus et al., 2003; Belden et al., 2007). Récemment, différents auteurs ont proposé de nouvelles approches d'évaluation du risque des mélanges en combinant les courbes SSD et les modèles CA/IA (Chèvre et al., 2006; de Zwart, 2005, Figure 3). La comparaison des prédictions avec des données de terrain a montré des résultats encourageants (Posthuma and de Zwart, 2006).

Malheureusement, ce type de recherche est encore rare. Elle est néanmoins nécessaire pour valider les prédictions de risque.

Une des limites majeure pour l'application de ces méthodes d'évaluation du risque des mélanges (de Zwart et Posthuma, 2005) est le manque de données écotoxicologiques, notamment les NOEC, pour établir les courbes SSD. Nous avons récemment proposé une méthodologie pour extrapoler les courbes SSD-NOEC sur la base des courbes SSD-CE50, cCEi basé sur des régularités statistiques observées. (Chèvre et al., 2006). En effet, il y a bien plus de données de CE50 (Effect Concentration 50%) que de NOEC disponibles dans la littérature. Nous avons pu justifier cette approche pour quelques herbicides. (Chèvre et al., 2006), un groupe d'insecticide et un groupe de substances pharmaceutiques (Chèvre et al., To be published). Cependant, pour extrapoler cette méthode à un large éventail de substances, il est nécessaire de la valider sur la base d'observations biologiques systématiques. Ceci permettra de justifier (ou non) les régularités observées statistiquement.

2.4. Risque des herbicides

Les milieux aquatiques sont le réceptacle final de tous les ruissellements et les flux de pesticides qui en résultent peuvent avoir des conséquences marquées sur les communautés, en terme de diversité et de fonction (Arrhenius et al., 2006; Gustavson et al., 2003; Macinnis-Ng and Ralph, 2004; Mohr et al., 2007, Schäfer et al 2007, Montuelle et al, 2007). La question de la dégradation de l'écosystème prend une ampleur particulière dans les lacs qui de par leur taille importante et leur faible taux de renouvellement ont une durée de réaction très importante. Si l'on considère par exemple l'eutrophisation du Léman dans les années 70-80, la restauration n'est actuellement pas complète malgré tous les efforts consentis par l'ensemble des acteurs intervenant dans la gestion du Lac (Jeppesen et al 2005).

Les herbicides en particulier peuvent agir directement sur les organismes phototrophes : réduction de croissance, limitation de la production primaire, changement de diversité (Guasch et al, 1997 ; Dorigo et al., 2007). Les interactions environnementales entre herbicides et facteurs environnementaux sont fréquentes, variés et peuvent modifier l'effet biologique : interaction herbicides-nutriments (Pesce et al, 2008), herbicides-lumière (Guasch & Sabater, 1998) ou herbicide-vitesse de courant (Villeneuve et al 2009). D'une façon générale, la variabilité spatiale au sein de l'écosystème peut moduler l'expression de la toxicité d'un herbicide (Bérard et al, 2003), en modulant la composition taxonomique de l'assemblage photosynthétique et donc sa sensibilité (Guasch et al, 1997; Dorigo et al, 2009; Villeneuve 2008).

La mise en évidence univoque d'un effet lié aux résidus d'herbicides est parfois délicate compte tenu de la présence fréquente de cocktail de substances, certaines pouvant avoir un effet antagoniste (ex diuron et PO4). Cependant, de nombreux travaux ont montré que les assemblages microbiens, en particulier les biofilms, étaient des indicateurs précoces de contamination (Biggs, 2000; Sabater et al., 2007). La mise en évidence des effets liés aux résidus de pesticides sur les communautés algales repose pour l'essentiel sur des mesures de production primaire, les approches taxonomiques « classiques » reposant sur les diatomées n'ayant pour l'instant qu'une validité vis à vis des niveaux trophiques (Coste, 1982). Parmi les nouveaux outils d'étude des microalgues, les outils moléculaires, en

particulier les techniques d'empreintes moléculaires, permettent une évaluation des changements de diversité (Dorigo et al. 2007). Les approches pigmentaires ont également été renouvelées par des méthodes type PhytoPAM permettant de déconvoluer les classes de pigments et leurs activités au sein d'un assemblage algal (Schmitt-Janssen et Altenburger, 2008). Ces nouveaux outils trouvent une application intéressante dans la démarche PICT (Pollution Induced Community Tolerance). Ce concept suppose qu'une communauté exposée à des contaminants devient tolérante à ces contaminations par des phénomènes d'adaptation ou par des changements de diversité (Blank, 1988; Bérard et al., 2002). Les communautés (échantillonnées après exposition dans les microcosmes ou *in situ*) sont exposées à une gamme de concentration d'un polluant de façon à déterminer leur CE50 à partir de mesures de photosynthèse. Ces valeurs sont alors comparées à celles obtenues pour des communautés non pré-exposées (ou pré-exposées dans des concentrations moindres). Une augmentation de CE50 indique une tolérance plus élevée au toxique qui peut être, ou non, mise en relation avec des modifications de diversité spécifique (cf par exemple Bérard et al, 2002 Dorigo et al, 2007).

3. Bilan du projet IMPALAC

Dans ce contexte, le projet exploratoire IMPALAC (Prédire l'impact des herbicides en mélange et à faible concentration sur les communautés algales planctoniques et benthiques lacustres) s'est attaché à établir des liens entre l'évaluation des impacts des mélanges d'herbicides et la prédiction du risque de façon notamment à tester différents modèles de prédiction du risque des mélanges sur les communautés algales.

Ce projet s'articule en 3 parties : 1) enrichissement des modèles par des essais en laboratoire, 2) évaluation des effets des mélanges au niveau spécifique (souches algales) et sur les communautés par des approches expérimentales et de terrain, et enfin 3) confrontation des deux approches d'évaluation « a priori » et « a posteriori » pour évaluer les écarts aux modèles et l'efficacité des modèles dans une démarche de prédiction du risque. Ces 3 étapes sont présentées dans le schéma général du projet ci-dessous (Figure 3).

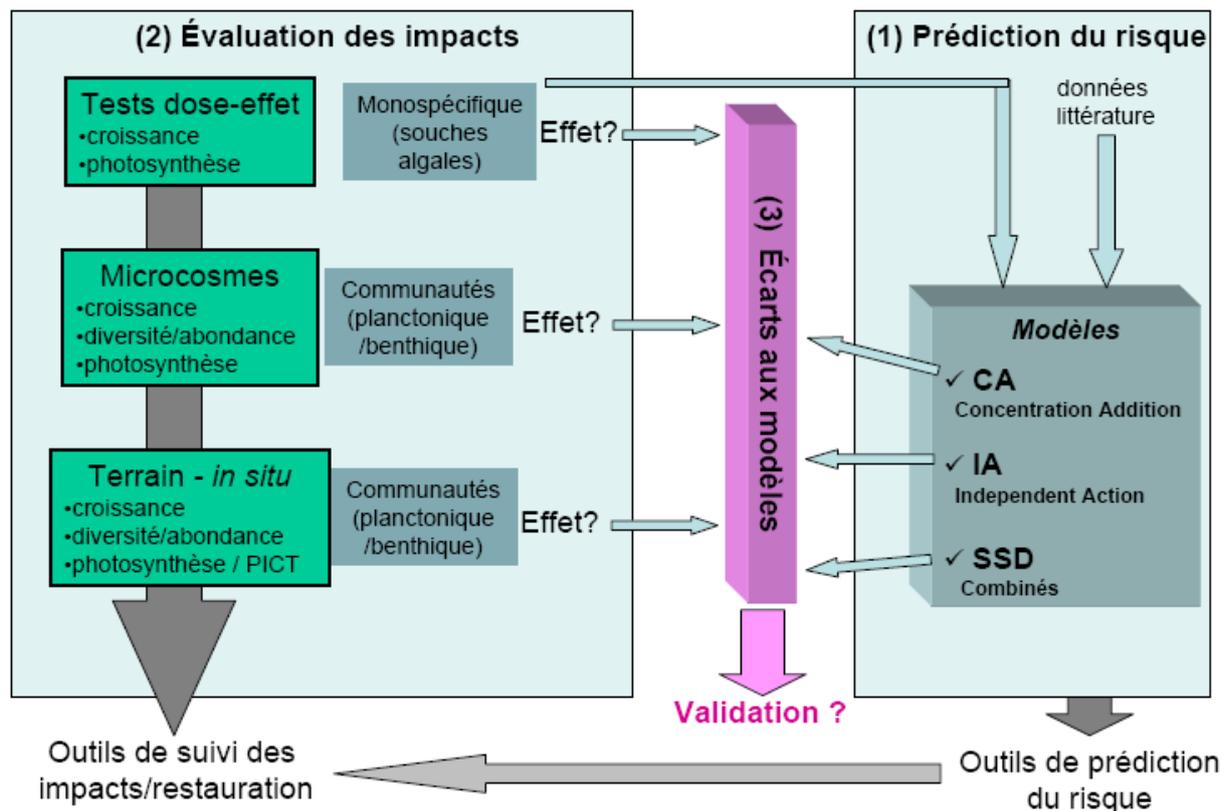


Figure 3 : schéma conceptuel et organisationnel du projet IMPALAC (Prédire l'impact des herbicides en mélange et à faible concentration sur les communautés algales planctoniques et benthiques lacustres)

SITES ET CAS RETENUS

Le lac Léman présente depuis de nombreuses années une contamination en pesticides en lien avec un bassin versant viticole sur sa rive Suisse et sur le bassin versant du Rhône amont, ainsi que des industries de production de ces molécules en amont (Valais, CH). Le monitoring assuré par la CIPEL au centre du lac, détecte une trentaine de pesticides et/ou métabolites sur les 200 qui sont testés en routine depuis 2004 par le laboratoire de chimie cantonale de Genève (CIPEL 2008, 2011). Ces molécules sont présentes en patterns qui varient au cours des années (Figure 1), et peuvent franchir les seuils de risque retenus à elles seules (Foramsulfuron proche de 1 µg/L en 2005) ou en mélange.

Le Léman a donc été retenu comme site d'étude de façon à bénéficier des longues séries de données physico-chimiques et biologiques disponibles sur ce lac grâce notamment au SOERE « grands lacs péri-alpins » (INRA de Thonon, <http://www6.dijon.inra.fr/thonon/L-observatoire>) et à la CIPEL (www.cipel.org). En effet nous disposons d'une série temporelle de contamination de la colonne d'eau de 10 ans pour quelques herbicides (Fig. 1) et de 5 ans pour l'ensemble des herbicides. Des données de composition et d'abondance phytoplanctoniques couplées à ces valeurs d'exposition sont également disponibles dans la base de donnée du SOERE.

Nous nous sommes attachés à étudier les impacts sur **les communautés algales** caractéristiques des écosystèmes lacustres, celles rencontrées dans la colonne

d'eau (**communautés planctoniques**) et celles rencontrées en zone littorale formant des biofilms (**communautés benthiques**). En effet dans les lacs, les marges peuvent être soumises à des expositions aux toxiques différentes selon la nature du bassin-versant local et donc de la présence/absence de rejets et de la nature de ces rejets. Ces expositions peuvent être très différentes de celle retrouvée au centre du lac (Bérard et al 2003) et révéler des processus de réponse différents. Nous avons notamment évalué l'intérêt potentiel des modèles de prédiction vis-à-vis de ces deux modes de vie et de ces deux communautés d'espèces.

Pour ce projet nous avons concentré notre attention sur un groupe de pesticides : **les herbicides**, pesticides les plus fréquemment détectés dans les eaux de surface (par exemple : Edder et al., 2007; Garmouma et al., 1997; Leu et al., 2004; Müller et al., 2002). Les effets de ces molécules sont observés sur les espèces non-cibles que sont les communautés de producteurs primaires des milieux aquatiques, i.e. les algues. Ces communautés photosynthétiques présentent une sensibilité aux herbicides préalablement constatée dans de nombreux contextes différents (in situ, expérimentation, faibles doses...), notamment par les équipes du projet IMPALAC (Dorigo et al 2010, Rimet & Bouchez 2011, Leboulanger et al 2011, Tlili et al 2011). Pour initier le projet IMPALAC, nous avons tout d'abord réalisé une synthèse sur l'effet des herbicides sur les communautés microbiennes phototrophes d'eau douce (Pesce et al 2011).

Pour la **prédiction du risque**, nous utilisons les "Hazardous Concentrations" (HCs) dérivées des courbes de distribution de sensibilité des espèces (Species Sensitivity Distribution; SSD) (Posthuma et al., 2002) comme alternative aux PNECs. Pour la prédiction du **risque des mélanges**, il existe actuellement deux modèles toxicologiques acceptés pour décrire les effets de mélanges de substances chimiques sans interactions entre elles.

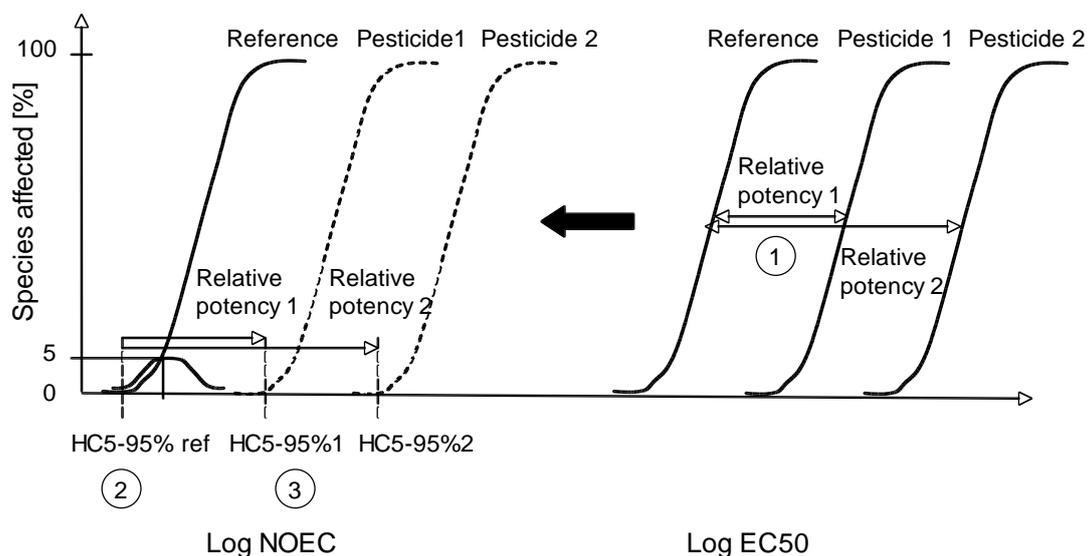


Figure 4: Approche en trois étapes pour dériver des critères de qualité pour chaque composé d'un mélange de substances ayant le même mode d'action (Chèvre et al., 2006).

Le modèle d'addition des concentrations (CA) s'applique lorsque les substances du mélange ont des modes d'action similaires sans interactions. Le modèle d'indépendance des effets (IA) s'applique lorsque les substances ont des modes

d'actions dissemblables, également sans interactions. Ces modèles ont été extrapolés pour l'évaluation du risque des mélanges dans le cadre des modèles SSD (de Zwart et Posthuma 2005). Cependant, une des limites importantes à leur utilisation est le manque de données disponibles sur les effets individuels des substances (NOEC notamment). Pour tenter de s'affranchir de cette limite Chèvre et al. (2006) ont proposé une approche statistique basée sur des régularités dans les courbes SSD (Figure 4). Cette approche considère que, pour des substances ayant des modes d'action similaires, il existe un parallélisme entre leurs courbes SSD bâties sur des valeurs de sensibilité de type CE50 et celles bâties sur des valeurs de type NOEC, CE5 ou CE10, et que le rapport de toxicité entre ces substances reste constant.

3.1. PREDICTION DU RISQUE DES MELANGES (APPROCHE A PRIORI)

Une des limites importantes à l'utilisation des modèles d'évaluation du risque est le manque de données disponibles sur les effets individuels des substances, notamment aux faibles doses (NOEC, CE5, CE10).

Nous avons donc commencé par enrichir les modèles de prédiction du risque lié aux herbicides, grâce à des données d'expériences de type « dose-effet » entre molécules d'herbicides et microalgues. En effet un bon ajustement des courbes SSD pour prédire le risque des herbicides sur les communautés naturelles nécessite : (1) d'acquérir ou collecter des données fiables et homogènes (même conditions d'obtention), (2) sur un nombre important d'espèces, et (3) sur des espèces représentatives de la biodiversité des milieux naturels à protéger.

Ce volet prédiction de risque a été enrichi d'un travail théorique sur les modèles de prédiction du risque. En effet, l'utilisation des modèles de mélanges (pour des substances non interactives) dans l'évaluation du risque nécessite la formulation d'hypothèses qui doivent être vérifiées. En accord avec Alexandre Péry, de l'INERIS, nous avons donc réorienté une partie de notre projet. En l'occurrence, nous avons cherché à savoir si ces hypothèses se justifiaient, ce qui supporte les calculs que nous ferons pour l'évaluation à priori du risque des mélanges.

3.1.1. TESTS MONO-SPECIFIQUES :

- **Herbicides testés :**

La synthèse réalisée (Pesce et al 2011), nous a permis de préciser le choix de molécules. La liste des herbicides testés (Tableau 1) a été discutée avec Véronique Poulsen (ANSES) selon les recommandations du comité scientifique du programme « Pesticides ». Nous avons choisi de nous intéresser à des herbicides de différents modes d'action. Pour arriver à une liste définitive d'herbicides représentatifs de la contamination potentielle par ces molécules, nous avons utilisés les critères de choix suivants : conserver **une molécule par famille et par mode d'action** qui soit **encore autorisée**, et si possible une molécule **très toxique**. Pour les triazines, l'atrazine est conservée (disponibilité de données de suivis long termes sur le Léman, rémanence de la molécule, interdiction récente en Suisse). La terbutryn est également conservée (interdite en usage phytosanitaire à partir de 2011, mais

toujours très utilisée comme biocide dans les peintures de façades, la plus toxique des triazines). Pour les autres familles il y a toujours une molécule autorisée.

Certaines molécules retenues initialement présentent des particularités qui nous ont conduit à modifier certains choix:

- Pour les **sulfonylurées** : le seul dosage de la molécule mère risquait de ne pas suffire à expliquer la toxicité car il existe de nombreux **métabolites** dont certains sont toxiques. De plus, lors des premiers tests, les deux molécules de cette famille présentaient une toxicité trop faible pour modéliser correctement les relations dose-effet et en extrapoler des valeurs d'effet (CE) fiables. Les sulfonylurées ont donc été abandonnées afin de rester dans le temps et le budget impartis au projet.
- Pour le **glyphosate**, V. Poulsen (ANSES) confirme que l'effet choc au départ est dû principalement aux co-formulants qui disparaissent très vite. Compte-tenu de l'effet de dilution du lac elle reconnaît qu'il n'est sans doute pas pertinent de retenir cette molécule ainsi que tous les **phosphorylated amino-acids**. De même pour les **phenoxy acides**, nous avons retenu le mecoprop de par sa présence dans le lac. Cette molécule n'a pas été conservée car elle présente 2 isomères non distinguables, ce qui aurait posé des problèmes analytiques.
- Pour les **chloroacetamides**, seul le métolachlor a été conservé, le dimetachlor présentant pour sa part une toxicité trop faible lors des premiers tests. Ce faible niveau de toxicité ne permettait pas de modéliser correctement les courbes dose-effet, afin d'obtenir des EC fiables.

Enfin, nous avons élargi la gamme des Kow, afin de tenir compte de différents niveaux d'adsorption potentiels des molécules en fonction de leur plus ou moins grande hydrophilie, notamment pour l'exposition des communautés algales en biofilms. Cela nous a conduit à ajouter l'irgarol et l'oxydiazon.

Tableau 1 : panel d'herbicides retenus pour le projet IMPALAC.

Familles	Herbicides	modes d'action	numéros CAS	Log Kow
Triazines	Atrazine	Inhibiteurs du PSII (site A)	1912-24-9	2,7
	Terbutryne		886-50-0	3,66
	Irgarol		28159-98-0	3,95
Phenylurées	Diuron	Inhibiteurs du PSII (site B)	330-54-1	2,87
	Isoproturon		34123-59-6	2,5
Chloroacetamides	Dimetachlore	Inhibiteurs de la synthèse des longues chaînes d'acides gras	50563-36-5	2,17
	Metolachlore		51218-45-2	3,4
Sulfonylurées	Foramsulfuron	Inhibiteurs synthèse d'acetolactate (régulateur de croissance)	173159-57-4	-0,78
	Amidosulfuron		120923-37-7	-1,56
Oxidiazoles	Oxadiazon	Inhibiteur de la synthèse des lipides et des protéines	19666-30-9	5,33

• Souches algales testées :

Nous nous sommes attachés à évaluer la sensibilité d'une importante biodiversité d'espèces représentatives des écosystèmes à protéger. Avec plus de 10 espèces différentes testées par molécule, nous respectons également le cadre de validité des approches d'évaluation de risque (European Commission, 2003).

Pour les communautés planctoniques, nous avons rassemblé des données de sensibilité à partir de la littérature (publications, bases de données internationales) pour un maximum d'espèces algales d'eau douce.

Pour les communautés benthiques, nous avons retenu à l'origine 18 espèces de diatomées pour leur représentativité de la diversité retrouvée dans les écosystèmes lentières tempérés. Après un test de croissance en conditions de laboratoire de souches issues de la TCC (Thonon Culture Collection, <http://www6.inra.fr/carrtel-collection/>) pour ces espèces, 14 ont été retenues (Tableau 2). Elles représentent une large diversité, tant phylogénétique qu'écologique (guilde écologique, mode trophique).

Ce premier ensemble de souches aurait vocation à être complété par d'autres souches de diatomées, afin d'améliorer sa représentativité. De plus l'exploration de la variabilité intra-spécifique de sensibilité de ces espèces serait à terme une valeur cruciale à intégrer dans l'évaluation du risque.

Tableau 2 : panel de souches de diatomées benthiques retenues pour le projet IMPALAC (codes du logiciel Omnidia, Lecoite et al 1993).

Ordre	Espèce	Code
Naviculales	<i>Craticula accomoda</i> (Hustedt) D.G. Mann	CRAC
	<i>Sellaphora minima</i> (Grunow) Lange-Bertalot	EOMI
	<i>Mayamaea fossalis</i> (Krasske) Lange-Bertalot	MAFO
	<i>Fistulifera saprophila</i> (Lange-Bertalot & Bonik) Lange-Bertalot	FSAP
Cymbellales	<i>Encyonema silesiacum</i> (Bleisch) D.G. Mann	ESLE
	<i>Gomphonema parvulum</i> (Kützing) Kützing	GPAR
	<i>Gomphonema clavatum</i> Agardh	GCLA
Fragilariales	<i>Fragilaria capucina</i> var <i>vaucheriae</i> (Kützing) Lange-Bertalot	FCVA
	<i>Ulnaria ulna</i> (Nitzsch) Lange-Bertalot	FULN
	<i>Fragilaria rumpens</i> (Kützing) G.W.F. Carlson	FRUM
	<i>Fragilaria crotonensis</i> Kitton	FCRO
Bacillariales	<i>Nitzschia palea</i> (Kützing) W. Smith	NPAL
Achnantes	<i>Achnantheidium minutissimum</i> (Kützing) Czarnecki	ADMI
Thalassiosirales	<i>Cyclotella meneghiniana</i> Kützing	CMEN

Pour les approches de modélisation, des 4 espèces phytoplanctoniques ont été sélectionnées pour leur représentativité par rapport au milieu naturel (lacs péri-alpins et en particulier le Léman) appartenant à des groupes pigmentaires et fonctionnels différents, et toutes issues de la TCC :

- 1 cyanobactérie productrice de toxines et à l'origine d'efflorescences dans plusieurs lacs péri-alpins : *Pseudanabaena limnetica*
- 1 cryptophycée mobile, à croissance rapide, de petite taille et caractéristique de la communauté printanière : *Cryptomonas* sp.
- 1 chlorophycée non mobile à croissance rapide et mixotrophe : *Chlorella vulgaris*,
- 1 zygothécée filamenteuse qui, depuis la fin des années 90, se développe abondamment dans le Léman : *Mougeotia gracillima*.

- **Bioessais monospécifiques dose-effet**

La sensibilité et la croissance de ces différentes espèces a été acquise au laboratoire en bioessais monospécifiques dans des conditions standardisées de

façon à obtenir une réponse au toxique essentiellement liée aux caractéristiques physiologiques de l'espèce. La majorité des bioessais sur algues étant calibrés sur des espèces de type chlorophycées, nous avons dû adapter les protocoles pour tester la sensibilité des diatomées aux herbicides (Larras 2013).

Deux modes d'exposition ont été retenus : planctonique (Larras et al 2012, *article 2*) et benthique (Larras et al 2013, *article 3*). L'exposition « planctonique » consiste à exposer les diatomées aux herbicides lorsque leurs cellules sont libres dans le milieu de culture. L'exposition « benthique » consiste à exposer les diatomées dont les cellules vivent au sein d'un biofilm, c'est-à-dire proche de leur mode de croissance réel dans le milieu naturel. Nous avons mis au point des bioessais avec ce mode d'exposition afin de fournir à l'évaluation du risque des données de sensibilité plus réalistes, se rapprochant de la situation environnementale. L'effet des herbicides sur les souches a été évalué par l'évolution de la fluorescence de la chlorophylle a (proxi de la croissance) entre le début et la fin du bioessai. Une attention particulière a été portée à standardiser les protocoles afin de pouvoir comparer entre elles toutes les données de sensibilité acquises.

Les courbes doses-réponses obtenues sur les données des bioessais ont été construites avec le logiciel R (R Core Team, 2013) et le package drc (Ritz et Streibig, 2005). Un test de «lack-of-fit» permet de sélectionner le modèle le plus adapté parmi les régressions couramment utilisées en écotoxicologie : log-logistique, log-normale et le modèle de Cedergreen-Ritz-Streibig (uniquement en cas d'hormèse). Les valeurs de concentrations effectrices (CE_x, x étant le % d'effet) ont été dérivées numériquement des courbes modélisées.

Il est à noter que les valeurs retenues pour la sensibilité aux faibles doses sont les CE₅ et CE₁₀, valeurs dont l'extrapolation à l'aide des courbes dose-effet est plus fiable que celle des NOEC. En effet les valeurs de NOEC sont estimées sur les plus faibles concentrations, donc très dépendantes des gammes de concentrations testées, dans une zone de sensibilité difficile à mettre en évidence, donc sujette à incertitude.

• Bases de données de sensibilité aux herbicides

- 1 base de données a été constituée pour la sensibilité des souches algales planctoniques aux herbicides. Elle a été établie sur des données expertisées issues de la bibliographie par V. Gregorio (UNIL) et a servi de base à une publication (Chèvre et al. 2006, Gregorio et al. 2013, *article 5*). Il s'agit de valeurs de CE₅₀ présentant une certaine hétérogénéité (différents end-points mesurés, différents protocoles...).
- 1 base de données sur la sensibilité d'espèces phytoplanctoniques a été également acquise lors du projet IMPALAC par des bioessais en croissance planctonique. Elle a permis d'alimenter en données de sensibilité précises (relation doses-effet, CE₅, CE₁₀ et CE₅₀) l'approche de modélisation.
- 1 base de données a été acquise lors du projet IMPALAC pour la sensibilité des souches de diatomées (Tableau 2) aux herbicides (Tableau 1). Les bioessais ont été réalisés au laboratoire selon les deux modes de croissance : planctonique et benthique. Cette base de données acquise par F. Larras (INRA Thonon) a servi de base à deux publications (Larras et al. 2012 – *article 2*; Larras et al. 2013 – *article 3*).

Si la base collectée dans la bibliographie ne présente que des valeurs de sensibilité aux doses élevées (CE50) et obtenues dans des conditions hétérogènes, les bases de données acquises au laboratoire lors du projet IMPALAC présentent quant à elles des données homogènes pour des valeurs de sensibilité à des faibles doses (CE5, CE10).

3.1.2. UTILISATION DES TESTS DOSE-EFFET POUR DERIVER DES COURBES DE DISTRIBUTION DE SENSIBILITE DES ESPECES (SSD) ET DES SEUILS PROTECTEURS (HC) :

La méthodologie des SSD est en constante évolution. Cependant, cet outil souffre sérieusement d'un manque de réalisme écologique qui est un point capital pour la fiabilité des seuils protecteurs qui en découlent (Calow et Forbes, 2003). Ce manque de réalisme écologique est principalement du au fait que la construction des SSD dépend des données écotoxicologiques disponibles dans la littérature et dans les bases de données publiques. La construction des SSD est biaisée car le choix des données est contraint par leur disponibilité et les espèces associées à ces valeurs de sensibilité ne sont souvent pas représentatives de la communauté à protéger. Dans ce contexte, les seuils dérivés des SSD risquent de ne pas être adaptés si ces dernières sont construites sur des niveaux de sensibilité ne correspondant pas à ceux retrouvés dans l'environnement. C'est pourquoi, la qualité du jeu de données de sensibilité influence la valeur des seuils qui en sont dérivés (Newman et al, 2000) et donc, leur niveau de fiabilité.

Les données de sensibilité acquises dans le projet IMPALAC en bioessais intègrent un degré de réalisme écologique supérieur aux protocoles classiquement utilisés. Elles assurent une meilleure représentativité environnementale (diversité environnementale, mode d'exposition réaliste) dans des conditions standardisées et comparables. Elles nous ont donc permis d'explorer l'importance du choix des données entrantes dans les SSD, ainsi que les effets liés à la qualité des données écotoxicologiques sur la valeur et le potentiel protecteur des seuils (HC) dérivés de ces SSD.

Les données écotoxicologiques dérivées des courbes doses-réponses des bioessais ont permis de construire les courbes SSD à différents niveaux d'effets (CE5, CE10, CE50) et pour les deux modes de croissance étudiés (benthique et planctonique). Les premières courbes SSD ont été tracées à partir du nouveau package R « fitdistrplus » (Delignette-Muller et al 2012) permettant de réaliser un test de « goodness-of-fit » pour choisir le modèle le plus adapté aux données. Une importance particulière a été donnée au test d'Anderson-Darling. Ce test donne plus d'importance aux queues de distribution desquelles sont dérivées les HC5 (Hazardous concentration 5% : concentration à risque pour 5% des espèces). Les différents seuils (HC) ont été dérivés numériquement et leurs intervalles de confiance à 95% ont été estimés par bootstrap (1000 tirages).

- **Courbes SSD et seuils HC pour les diatomées en croissance planctonique**

Grâce aux données de sensibilité collectées dans les bases de données (voir détail en annexe 1), des courbes de distribution de sensibilité des espèces ont pu être dérivées pour chacune des différentes substances testées. La Figure 5 présente les courbes SSD-CE5 et SSD-CE50 dérivées respectivement des valeurs de CE5 et CE50 pour les diatomées en croissance planctonique (*article 2*).

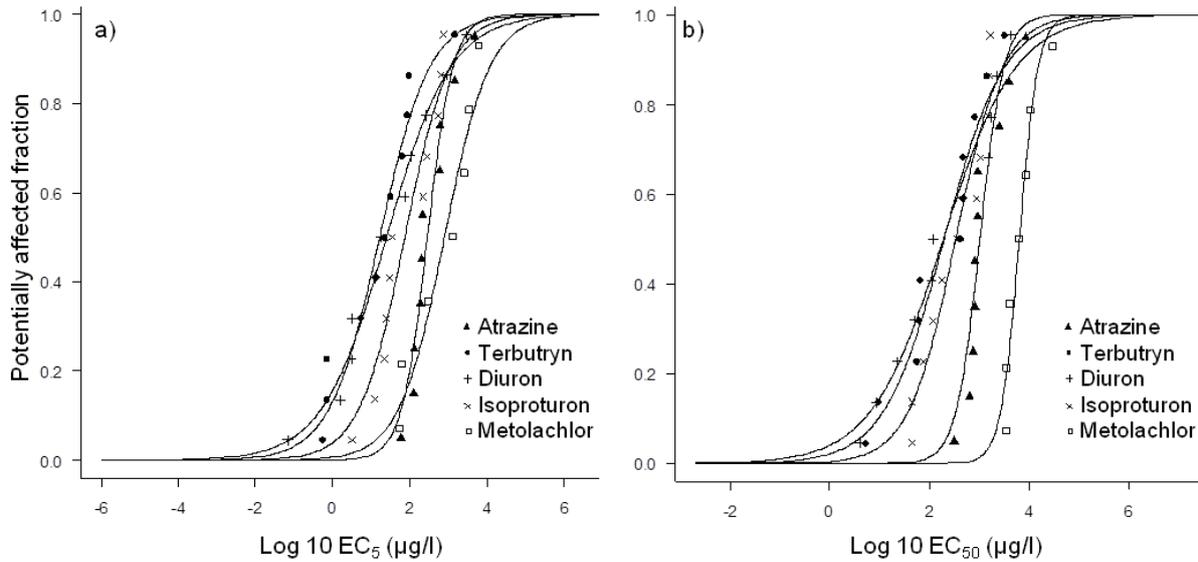


Figure 5: courbes SSD pour différents herbicides sur la base de la sensibilité de diatomées en croissance planctonique. Les courbes sont basées sur des valeurs de a) CE5 et b) CE50. Chaque symbole représente une espèce.

Nos résultats (Annexe1, Figure 5, Tableau 3) ont révélé un degré élevé de variabilité de la sensibilité de l'ensemble des espèces testées. Pour les herbicides inhibiteurs du photosystème II, le regroupement des espèces de diatomées par niveau de sensibilité semble en lien avec leur mode de trophique et leur guildes écologique. Les espèces N-hétérotrophes et de la guildes " motile " apparaissent plus tolérantes que les espèces N-autotrophes et de la guildes " low profile ". Les courbes SSD complètes ont été obtenues pour 5 herbicides, mais pas pour les sulfonilurées, ni pour le dimetachlor (annexe 1 : niveaux de toxicité trop faibles par rapport à la gamme de concentration testée). Les courbes SSD (Figure 5) nous indiquent l'ordre de toxicité des herbicides : diuron> terbutryn> isoproturon> atrazine> metolachlor.

Les HC5 extrapolées (Tableau 3, concentrations à risque pour 5% des espèces), révèlent que les communautés de diatomées pourraient être affectées par les concentrations régulièrement rencontrées dans les environnements aquatiques (Tableau 4), en particulier pour l'isoproturon, la terbutryn et le diuron.

Tableau 3: Hazardous concentrations (HC5 and HC50): valeurs extrapolées des courbes SSD basées sur les CE5 et CE50 des diatomées en croissance planctonique pour 5 herbicides.

Herbicide	SSD-CE ₅		SSD-CE ₅₀	
	HC ₅ (µg/l)	HC ₅₀ (µg/l)	HC ₅ (µg/l)	HC ₅₀ (µg/l)
Diuron	0.09	24.83	1.43	188.21
Isoproturon	1.38	73.46	13.90	332.24
Atrazine	29.90	283.52	202.91	1020.88
Terbutryn	0.21	16.48	3.33	195.2
Metolachlor	14.93	787.69	1784.36	6312.69

• **Prise en compte de l'exposition en croissance benthique (SSD et seuils HC)**

Les diatomées benthiques évoluant dans une structure de biofilm, à l'interface entre l'eau et le substrat, nous avons testé l'importance de la prise en compte de ce mode

de croissance lors de leur exposition pour améliorer le réalisme environnemental des bioessais. Sur le Tableau 4, on observe que les concentrations effectrices (CE10 et CE50) varient selon les espèces, les herbicides, et les modes de croissance. Plus l'herbicide est hydrophobe (Kow élevé, Tableau 1) plus les espèces sont sensibles dans des conditions de croissance benthiques.

Tableau 4: Hazardous concentrations (HC5 and HC50) extrapolées des courbes SSD-CE10 et SSD-CE50 pour 6 herbicides testés sur des diatomées en croissance planctonique (p) et benthique (b), « Annual Average Environmental Quality Standard » (AA-EQS) et PNEC (µg/L). (- pas de valeur disponible)

Herbicides	Growth mode	CE ₁₀ -HC ₅	CE ₁₀ -HC ₅₀	CE ₅₀ -HC ₅	CE ₅₀ -HC ₅₀	AA-EQS	PNEC
Isoproturon	p	3.98 [0.76;25]	96 [36;288]	44 [17;155]	389 [170;906]	0.3 ^a	0.79
	b	16 [4.94;80]	147 [71;287]	70 [29;251]	570 [302;1339]		3.2
Atrazine	p	63 [29;269]	490 [285;972]	260 [151;545]	1206 [755;2045]	0.6 ^a	12.6
	b	27 [7.1;141]	581 [219;1216]	100 [18;537]	1258 [412;2692]		5.4
Diuron	p	0.33 [0.04;3.97]	37 [7.08;182]	4.27 [1.10;44]	180 [76;804]	0.2 ^a	0.066
	b	3.13 [0.79;18]	53[22;151]	9.50 [2.13;56]	195 [58;513]		0.63
Metolachlor	p	61 [9.55;363]	616 [208;1402]	2369 [1445;4266]	5365 [3707;7943]	-	12.2
	b	7.76 [0.85;347]	434 [81;3296]	164 [48;1464]	3750 [1230;16982]		1.55
Terbutryn	p	0.43 [0.05;3.92]	23 [4.72;76]	6.82 [2.12;37]	170 [68; 631]	-	0.086
	b	0.018 [0.001;0.41]	3.55 [0.94;29]	2.33 [0.36;14]	60 [20;224]		0.0036
Irgarol	p	0.067 [0.020;1.21]	2.92 [0.84;10.35]	10.06 [3.12;29]	57.28 [28;107]	0.0025 ^b	0.0134
	b	0.016 [0.0037;0.059]	0.30 [0.10;0.81]	0.070[0.0069;2.82]	10.35 [1.64;79]		0.0032

^a from Water Framework Directive (EU Parliament, 2000), ^b from Rodriguez-Romero (2011)

Le biofilm présente un effet protecteur contre les herbicides qui a tendance à diminuer avec l'augmentation de l'hydrophobie des herbicides (Figure 6). La matrice semble bien contrôler l'exposition aux herbicides, et par conséquent leur toxicité envers les diatomées benthiques.

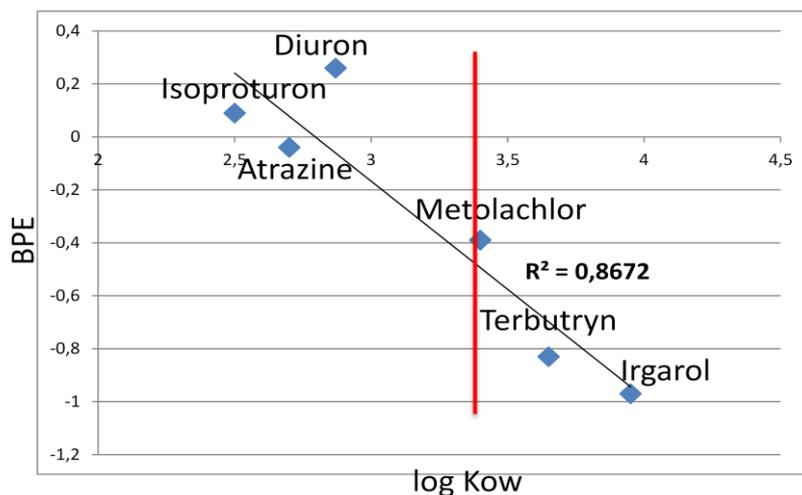


Figure 6: Biofilm Protective Effect (BPE = mean (log CE₅b_i - log CE₅p_i) évalué sur l'écart de sensibilité de diatomées en croissance benthique et planctonique pour des herbicides de différente hydrophobicité (Kow).

Pour le métolachlor, la terbutryn et l'irgarol, les seuils de protection (PNEC) provenant des SSD basées sur les données de sensibilité en croissance benthique sont supérieurs aux seuils établis en croissance planctonique. Pour les herbicides hydrophobes, dériver des seuils protecteurs à partir de données de sensibilité obtenues en croissance benthique, plus proche de la réalité environnementale, semble offrir une alternative prometteuse pour améliorer l'évaluation du risque pour les communautés benthiques.

3.1.3. UTILISATION DES MODELES DE MELANGES SUR LES COURBES SSD :

Deux modèles sont en général utilisés pour prédire la toxicité des mélanges : le modèle d'addition des concentrations (CA) et le modèle d'addition des réponses (RA). Leur aptitude à décrire la toxicité des mélanges pour les organismes pris individuellement a été montrée ces dernières années. Pour l'évaluation du risque des mélanges, il a donc été proposé d'utiliser ces modèles directement sur les courbes de distribution de sensibilité des espèces ou courbes SSD afin de calculer un potentiel d'espèces affectées par le mélange.

En général, le calcul est fait en 2 étapes: (i) le modèle CA est appliqué sur les courbes SSD pour les composés agissant de manière similaire et (ii) le modèle RA est appliqué sur les courbes SSD de mélanges prédites avec CA.

Cependant, la validité des prédictions de ces modèles de mélanges a été démontrée seulement lorsqu'ils sont appliqués sur les courbes dose-réponses des espèces individuelles, et non sur les courbes SSD avec de multiples espèces. Cette méthode, plus « correcte », est rarement utilisée dans la pratique du fait du manque de données à disposition sur les courbes dose-réponse des espèces individuelles. On applique donc généralement les modèles de mélanges sur les courbes SSD.

Pour valider cette approche, nous avons comparé les deux méthodes (Figure 7):

- 1) appliquer les modèles de mélanges par espèce, puis construire la SSD du mélange (ce qui devrait idéalement être fait)
- 2) appliquer les modèles de mélanges directement sur les courbes SSD (ce qui est fait dans la pratique)

Pour pouvoir comparer les deux méthodes (Figure 7), et pour palier au manque de données de sensibilité, nous avons utilisé le logiciel R afin de créer des données de toxicité aléatoires pour un nombre donné de substances en mélange, pour différentes conditions (Gregorio et al 2013, *article 5*). Les données de toxicité générées suivant une distribution log-logistic pour chaque substance sont des CE50 (mais pourrait être considérée comme des CE01, car on compare juste les deux méthodologies). Ainsi les SSD sont construites à partir de ces CE50s et ces mêmes CE50s permettent aussi le calcul de la CE50 d'un mélange pour chaque espèce selon le modèle CA. De plus l'attribution d'une pente à chaque espèce permet de définir une courbe dose-réponse pour celle-ci, condition nécessaire pour calculer pour chaque espèce la CE50 d'un mélange selon le modèle RA. Il est ensuite possible de calculer la toxicité d'un mélange soit en appliquant le modèle CA (ou RA) sur les courbes SSD, soit en calculant la CE50 de ce même mélange sur chaque espèce, avec le modèle CA (ou RA), et ensuite de calculer la distribution de ces CE50sMIX (Figure 7). Pour chaque condition fixée, 1000 sets de données de toxicité sont générés et pour chacun de ces sets, un calcul de mélange est effectué selon les deux méthodologies afin de comparer leur résultat. Les comparaisons entre méthodes sont réalisées sur la base de la HC5 ou de la HC50, afin d'évaluer la

variabilité de la réponse entre les deux méthodologies pour chaque condition, et donc de déterminer l'écart entre ces deux méthodologies.

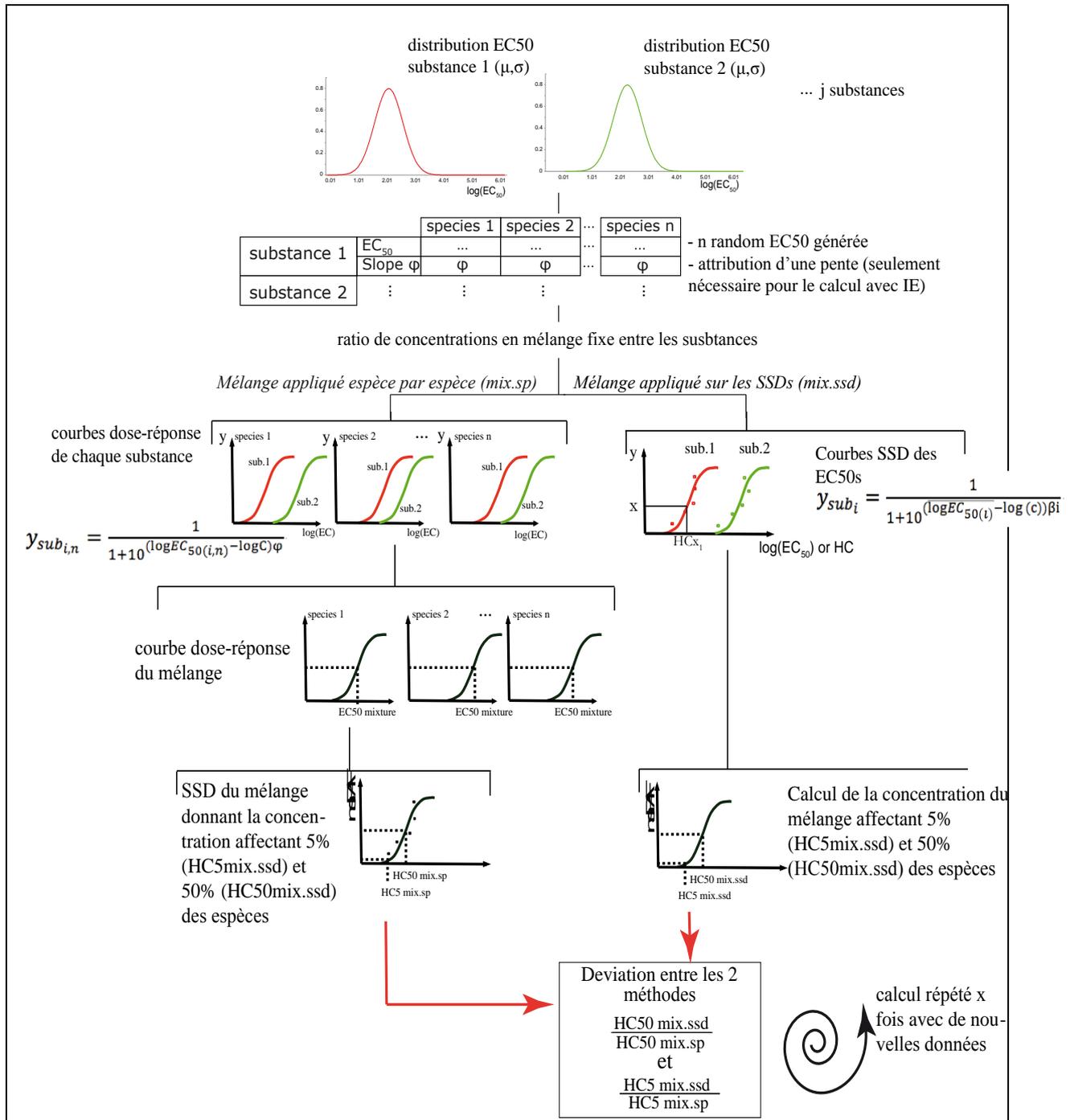


Figure 7 : Méthodologie employée pour comparer les deux manières d'évaluer la toxicité d'un mélange pour le calcul du risque.

Les conditions suivantes pouvant jouer un rôle sur l'écart sont testées :

- le nombre de substances
- le nombre d'espèces (et donc de CE50 généré pour chaque substance)
- la déviation standard des CE50s générées : plus la déviation standard est petite et plus les courbes SSD des substances ont une pente raide
- la pente attribuée aux courbes dose-réponse de chaque espèce (pour RA)

Le ratio de mélange est calculé sur la base de la HC50 de chaque substance en mélange, de manière à ce que celles-ci aient un potentiel équi-toxique. En outre, la position d'une espèce sur chaque courbe SSD peut varier (l'espèce la plus sensible à une substance peut être moins sensible à une autre substance) et cette configuration varie pour chaque set de données. De même, les courbes SSD peuvent approximer plus ou moins bien certaines CE50s. Ces deux variations peuvent être sources de différences entre les deux méthodologies.

Les résultats montrent que, selon les conditions fixées, certains sets de données peuvent générer une différence assez conséquente sur la concentration calculée d'un mélange affectant 5% ou 50% des espèces, que l'on applique une méthodologie ou l'autre. Les Figures 8 et 9 montrent l'étendue du ratio (pour les 1000 sets de données générés pour chaque condition) entre la concentration du mélange affectant 5% ou 50% des espèces (HC5MIX,50MIX) calculée par la méthode des modèles appliqués sur les SSD et par celle calculée par la méthode appliquée sur les espèces en premier. Par exemple, on remarque pour RA, dans la Figure 8a, que plus les courbes dose-réponse sont faibles, plus la méthode SSD a tendance à sous-estimer la HC5MIX. En outre, ce phénomène est amplifié plus les courbes SSD ont une pente raide (plus la déviation standard est petite). A contrario, cette tendance s'inverse avec une surestimation lorsque les pentes des courbes dose-réponse deviennent plus faibles. On voit dans la Figure 8b que RA appliqué sur les SSD, pour un mélange de 8 substances avec une déviation standard des CE50 de 1 (cas assez fréquent) et une pente des courbes dose-réponse équivalentent environ à $CE50=3*CE10$, a tendance à surestimer la HC5MIX comparé à l'autre méthode, de plus de 7 fois dans 50% des cas et plus de 12 fois dans 25% des cas. Pour CA, on observe aussi une différence plus ou moins grande selon les conditions.

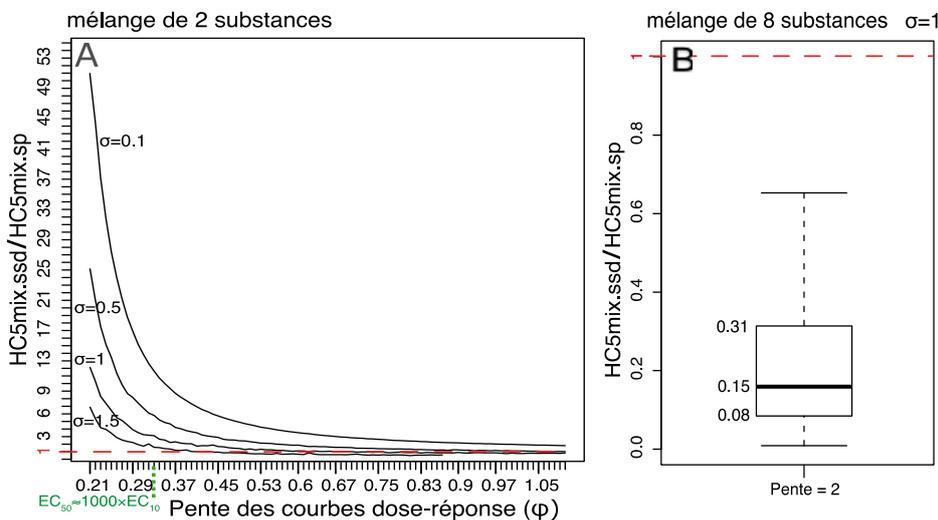


Figure 8 : ratio entre la concentration du mélange affectant 5% des espèces calculé avec le modèle RA appliqué 1) sur les SSD et 2) sur chaque espèce (10 espèces).
 8A) médiane du ratio sur 1000 sets de données générés pour un mélange de 2 substances. 8B) boxplot du ratio des 1000 sets de données générés pour un mélange de 8 substances (déviations standard des CE50= 1, pente de la courbe dose-réponse équivalentent à une $CE50=3*CE10$).

Sur la Figure 9a, on remarque que plus la déviation standard est petite et plus les deux méthodes donnent des résultats similaires. Par contre, pour un mélange de 2 substances et une déviation standard de 1, la variabilité de la différence (ratio HC5MIX) devient plus grande avec des cas rares donnant une sous-estimation par la

méthode sur les SSD pouvant être 10 fois plus grand comparé à l'autre méthode. Cependant, on remarque sur la Figure 9b, que lorsque le nombre de substances augmente, on aura plutôt tendance à surestimer la HC5MIX par la méthode sur les SSD (médiane à plus de 6x pour 8 substances, et plus de 25x pour 50 substances).

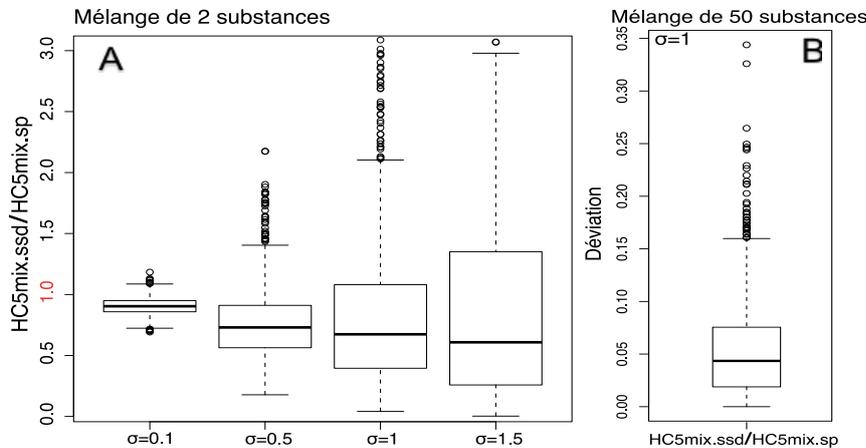


Figure 9 : ratio entre la concentration du mélange affectant 5% des espèces calculé par la méthode avec le modèle CA appliqué 1) sur les SSD et 2) sur chaque espèce. 9A) médiane du ratio sur 1000 sets de données générés pour différentes déviations standard des CE50s des 2 substances (10 espèces). 9B) boxplot du ratio pour 1000 sets de données générés pour un mélange de 50 substances, déviation standard des CE50 de 1, 15 espèces.

De manière générale, cette étude (Gregorio et al 2013, *article 5*) a montré que l'utilisation des modèles CA ou RA sur les courbes SSD pour calculer un risque a tendance à surestimer la toxicité de la HC5mix pour la plupart des sets de données générés aléatoirement. En appliquant la méthode de mélange directement sur les SSD, on obtient donc une valeur assez conservatrice de la HC5MIX. Cette surestimation est accentuée quand le nombre de substances augmente. Cependant, certains cas montrent une sous-estimation de la HC5MIX. Il conviendrait donc, par la suite, de définir un domaine d'applicabilité des modèles sur les courbes SSD pour ne pas risquer de sous estimer la HC5 d'un mélange.

3.1.4. COURBES SSD BASEES SUR DONNEES GENERIQUES OU SPECIFIQUES:

Le manque de données écotoxicologiques rend difficile la construction de courbes SSD fiables pour la prédiction du risque. Nous avons comparé le risque de 4 herbicides, séparément et en mélange (Larras et al., *soumis à Pest Management Science*), évalué au travers de :

- 3) SSD génériques (base de données de sensibilité de la littérature, sur espèces planctoniques)
- 4) SSD spécifiques (base de données de sensibilité des microalgues benthiques acquises dans le projet IMPALAC)

Parmi notre panel (Tableau 1), nous avons retenu les 4 herbicides les plus toxiques pour constituer un mélange. Ces 4 herbicides sont tous des inhibiteurs du photosystème II et présentent deux modes d'action différents : action sur le site A (atrazine et terbutryn) ou action sur le site B (diuron et isoproturon).

Les deux méthodes d'évaluation du risque (Générique G-SSD et Spécifique S-SSD) ont été comparées au travers des seuils de protection HC5 extrapolés pour les

substances seules et pour le mélange (Figure 10). Pour le mélange, Le modèle CA est appliqué aux courbes SSD des 4 substances.

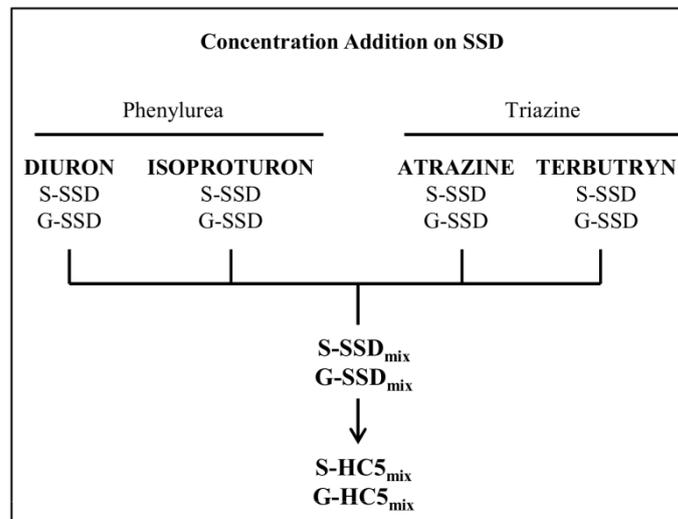


Figure 10: Description des méthodes comparées. Pour le mélange : modèle CA appliqué aux 4 courbes SSD individuelles.

Les données de sensibilité génériques sont statistiquement plus faibles que celles de sensibilité spécifiques pour l'atrazine, le diuron et l'isoproturon. La plupart des espèces de diatomées se sont révélées plus sensibles en assemblage qu'en conditions monospécifiques (à l'exception de la diatomée *Fragilaria rumpens*). Cette différence de sensibilité des espèces seules ou en assemblage observée sur les CE50 peut également s'observer à des niveaux d'effets inférieurs, tels que ceux utilisés dans l'évaluation du risque (NOEC, CE5, CE10). Il semble donc important de prendre en compte ces écarts pour une évaluation de risque bien adaptée à la réalité environnementale.

Tableau 5: HC5, HC50 (en nM) et pentes des SSD génériques and spécifiques pour chaque substance et pour le mélange de 4 substances (modèle CA).

	Generic SSD			Specific SSD		
	HC ₅	HC ₅₀	slope	HC ₅	HC ₅₀	slope
Diuron	1.79	105	0.72	13.2	789	0.72
Isoproturon	10.77	546	0.74	250	2967	1.19
Atrazine	27	1211	0.77	375	6904	1.01
Terbutryn	3.76	132	0.83	20.8	269	1.15
Mixture	11	499	-	106	2673	-

Les seuils génériques G-HC étaient tous plus faibles que les seuils spécifiques S-HC (Tableau 5). Ceci s'explique par la plus grande sensibilité de certaines espèces de chlorophycées incluses dans le set de données de sensibilité « générique » et à la moindre sensibilité des diatomées composant le set « spécifique ». Le seuil générique G-HC5 pour le mélange a moins d'effet sur les espèces en assemblage que le seuil spécifique S-HC5, même s'il n'est pas pleinement représentatif de la diversité benthique naturelle.

Le choix des données à inclure dans les courbes SSD semble donc capital dans l'extrapolation des seuils de risque (HC). Si les SSD sont basées sur des données

qui sous-estiment la sensibilité des communautés à protéger, cet écart génère des seuils de risque moins protecteurs qu'ils ne devraient l'être pour réellement protéger les communautés environnementales. Il semble donc particulièrement important de baser les seuils de risque sur des données de sensibilité représentatives des communautés à protéger.

3.1.5. EVALUATION « FIRST TIER » DU RISQUE DES MELANGES :

Dans un article de revue (Gregorio et al *in press, article 7*) sur les modèles de mélanges, nous avons évalué le risque des mélanges de substances chimiques pour une rivière (le Rhône) et un lac (le Léman). Le manque de données à disposition ne permet pas une approche robuste basée sur les courbes de distribution de sensibilité des espèces. Nous avons donc appliqué une approche de type screening (first tier) telle qu'actuellement en discussion dans l'Union Européenne. Une telle approche permet de mettre en évidence les substances les plus problématiques du mélange. Cependant, elle montre également que le simple fait d'être exposés simultanément à des dizaines de substances chimiques (effet cocktail) conduit à dépasser le seuil de risque pour les organismes exposés. En termes de management, ceci implique qu'il est important de réduire les quantités de chacune des substances qui entrent dans l'environnement.

3.2. EVALUATION DES IMPACTS DES MELANGES (APPROCHE A POSTERIORI) :

Nous avons choisi une démarche d'évaluation d'impact progressive allant d'une moindre complexité (bioessais de laboratoire) à une complexité maximum (in situ). Cette approche nous permet de valider en conditions simples des impacts, puis de poser des hypothèses sur des observations en conditions plus complexes.

3.2.1. EVALUATION DE L'IMPACT DES MELANGES AU NIVEAU DE L'ESPECE – APPROCHE EN BIOESSAIS :

Pour les 4 herbicides les plus toxiques de notre panel (Tableau 1), nous avons réalisé un mélange équi-toxique. Ces molécules ont été introduites dans le mélange selon le ratio de leur HC50 estimée précédemment de manière à ce qu'ils aient la même toxicité, afin d'obtenir un mélange équi-toxique. Les proportions équi-toxique retenues sur la base des ratios molaires de HC50 étaient les suivantes : Atrazine = 62%; Terbutryn = 3,7%; Diuron = 8,3%; Isoproturon = 26%. Une gamme de 8 concentrations a été testée (1 contrôle et une gamme de 7 concentrations croissantes) sur souches individuelles en bioessais de laboratoire en croissance benthique. L'inhibition de croissance a été suivie par le proxy de la fluorescence.

A partir de ces données, nous avons extrapolé la CE50 de chaque espèce (10 espèces de diatomées benthiques, Tableau 2) au mélange équitoxique des quatre herbicides (Larras et al, *submitted to Pest. Manag. Science*). Les CE50 extrapolées pour chacune des espèces (Tableau 2) pour le mélange quaternaire étaient: 15,5 nM (FRUM), 394 nM (CMEN), 666 nM (UULN), 1268 nM (FCVA), 1407 nM (ADMI), 2111 nM (MAFO), 2581 nM (ELSE), 7218 nM (GPAR), 16 226 nM (NPAL), 19235 nM (SEMN).

3.2.2. EVALUATION DE L'IMPACT DES MELANGES AU NIVEAU DES COMMUNAUTES – APPROCHE EN MICROCOSMES :

- **Communautés expérimentales**

L'évaluation des effets de ce mélange sur des mélanges de souches est réalisée au laboratoire en microcosmes. Le mélange d'herbicides a été testé une communauté benthique (mélange de 11 souches, printemps). Nous avons choisi de tester l'effet du mélange quaternaire sur un assemblage d'espèces contrôlé de 11 espèces de diatomées exposé en microcosmes à un gradient de 8 concentrations du mélange.

Les cultures des espèces de diatomées 11 ont été introduits ensemble dans trois aquariums d'incubation, et cultivées pendant une période de 12 jours pour stabiliser la communauté (annexe 2). la colonisation en biofilm se fait sur des disques de verre qui sont ensuite exposés dans 27 aquariums (1 contrôle + 8 doses x triplicat). Après 4 jours d'exposition la croissance est évaluée par fluorescence et la structure de l'assemblage d'espèce est déterminé par comptage au microscope.

Parmi les 11 espèces introduites au début de l' incubation, 7 se sont maintenues après incubation (FRUM , ADMI , CRAC , NPAL , GPAR , SEMN , et CMEN). Le taux de croissance FRUM a été fortement impacté dès la plus faible concentration du mélange d'herbicides, alors que la plupart des autres espèces ne sont affectées qu'à partir de la deuxième concentration.

La principale différence observée entre les deux conditions (mono-spécifique, communauté) est le niveau de complexité biologique. En communauté, les espèces à forte exigence en nutriments peuvent être plus gravement affectées par les herbicides, parce que leur concurrence avec d'autres espèces pour les nutriments peut les rendre moins aptes à faire face aux effets toxiques .

- **Communautés naturelles**

Dans l'environnement, la structure et la composition taxonomique des communautés naturelles de diatomées sont modulées par certains facteurs environnementaux tels que la température, la luminosité ou encore les teneurs en nutriments. Ces paramètres fluctuent naturellement et de manière rapide selon les événements météorologiques ou encore de manière relativement régulière suite aux successions saisonnières. Ces changements de structure et de composition s'accompagnent souvent d'une évolution de la sensibilité aux toxiques. Il est donc important de considérer les modifications environnementales pour protéger de manière fiable les communautés naturelles.

Nous nous sommes intéressés à l'influence de certains paramètres environnementaux (température, saison) sur la dynamique et la composition de ces communautés, sur leur sensibilité aux herbicides.

Effet de la température (Larras et al 2013, *article 4*)

la température est un facteur clé de la dynamique des micro-algues d'eau douce. Nous avons testé l'impact d'herbicides à différentes températures (18 , 21 , 24 et 28 ° C) sur des communautés périphytiques de la zone littorale du lac Léman acclimatées au laboratoire pendant 3 semaines. Ces communautés acclimatés ont été exposées à 140 nM et 23nM du mélange équitoxiques d'atrazine, terbutryn, diuron et isoproturon.

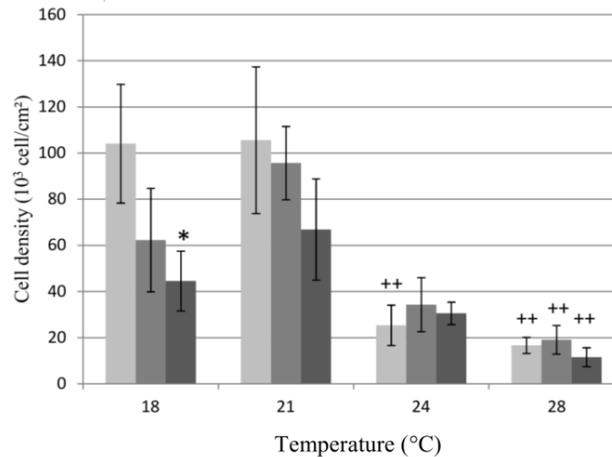


Fig. 11: Evolution de la densité cellulaire à différentes températures et différentes concentration en herbicide. Gris clair, gris foncé et noir représentent respectivement le contrôle, la concentration basse en mélange (23nM) et la concentration haute en mélange (140nM).

La communauté périphytiques s'est révélée plus sensible au mélange d'herbicide à 18 ° C qu'aux températures plus élevées (Figure 11), ce qui suggère que les températures plus élevées réduisent sa toxicité. Les espèces de diatomées pionnières et de petite taille connues pour leur résistance aux contaminations semblent également bénéficier des températures plus élevées. La température semble donc conditionner la sensibilité aux herbicides des communautés périphytiques. Ceci suggère que la sensibilité des communautés d'algues aux pesticides peut dépendre de la saison et des caractéristiques bioclimatiques. Enfin, cela montre que l'évaluation de l'effet des herbicides doit prendre en compte cette spécificité environnementale qui module la toxicité.

Effet de la saison (Larras et al, *in revision in Ecotoxicology*)

La sensibilité des communautés naturelles benthiques au mélange d'herbicides a été estimée en tenant compte de la variabilité saisonnière : communauté estivale (été 2012) et hivernale (hiver 2012-13). Les tests sont réalisés en microcosmes selon la démarche suivante :

- colonisation des microcosmes avec du biofilm lacustre pendant 3 semaines
- exposition sur 96h de la communauté du mélange equi-toxique à 4 différentes concentrations (HC1; HC5; HC10; HC30)
- end-points mesurés : diversité, chl a, biomasse, photosynthèse.

Les différences dans la composition des communautés de diatomées entre les saisons semblent être majoritairement influencées par les concentrations en nitrates de l'environnement et par la température. Les espèces de la communauté d'hiver étaient plus résistantes en termes de capacité photosynthétique (rendement PSII) et de croissance (Chl a) aux herbicides que les espèces de la communauté d'été (Figure 12). La variation de la composition de la communauté entre les saisons conduit à la présence / dominance d'espèces résistantes aux herbicides à des degrés divers, ce qui influence fortement la résistance globale de la communauté. Dans ce contexte, la variation saisonnière de sensibilité des communautés en raison de l'évolution de la composition taxonomique doit être prise en compte pour évaluer le risque lié à la présence d'herbicides en mélange.

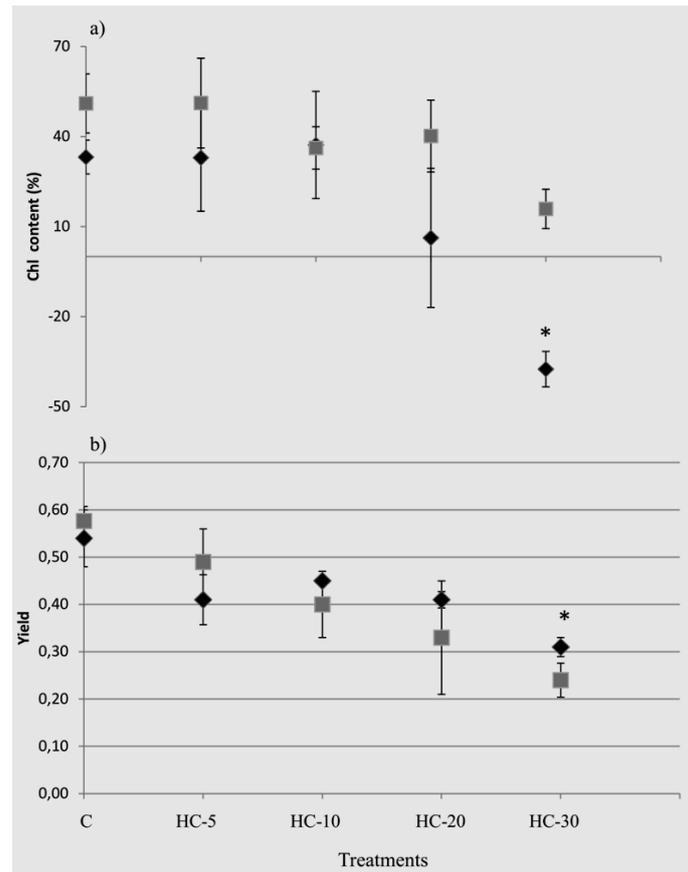


Figure 12: Evolution de a) la concentration en chl et b) le rendement du PSII en hiver (gris) et en été (noir) après 96h d'exposition au mélange d'herbicides.

En résumé, dans un contexte d'évaluation du risque des herbicides, l'intégration des co-effets des paramètres environnementaux (température, lumière, et éléments nutritifs) qui influent sur la dynamique, la structure et la composition de la communauté des microalgues semble être cruciale pour améliorer la pertinence environnementale de modèles et des seuils de qualité.

3.2.3. EVALUATION DE L'IMPACT DES MELANGES AU NIVEAU DES COMMUNAUTES NATURELLES – APPROCHES ENVIRONNEMENTALES:

Pour ces approches in situ nous nous sommes limités à l'étude des communautés planctoniques du lac Léman, afin de bénéficier (1) des longues séries de données du SOERE et de la CIPEL, ainsi que (2) d'une évaluation de sensibilité des communautés réalisée en 1999. Nous avons travaillé au point SHL2 qui correspond au point d'échantillonnage de la CIPEL, à peu près au milieu du lac, et qui a été montré comme représentatif des communautés de l'ensemble du lac.

Les communautés benthiques n'ont pas été abordées *in situ*, compte tenu du peu de recul et de connaissances actuelles sur ces communautés dans le lac Léman et sur leur sensibilité aux herbicides. Pour cette raison nous avons privilégié l'approche en microcosmes (ci-dessus) permettant d'assoir nos connaissances sur le sujet.

- **Echantillonnage in situ :**

L'évolution de la sensibilité des communautés planctoniques du lac Léman aux herbicides a été évaluée par une approche comparative (1999-2011) réalisée grâce à l'approche PICT (Bérard et al 2002). Au cours de l'année 2011, 13 prélèvements

de communautés phytoplanctoniques ont été réalisés. En parallèle, la concentration en atrazine et en cuivre (effet herbicide) ont été suivies pour chacun de ces prélèvements. Grace au SOERE et aux enregistrements de la CIPEL, nous disposons également de l'évolution des paramètres physico-chimiques de l'eau et des communautés phytoplanctoniques de 1999 à 2011. Dans le cadre du projet IMPALAC, nous avons pu assurer un suivi des concentrations en Cu et atrazine lors des 13 prélèvements. Au cours de cette période de 12 ans les concentrations en atrazine (molécule interdite en France en 2003, en Suisse en 2011) et en cuivre ont diminué dans le lac (Figure 13). En 2010, pour la première fois, depuis le début du suivi des micropolluants par la CIPEL (1989), les teneurs en atrazine sont descendues en dessous des seuils de détection ($<0.001 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) (CIPEL 2011).

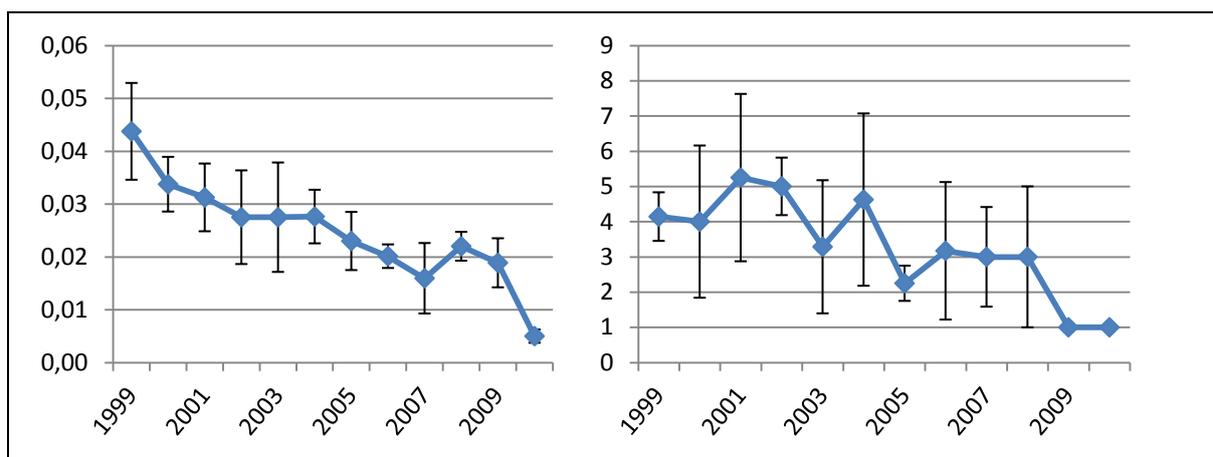


Figure 13: Evolution des concentrations ($\mu\text{g/L}$) en atrazine (droite) et cuivre (gauche) entre 1999 et 2011 dans la couche 0-10m des eaux du Léman au point SHL2.

Les assemblages des communautés phytoplanctoniques analysés par ACP (Figure 14) sont différents lors des 2 années. Cette variation semble liée notamment aux nutriments : les concentrations plus élevées en phosphore en 1999, et plus élevées en N organique en 2011 semblent structurer ces communautés.

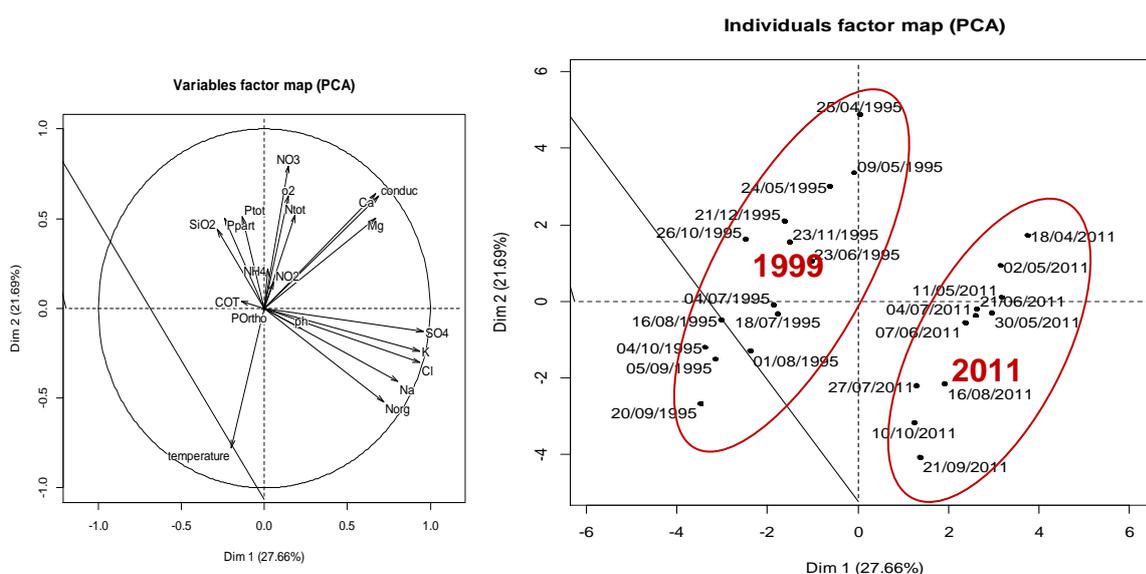


Figure 14: Evolution des concentrations ($\mu\text{g/L}$) en atrazine (droite) et cuivre (gauche) entre 1999 et 2011 dans la couche 0-10m des eaux du Léman au point SHL2.

Chaque année présente également une dynamique saisonnière qui semble en 1999 comme en 2011 être en lien avec la température de l'eau et les concentrations en sels nutritifs dans l'eau. Les communautés phytoplanctoniques rapportées au laboratoire lors de chaque prélèvement ont été immédiatement exposées à une gamme croissante d'atrazine et de cuivre, de façon à évaluer la sensibilité des communautés au cours de l'année. Une attention particulière a été portée à réaliser ces bioessais en suivant scrupuleusement le même protocole qu'en 1999, de façon à pouvoir comparer entre elles les données de sensibilité acquises à 12 ans d'intervalle. Les valeurs de sensibilité (CE50) acquise dans le cadre de ce projet ont été confrontées à celles recueillies 12 ans plus tôt dans les mêmes conditions (Tableau 6).

Tableau 6 : valeurs de sensibilité (CE50) à l'atrazine et au cuivre pour les communautés du lac Léman en 1999 et en 2011 (communautés au point SHL2).

	Atrazine CE50 (µg/L)		Cuivre CE50 (µg/L)	
	1999	2011	1999	2011
avril	57	43,41	6,8	0,16
mai	83	36,13	5,25	0,29
juin	71	26,02	5,5	1,99
juillet	62	34,37	5,9	0,46
août	61	13,88	26,1	1,10
septembre	29	11,14	7,55	0,63
octobre	96,5	13,84	8,55	0,71
novembre	160	10,22	3,9	0,42
décembre	163	119,17	13,2	0,05

Les CE50 extrapolées des courbes dos-effet sont plus nettement faibles en 2011 qu'en 1999, quelle que soit la saison d'échantillonnage, correspondant à une augmentation de la sensibilité des communautés à l'atrazine et au cuivre (Tableau 6). Il semble donc que la baisse des concentrations corresponde à un changement des communautés (Figure 15), communautés qui se révèlent plus sensibles aux toxiques. Cette augmentation de sensibilité, si elle est concomitante à la baisse des concentrations en toxiques est également couplée à des changements globaux observés sur le lac Léman : modification des températures, ré-oligotrophisation, présence de cocktail de contaminants, etc. L'approche PICT permet d'affirmer que le changement des communautés associé à une modification de leur sensibilité révèle une forte évolution à l'échelle de la dizaine d'années liée pour partie à la baisse des certains toxiques.

- **Séries pluriannuelles : Validation des prédictions de risque des mélanges d'herbicides par l'observation des changements du phytoplancton dans le lac Léman.**

Le suivi à long-terme du lac Léman par la CIPEL et du SOERE de l'INRA de Thonon nous ont donné l'opportunité d'évaluer dans quelle mesure la présence d'herbicides en mélange et à faibles doses pouvait expliquer les changements d'abondance du phytoplancton dans le Léman au cours des années, en comparaison avec d'autres paramètres classiques comme les variations de phosphore ou de température (Grégorio et al 2012, *article 1*).

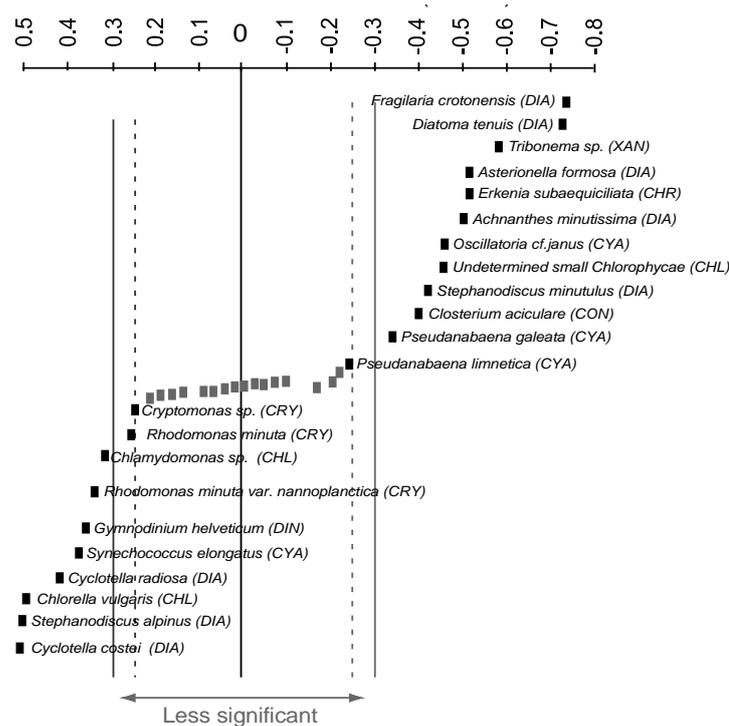


Figure 16 : Influence positive ou négative du gradient de toxicité du mélange sur l'abondance relative de certaines espèces phytoplanctoniques du lac Léman.

L'analyse des données de suivi chimique et phytoplanctonique de 2004 à 2009 (CIPEL), permet donc de conclure que la toxicité du mélange d'herbicides est un facteur clé pour expliquer les changements d'abondance du phytoplancton dans le Léman. Cependant les modifications d'assemblage de ces communautés sont également partiellement expliquées par l'évolution d'autres facteurs environnementaux tels les concentrations en nutriments, les températures, etc.

- **Approches de modélisation :**

Compte-tenu de l'exploitation rapide des données sur les communautés naturelles (ci-dessus), ainsi que de la difficulté à découpler les effets des différents facteurs affectant la dynamique du phytoplancton (6% seulement attribué au gradient d'herbicides), nous avons choisi, en accord avec le comité scientifique du programme « pesticides » de compléter ce volet par une approche de modélisation. En effet, il est aujourd'hui très difficile d'évaluer l'impact des mélanges de pesticides à faible dose sur la communauté phytoplanctonique des écosystèmes lacustres. L'approche expérimentale classique propre à l'écotoxicologie, montre des limites de logistique au vu du nombre de molécules à tester et d'espèces phytoplanctoniques présentes dans les systèmes lacustres. Les études de terrain basées sur l'observation sont, quant à elles, limitées par la faible quantité de données disponibles par rapport à la multitude des paramètres générant des effets sur la structure de ces communautés.

Il a donc été proposé une approche par la modélisation individu-centrée. Cette approche permet d'appréhender le système « communauté phytoplanctonique / environnement » dans son ensemble et d'analyser les structures qui émergent des relations entre les différentes composantes du système d'étude. En accord avec Alexandre Péry, cette approche de modélisation a donc été rajoutée et l'approche de modélisation individu centrée a été retenue.

1) Acquisition des paramètres de croissance et de toxicité des herbicides sur des espèces clés représentatives du milieu (Léman) :

L'objectif de cette étape est d'acquérir des données fiables et comparables pour paramétrer et tester notre modèle individus-centré. Les bioessais sont réalisés avec les 4 herbicides (Diuron, Isoproturon, Atrazine et Terbutryn) et 4 souches planctoniques (voir point 3.1.1) selon le protocole résumé en annexe 2. Les sensibilités de ces espèces aux herbicides ont été mesurées en laboratoire (Figure 17), et des courbes doses-réponses ont été modélisées pour chacune des souches et pour les 4 herbicides.

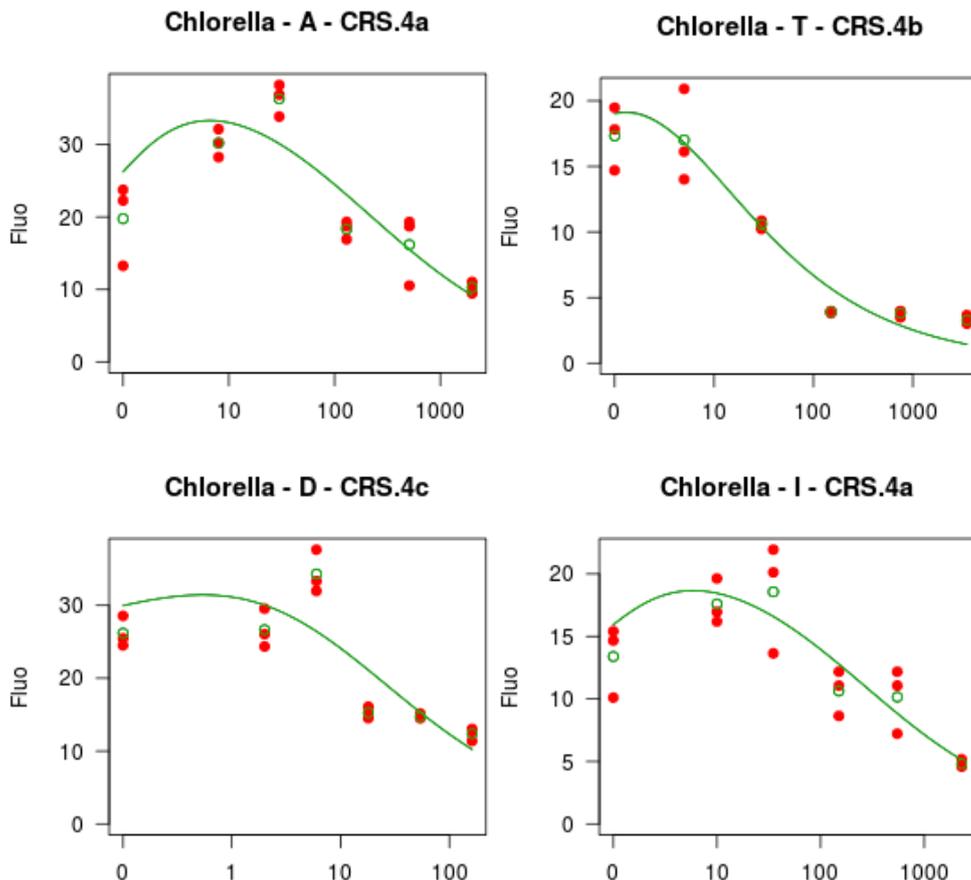


Figure 17 : Courbes doses réponse de *Chlorella vulgaris* aux 4 herbicides, A : atrazine, T : terbutryne, D : diuron et I : isoproturon.

Les relations dose-effet ainsi établies constituent la base de données sur la sensibilité d'espèces phytoplanctoniques.

2) Modélisation mathématique en individu-centré : PhytoHerb

La première étape du travail consistait en un travail bibliographique afin de faire l'état de l'art dans le domaine de la modélisation individu-centrée en écotoxicologie et en milieu aquatique.

Un modèle a ensuite été réalisé, PhytoHerb, et a été implémenté sous NetLogo 5.0 (Wilensky, 1999). Il s'agit d'un modèle individus-centré qui permet de modéliser la croissance d'une communauté phytoplanctonique en présence d'un cocktail d'herbicides. Ce modèle a été conçu pour les herbicides inhibiteurs du photosystème. Il peut être utilisé comme laboratoire virtuel pour tester des scénarios

de contaminations en herbicides et évaluer leur impact sur des communautés phytoplanctoniques composées de plusieurs espèces.

PhytoHerb s'inspire de la composante phytoplanctonique du modèle LERM (Lagrangian Ensemble Recruitment Model) proposé par Sinerchia et al. (2008). Dans ce modèle, chaque agent est une cellule phytoplanctonique et se comporte selon un ensemble de règles nommées « équations phénotypiques » (Sinerchia et al., 2008). Ces équations décrivent les fonctions biologiques des individus. Les principales règles qui gouvernent les agents sont la photosynthèse et la prise de nutriments, qui résultent en l'accumulation de carbone dans la cellule et la respiration, qui consomme le carbone. Pour chaque agent, le pool de carbone et de nutriment limitant (le phosphore) sont modélisés. La prise de nutriment et l'efficacité photosynthétique sont des traits de vies qui diffèrent selon les espèces et définissent des stratégies de vie spécifiques. Ces processus biologiques sont donc paramétrisés pour chaque espèce.

Les équations du LERM ont été utilisées pour la plupart des règles biologiques, mais certaines règles ont été simplifiées (par exemple, la photoadaptation dans le processus de photosynthèse a été supprimée). Les paramètres qui contrôlent la prise de nutriments et la photosynthèse sont des traits de vie spécifiques. Mais leurs valeurs n'étant pas référencées dans la littérature, les valeurs de la plupart des paramètres introduites dans le modèle ont été obtenues par des relations allométriques par rapport au volume de la cellule. Nous avons utilisé les allométries du phytoplancton d'eau douce autant que possible. Quand cette information n'était pas disponible, nous avons utilisé les allométries d'espèces marines. Le travail d'Edwards et al. (2012) liste la plupart des relations allométriques pour la prise en nutriments chez le phytoplancton d'eau douce.

L'effet herbicide a été ajouté dans le processus de photosynthèse à partir de la sensibilité des espèces à chacun des herbicides (relations doses-réponses des bioessais monospécifiques). Beaucoup de ces courbes présentaient un effet d'hormesis. C'est à dire une stimulation de la croissance pour aux faibles doses en herbicide. Les modèles log-logistic ou Cedergreen-Ritz-Streibig (Cedergreen et al 2005) qui rendent compte de l'hormesis ont donc été ajustés aux données (Figure 18).

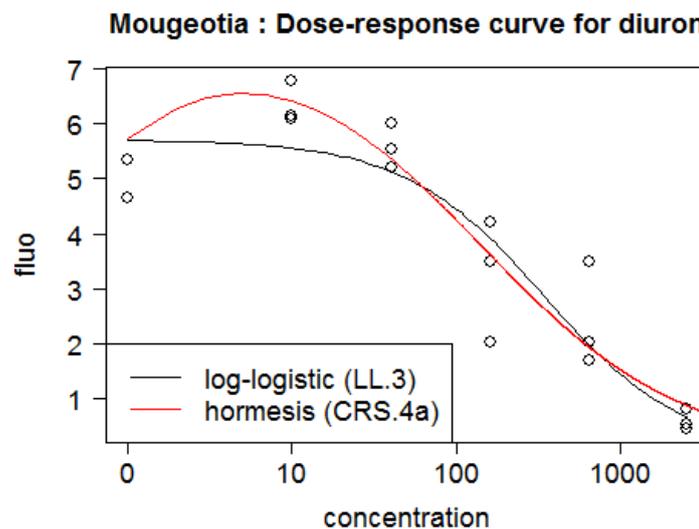


Figure 18 : Ajustement des modèles log-logistic et Cedergreen-Ritz-Streibig à la relation dose-effet de *Mougeotia gracillima* au diuron.

L'accumulation de carbone est contrôlée par l'intensité lumineuse et des paramètres spécifiques, mais également par la concentration en nutriments présents dans la cellule, la température et la concentration en herbicide. Le taux photosynthétique est donné par une équation faisant intervenir des paramètres qui traduisent des traits de vie spécifiques aux différentes espèces et correspondant à des stratégies différentes. L'herbicide influence directement le taux photosynthétique maximal selon une équation qui transcrit la sensibilité de l'espèce à l'herbicide ou au cocktail d'herbicides (Figure 19).

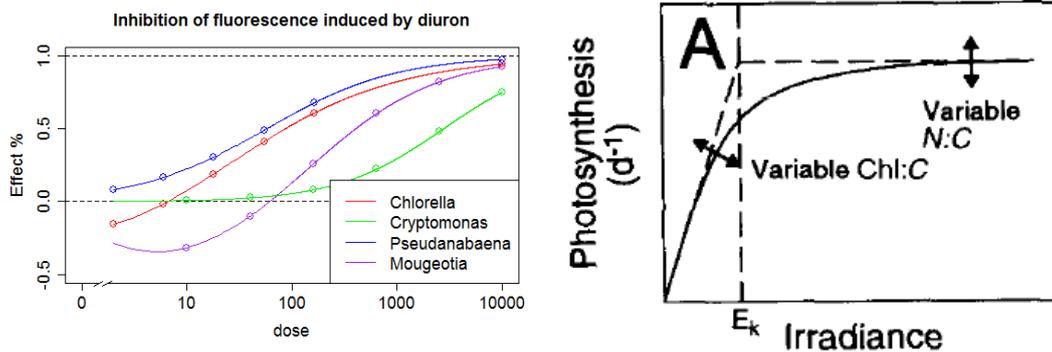


Figure 19 : Estimation de la sensibilité des espèces à partir des courbes dose-effet et incorporation de cette sensibilité dans le calcul du taux de photosynthèse.

La sensibilité d'une espèce à un mélange en herbicide a été obtenue en appliquant le modèle de concentration addition (CA) qui est généralement utilisé pour prédire les effets de substances en mélange (substances ayant le même mode d'action).

Le modèle PhytoHerb existe deux versions:

- Une version « laboratoire virtuel » (PhytoHerbL) en environnement homogène, pour tester et valider le modèle en termes de taux de croissances spécifiques et d'effets des herbicides. Cette version présente deux sous-versions, l'une prenant en considération l'hormesis aux faibles concentrations dans le calcul de la sensibilité aux herbicides et l'autre pas. Ces deux sous-versions ont été réalisées dans l'objectif d'estimer l'importance du rôle de l'hormesis dans la structuration de communautés phytopanctoniques soumises à de très faibles concentrations en pesticides.
- Une version « écosystème » (PhytoHerbE), utilisée pour tester des scénarios de contamination dans des conditions environnementales caractérisées par une hétérogénéité spatiale. Il s'agit d'un modèle 1D avec un gradient de lumière.

La composition de la communauté (en termes d'abondance spécifique) est donc une propriété émergente du modèle. PhytoHerb sera utilisé comme laboratoire virtuel pour tester des scénarios de contaminations en herbicides et évaluer leur impact sur des communautés phytoplanctoniques composées de plusieurs espèces. Notamment, nous pourrions tester diverses hypothèses liées à l'impact et à l'évaluation de l'impact de cocktails de pesticides à faible doses sur les communautés phytoplanctoniques.

L'utilisation du modèle pour tester des scénarios est encore en cours, compte-tenu de son démarrage tardif dans le projet suite à la réorientation présentée plus haut.

3.3. CONFRONTATION DES DEUX APPROCHES : ECARTS AUX MODELES DE PREDICTION DES RISQUES

Sensibilité des communautés versus espèces

L'effet prédit du mélange quaternaire à partir de tests monospécifiques et du modèle CA a été comparé à l'effet observé du même mélange sur un assemblage "contrôlé" d'espèces de diatomées exposé en microcosmes à un gradient de 8 concentrations du mélange.

Les sensibilités de deux espèces (FRUM et ADMI) semblent similaires dans des conditions simples et multi-espèces, mais la sensibilité dans des conditions multi-espèces a été légèrement sous-estimée pour CMEN, et considérablement sous-estimée pour les quatre autres espèces (Figure 20). Cependant, la CE50 de FRUM obtenue dans des conditions multi-espèces est moins robuste, car elle a été dérivée numériquement de la courbe dose-réponse pour laquelle la plus faible concentration testée inhibe déjà la croissance de plus de 50%. Pour NPAL, CRAC, GPAR et SEMN, la CE50 prédite en test monospécifique est supérieure à la CE50 obtenue avec les mêmes espèces cultivées en assemblage, sous-estimant l'effet du mélange.

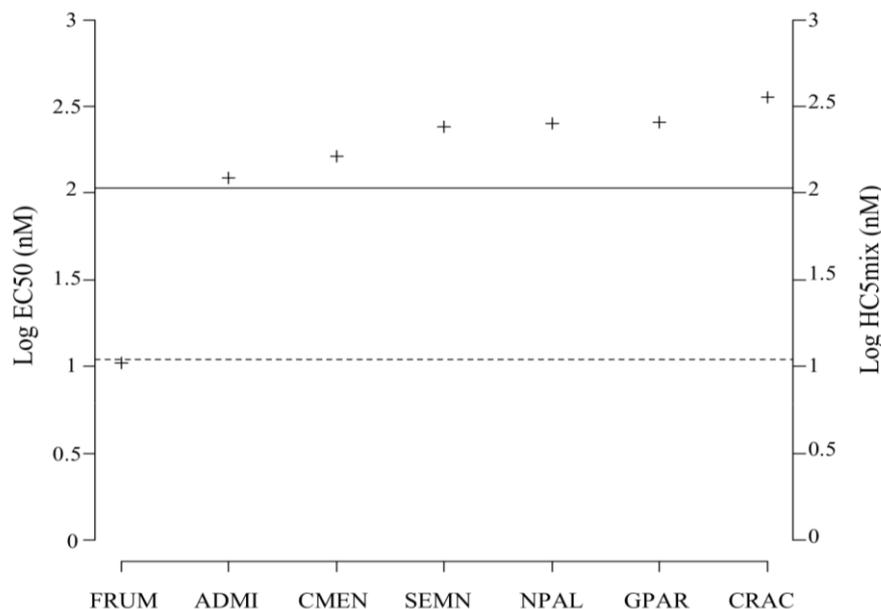


Figure 20: EC50 (nM) de chaque espèce pour le mélange basé sur le taux de croissance spécifique en assemblage. La ligne pointillée représente la HC5mix dérivée de la G-SSDmix et la ligne en trait plein représente la HC5mix dérivée de la S-SSDmix.

Les CE50 extrapolées pour le mélange à l'aide du modèle CA ont été mal estimées et sont différentes des CE50 obtenues dans des conditions multi-espèces. La sensibilité des diatomées benthiques semble évoluer avec la complexité biologique du système. Les bioessais monospécifiques largement utilisés en écotoxicologie sont censés fournir des données de sensibilité qui reflètent les sensibilités des espèces dans leur milieu naturel, même s'ils sont en fait menés en laboratoire dans des conditions optimales et standardisés. Même si ces tests sont des outils utiles pour évaluer la toxicité des produits chimiques de base et sont nécessaires pour les processus d'évaluation de risque, ils représentent mal la réalité environnementale.

Effets environnementaux et écarts de prédiction:

Bâtir des SSD spécifiques à une communauté nécessite une détermination taxonomique de la communauté et les valeurs de sensibilité des espèces identifiées aux contaminants. Notre base de données de sensibilité nous a permis de construire une SSD spécifique de la communauté des diatomées du lac Léman au mélange des quatre herbicides. Les seuils dérivés (HC) ont été comparés aux sensibilité observées en mésocosme aux deux saisons. En ce qui concerne les paramètres structurels, le seuil de HC5 semble être particulièrement protecteur pour la communauté d'hiver par rapport à la communauté d'été déjà affectée à ce seuil (Figure 21). Le fait que le seuil HC5 ne protège pas la composition de la communauté d'été est due à 1 / la dominance de diatomées sensibles aux herbicides et 2 / la présence de quelques espèces algales autres plus sensibles aux herbicides que les diatomées. Le niveau protecteur HC5 semble être fortement tributaire des conditions physico-chimiques qui influent directement la structure et la composition de la communauté.

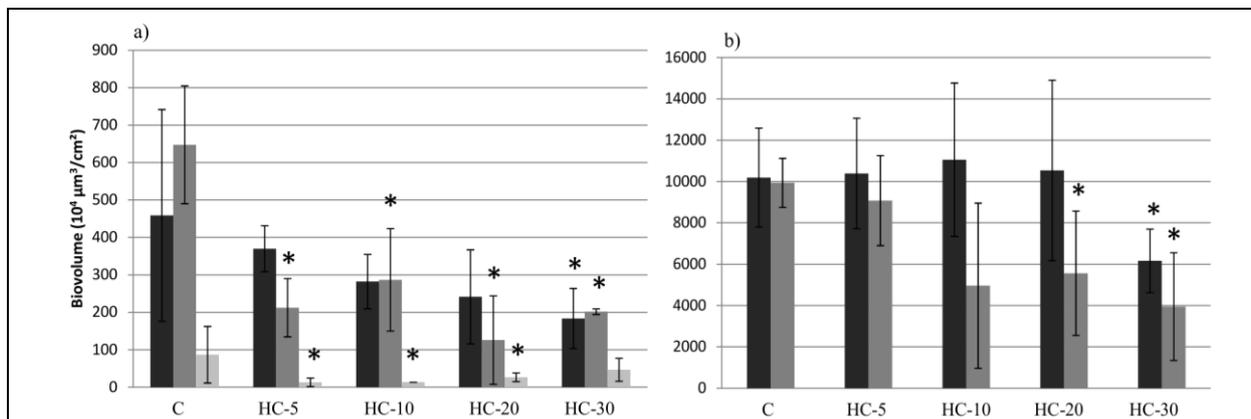


Figure 21: Biovolume des diatomées (noir), cyanobactéries (gris foncé), et chlorophycées (gris clair) en a) été et b) hiver après 96 h d'exposition au mélange d'herbicides.

Le seuil HC5 n'était pas protecteur fonctionnellement (rendement du PSII) aux deux saisons (Figure 12). Les paramètres structurels de la communauté semblent moins sensibles que les paramètres fonctionnels aux deux saisons. Les conditions hivernales ayant favorisé une plus grande diversité d'espèces relativement résistantes aux herbicides inhibiteurs du PSII, le seuil HC5 se trouve plus protecteur pour cette communauté que pour la communauté estivale.

Par conséquent, le seuil protecteur HC5 dérivé des SSD avait un effet protecteur pour la communauté hivernale, mais pas pour la communauté estivale. Un seuil protecteur pour la communauté microalgale benthique contre les herbicides devrait donc tenir compte des changements des conditions physico-chimiques de l'environnement qui influencent fortement ces communautés. Dans l'attente de SSD adaptées, ce résultat souligne l'intérêt encore actuel d'utiliser des facteurs d'évaluation ("assessment factors" pour dériver les PNEC) en évaluation du risque *a priori* pour contrebalancer ce type de variations. Pour utiliser les SSD en évaluation du risque, il est utile d'utiliser des espèces présentes dans le milieu, et notamment les plus sensibles au cours des différentes saisons pour permettre de dériver des seuils de protection efficaces tout au long de l'année.

Approche de modélisation : "mésocosme virtuel"

Enfin, le "mésocosme virtuel" du modèle PhytoHerb initié pour tester des scénarios de contamination au faibles doses et en mélange devrait permettre à terme de comparer évaluation *a priori* et évaluation *a posteriori* à partir des propriétés émergentes des communautés révélées par le modèle.

Le développement et l'utilisation du modèle pour tester des scénarios sont encore en cours, compte-tenu de son démarrage tardif dans le projet suite à la réorientation présentée plus haut.

4. CONCLUSIONS

L'évaluation du risque est basée sur des données de sensibilité acquises sur des espèces bien souvent peu représentatives des communautés naturelles des écosystèmes aquatiques récepteurs des pesticides. Si nous avons dans le cadre du projet IMPALAC apporté des données de sensibilité plus représentatives, il reste difficile de lier l'évaluation du risque à l'écologie des espèces. Au vu de nos résultats, l'outil d'évaluation du risque que sont les SSD nécessite certains ajustements pour la protection des communautés naturelles. Dans un premier temps, il est démontré que les protocoles normalisés d'évaluation de la sensibilité des microalgues à des substances chimiques (en particulier les hydrophobes) ne sont pas adaptés (ou non écologiquement pertinents) à certaines communautés, notamment celle des diatomées benthiques, et conduisent à une mauvaise estimation de sensibilité et par conséquent du risque. Aussi, 1/ la variabilité temporelle des communautés naturelles, 2/ la forte variabilité interspécifique de la sensibilité et 3/ le changement de sensibilité associé au changement de diversité des communautés naturelles (effet des facteurs environnementaux confondants), représentent un vrai verrou scientifique concernant le réalisme écologique des courbes SSD et la fiabilité des seuils dérivés. Le développement de méthodes permettant d'obtenir des seuils de protection efficace reste donc une priorité pour laquelle trois perspectives se distinguent :

- 1- Pondérer les espèces au sein de la courbe SSD qui reposerait à la fois sur une composante écologique (évaluation de l'abondance relative des espèces dans la communauté) et statistique (pondération au sein de la courbe).
- 2- Focaliser sur la fraction la plus sensible des communautés. Par exemple pour les diatomées benthiques et les inhibiteurs du PSII: sur les centriques, les araphidées et les raphidées*autotrophes. Ce type d'approche permettrait de travailler sur des niveaux de sensibilité plus bas, donc plus protecteurs.
- 3- Réaliser les courbes SSD sur les espèces présentes *in situ*, au moment où la communauté est la plus sensible sur un pas de temps donné (e.g. : une année). Cependant une telle approche nécessite d'évaluer l'évolution temporelle de la sensibilité de la communauté dans un environnement type « pristine » afin que le changement de sensibilité ne soit pas attribuable à une contamination mais bien à la réponse aux changements naturels physico-chimiques.

Concernant les seuils protecteurs (HC), il reste encore de nombreuses zones d'ombres autour de leur pertinence biologique : effets indirects engendrés sur les niveaux trophiques supérieurs, importance écologique réelle des 5% d'espèces affectées, effets sur le long terme (dérive de populations, perte très progressive de fonctionnalité), etc. En effet, si 5% d'espèces « seulement » sont affectées au sein

de la communauté, mais que celles-ci sont une cible préférentielle pour un consommateur supérieur, alors d'autres espèces pourraient être également affectées au niveau trophique supérieur à cause de la propagation d'effets. A partir de quel pourcentage d'espèces affectées au sein de l'écosystème peut-on réellement considérer que le risque est acceptable? Dans ce contexte, la définition des rôles structurels et fonctionnels au sein de la communauté des espèces qui ne seront pas protégées par les seuils, apparaît cruciale, tout comme la caractérisation de leur résilience lorsque la pression toxique est levée.

Dans le contexte actuel de contamination des écosystèmes aquatiques, il semble capital d'envisager l'évaluation des effets et du risque des faibles doses et des mélanges (à des ratios de substances proches de ce que l'on observe dans les mélanges réels dans l'environnement). Il serait donc important d'inclure les mélanges dans les évaluations de risque environnemental des substances chimiques. Ceci est actuellement discuté au niveau européen. Cependant, tenir compte des mélanges dans les évaluations de risque se heurte à plusieurs problèmes. Premièrement le manque de données sur les effets écotoxicologiques des substances, ainsi que sur les modes d'action de ces dernières (qui permettent de classer les types de mélanges).

La méthode proposée actuellement est donc une méthode de screening se basant sur des modes d'action similaires et des valeurs de non-effet (PNEC). Cette méthode permet de mettre en évidence des substances particulièrement problématiques, ce qui peut être utile en termes de management environnemental. Elle n'est cependant pas très robuste. Une méthode plus robuste implique l'utilisation de courbes de distribution de sensibilité des espèces. Ici également, le chercheur se heurte très rapidement au manque de données pour une application "théoriquement correcte" de cette méthode.

Notre étude, tout en apportant des données de base de sensibilité, a montré que les SSD sont néanmoins utilisables en n'appliquant pas les modèles de mélanges espèce par espèce, mais sur toutes les espèces. Le risque de sous-estimer le risque du mélange est alors faible, sauf dans les cas rares où les courbes dose-réponse des différentes substances sont très plates. Il nous paraît donc judicieux de conseiller d'utiliser cette approche, plus robuste, lorsque cela est possible.

Enfin, les modèles de risque utilisés sont des approches théoriques. Se pose donc la question du réalisme des prédictions. Nos travaux ont permis de montrer que les mélanges de substances chimiques jouent un rôle dans les fluctuations de communautés lacustres. Il nous semble donc particulièrement important d'insister sur la prise en compte des mélanges dans les évaluations de risque. Ceci pose toutefois la question du management du risque, puisque cette fois-ci, ce n'est pas une substance qui doit être légiférée, mais bien un ensemble de substances provenant de sources parfois très différentes.

Par ailleurs, les écosystèmes aquatiques sont de plus en plus soumis à des rejets autres que les pesticides (e.g., rejets de substances pharmaceutiques) dont les effets n'ont pas été clairement identifiés, en substances seules et en mélange, en particulier sur les microalgues. L'application des méthodes SSD à ces mélanges de contaminants devient donc indispensable. La problématique des mélanges est aujourd'hui au cœur de l'écotoxicologie et de l'évaluation du risque environnemental, mais le degré de complexité supplémentaire qu'ils induisent n'est pas encore entièrement compatible avec les outils d'évaluation du risque actuels. Si les

approches de recherche peuvent donner (et donnent) des éléments de compréhension sur les mécanismes de l'exposition et la réponse biologique, leur traduction en éléments de connaissance intégrables aux outils de gestion reste encore un réel verrou opérationnel.

Références

- Altenburger R, Backhaus T, Boedecker W, Faust M, Scholze M, Grimme LH. (2000) Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri*: mixtures composed of similarly acting chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 19: 2341-2347.
- Anneville O, Ginot V, Druart J-C, Angeli N. (2002) Long-term study (1974-1998) of seasonal changes in the phytoplankton in Lake Geneva: a multi-table approach. *Journal of Plankton Research*; 24: 993-1007.
- Arrhenius Å, Backhaus T, Grönvall F, Junghans M, Scholze M, Blanck H. (2006) Effects of three antifouling agents on algal communities and algal reproduction: mixture toxicity studies with TBT, Irgarol and Sea-nine. *Archiv of Environmental Contamination and Toxicology*; 50: 335-345.
- Arrhenius A, Grönvall F, Scholze M, Backhaus T, Blanck H. (2004) Predictability of the mixture toxicity of 12 similarly acting congeneric inhibitors of photosystem II in marine periphyton and epipsammon communities. *Aquatic Toxicology*; 68: 351-367.
- Backhaus T, Altenburger R, Arrhenius A, Blanck H, Faust M, Finizio A, et al. (2003) The BEAM-project: prediction and assessment of mixture toxicities in the aquatic environment. *Continental Shelf Research*; 23: 1757-1769.
- Backhaus T, Altenburger R, Boedecker W, Faust M, Scholze M, Grimme LH. (2000) Predictability of the toxicity of multiple mixture of dissimilarly acting chemicals to *Vibrio fischeri*. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 19: 2348-2356.
- Belden JB, Gilliom R, Lydy MJ. (2007) How well can we predict the toxicity of pesticide mixtures to aquatic life? *Integrated Environmental Assessment and Management*; 3: 364-372.
- Bérard A, Dorigo U, Humbert JF, Leboulanger C and Seguin F, (2002) La méthode PICT (Pollution-Induced Community Tolerance) appliquée aux communautés algales: intérêt comme outil de diagnose et d'évaluation écotoxicologique en milieu aquatique. *Ann. Limnol.* 38:247-261
- Bérard A, Dorigo U, Mercier I, Becker van-Slooten K and Leboulanger C, (2003) Comparison of the ecotoxicological impact of triazines Irgarol 1051 and atrazine on microalgal cultures and natural microalgal communities in Lake Geneva. *Chemosphere* 53: 935-944
- Bérard A, Dorigo U, Humbert J.F, Leboulanger C and Seguin E, (2002) Application of the Pollution-Induced Community Tolerance (PICT) method to algal communities: its values as a diagnostic tool for ecotoxicological risk assessment in the aquatic environment, *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology*, 38, 3: 247-261.
- Biggs B.J.F, (2000) New Zealand periphyton guideline: detecting, monitoring and managing enrichment of streams. Ministry for the Environment, 121 p.
- Bishop WE, Cardwell RD, Heidolph BB. (1983) *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Sixth Symposium*. Philadelphia: ASTM Special Technical Publication 802.
- Blanck H, Wänkberg SÅ, Molander S (1988) Pollution-Induced Community Tolerance - A new ecotoxicological tool. Functional testing of aquatic biota for estimating hazards of chemicals. J. Cairns, Jr. and J. R. Pratt. Philadelphia, ASTM STP 988:219-230.
- Calow P, Forbes V (2003). Ecotoxicology ecological risk assessment? *Environmental Science and Technology* 146-151.
- Cedergreen N, Ritz C, Streibig JC (2005) Improved empirical models describing hormesis. *Environ. Toxicol. Chem.* 24: 3166-72.
- Chapman PM, Fairbrother A, Brown D. (1998) A critical evaluation of safety (uncertainty) factors for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 17: 99-108.
- Chèvre N, Brazzale AR, Becker-van Slooten K, Behra R, Tarradellas J, Guettinger H. (2005) Modeling the concentration-response function of the herbicide dinoseb on *Daphnia magna* (survival time, reproduction) and *Pseudokirchneriella subcapitata* (growth rate). *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 62: 17-25.
- Chèvre N, Loepfe C, Singer H, Stamm C, Fenner K, Escher B (2006) Including mixtures in the determination of water quality criteria for herbicides in surface water. *Environmental Science and Technology*; 40: 426-435.

- Chèvre N, Maillard E, Loepfe C, Becker-van Slooten K. (2008) Determination of water quality standards for chemical mixtures: extension of a methodology developed for herbicides to a group of insecticides and a group of pharmaceuticals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 71:740-748.
- CIPEL (2008) Rapports sur les études et recherches entreprises dans le bassin lémanique. Programme quinquennal 2006-2010, campagne 2007. <http://www.cipel.org/sp/article229.html>
- CIPEL (2011) Rapports sur les études et recherches entreprises dans le bassin lémanique. Programme quinquennal 2006-2010, campagne 2010. <http://www.cipel.org/sp/article265.html>
- De Zwart D. (2005) Ecological effects of pesticide use in The Netherlands: modeled and observed effects in the field ditch. *Integrated Environmental Assessment and Management*; 1: 123-134.
- De Zwart D, Posthuma L. (2005) Complex mixture toxicity for single and multiple species: proposed methodologies. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 24: 2665-2676.
- Delignette-Muller ML, Pouillot R, Denis JB, Dutang C. (2012) Package "fitdistrplus". Help to fit of a parametric distribution to non-censored or censored data.
- Dorigo U, Le Boulanger C, Bérard A, Bouchez A, Humbert J.F, Montuelle B, (2007) Lotic biofilm community structure and pesticide tolerance along a contamination gradient in a vineyard area, *Aquatic Microbial Ecology*, vol. 50, p. 91-102
- Dorigo U, Lefranc M, Le Boulanger C, Montuelle B and Humbert J.F, (2009) Influence of sampling strategy on the assessment of the impact of pesticides on periphytic microbial communities in a small river, *FEMS Microbial Ecology*, 67,491-501.
- Dorigo U, Bérard A, Bouchez A, Rimet F and Montuelle B (2010) Transplantation of microbenthic algal assemblages to assess structural and functional recovery after diuron exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 59: 555-563
- Duboudin C, Ciffroy P, Magaud H. (2004) Acute-to-chronic species sensitivity distribution extrapolation. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 23: 1774-1785.
- Edder P, Ortellì D, Ramseier S, Chèvre N. (2007) Métaux et micropolluants organiques dans les eaux du Léman. Campagne 2006. editor. CIPEL, Changins, Switzerland, , pp. 59-81.
- Edwards KF, Thomas MK, Klausmeier CA, Litchman E (2012). Allometric scaling and taxonomic variation in nutrient utilization traits and maximum growth rate of phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 57, 554–566.
- European Commission (2003) Technical Guidance Document on Risk Assessment. TGD Part II. Institute for Health and Consumer Protection, European Chemicals Bureau, European Commission (EC), Ispra, Italy,.
- Faust M, Altenburger R, Backhaus T, Boedecker W, Hamer V, Scholze M, et al. (1999) Algal toxicity of multiple mixtures of triazines and phenylureas, Poster presentation, 9th Annual Meeting of SETAC Europe, 25-29 May 1999, Leipzig, Germany.
- Faust M, Altenburger R, Boedecker W, Grimme LH. (1994) Algal toxicity of binary combinations of pesticides. *Bulletin of environmental Contamination and Toxicology*; 53: 134-141.
- Garmouma M, Blanchard M, Chesterikokk A, Ansart P, Chevreuil M. (1997) Seasonal transport of herbicides (triazines and phenylureas) in small stream draining an agricultural basin: Mèlarchez (France). *Water Research*; 31: 1489-1503.
- Gregorio V, Buchi L, Anneville O, Rimet F, Bouchez A, Chèvre N (2012) Risk of herbicides mixture as a key parameter to explain phytoplankton fluctuation in a great lake: the case of lake Geneva, Switzerland. *Ecotoxicology* 21:2306-2318
- Gregorio V, Chèvre N, Junghans M (2013) Critical issues in using the common mixture toxicity models Concentration Addition or Response Addition on Species Sensitivity Distributions: a theoretical approach. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(10):2387–2395
- Guasch H and Sabater S (1998) Light history influences the sensitivity to atrazine in periphytic algae. *Journal of Phycology* 34: 233-241.
- Guasch H, Muñoz I, Rosés N and Sabater S. (1997) Changes in atrazine toxicity throughout succession of stream periphyton communities. *J. Appl. Phycol.* 9, 132-46.
- Gustavson K, Møhlenberg F, Schlüter L. (2003) Effects of exposure duration of herbicides on natural streams periphyton communities and recovery. *Archiv of Environmental Contamination and Toxicology*; 45: 48-58.
- ISO, Water quality (2004) Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data. Draft. International Organization for Standardization (ISO), Geneva.
- Jeppesen E, Søndergaard M, Jensen J. P., Havens K., Anneville O, Carvalho L, Coveney M.F, Deneke R, Dokulil M, Foy B, Gerdeaux D, Hampton S.E, Kangur K, Köhler J, Körner S, Lammens E, Lauridsen T.L, Manca M, Miracle R, Moss B, Nöges P, Persson G, Phillips G, Portielje R, Romo S, Schelske C.L, Straile D, Tatrai I, Willén E, Winder M, (2005) Lake

- responses to reduced nutrient loading - an analysis of contemporary long-term data from 35 case studies. *Freshw. Biol.*, 50, 10, p. 1747-1771..
- Larras F, Bouchez A, Rimet F, and Montuelle B (2012) Assessment of Species Sensitivity Distribution of benthic diatoms to herbicides using single species bioassays. *PLoS ONE* 7(8):e44458
- Marcel R, Bouchez A and Rimet F (2013) Influence of herbicide contamination on diversity and ecological guilds of river diatoms. *Cryptogamy Algology* 34(2):169-183
- Larras (2013) L'approche de modélisation SSD (Species Sensitivity Distributions) appliquée à l'évaluation du risque des herbicides pour les diatomées benthiques : éléments d'amélioration et pertinence écologique. Thèse soutenue le 26/11/2013, INRA, U.de Savoie, 249pp.
- Larras F, Montuelle B and Bouchez A (2013) Assessment of toxicity thresholds in aquatic environments: does benthic growth of diatoms affect their exposure and sensitivity to herbicides? *STOTEN* 463-464:469-477
- Larras F, Lambert A.S, Pesce S, Rimet F, Bouchez A, Montuelle B (2013) The effect of temperature and an herbicide mixture on freshwater periphytic algae. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 98:162-170
- Larras F, Keck F, Montuelle B, Rimet F, Bouchez A (2014) Linking diatoms sensitivity to herbicide to phylogeny: a step forward for biomonitoring? *Environ. Sci. Technol.* DOI/10.1021/es4045105
- Leboulanger, C, F. Rimet, M. Heme de la Cote and A. Bérard. (2001) Effects of atrazine and nicosulfuron on freshwater microalgae. *Environ. Internat.* 26:130-135
- Leboulanger C, Amalric L, Bouchez A, Bouvy M, Carré C, Cecchi P, Pagano M and Sarazin G. (2011) Comparison of the effects of two herbicides and an insecticide on tropical freshwater plankton in microcosms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 61:599-613
- Lecoite C, Coste M, Prygiel J (1993) Omnidia software for taxonomy, calculation of diatom indices and inventories management. *Hydrobiologia*, n° 269-270, p. 509 - 513
- Lepper P. (2004) Manual on the methodological framework to derive environmental quality standards for priority substances in accordance with Article 16 of the Water Framework Directive (2000/60/EC). Fraunhofer-Institute Molecular Biology and Applied Ecology, Schmallenberg, Germany.
- Leu C, Singer H, Stamm C, Müller SR, Schwarzenbach RP. (2004) Simultaneous assessment of sources, processes, and factors influencing herbicide losses to surface waters in a small agricultural catchment. *Environmental Science and Technology*; 38: 3827-3834.
- Loewe S, Muischnek H. (1926) Über die Kombinationswirkungen. 1. Mitteilung: Hilfsmittel der Fragestellung. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*; 114: 313-326.
- Macinnis-Ng CM, Ralph PJ. (2004) In situ impact of multiple pulses of metal and herbicide on the seagrass, *Zostera capricorni*. *Aquatic Toxicology*; 67: 227-237.
- Mohr S, Berghahn R, Feibicke M, Meinecke S, Ottenströer T, Schmiedling I, et al. (2007) Effects of the herbicide metazachlor on macrophytes and ecosystem function in freshwater pond and stream mesocosms. *Aquatic Toxicology*; 82: 73-84.
- Montuelle B, Bérard A, Lagadic L, Caquet T, (2007) Evaluation de l'impact écologique lié à la présence de pesticides dans les eaux, Mer et Littoral, Lacs et Cours d'eau, vol. 73, p. 40-46
- Newman MC, Ownby DR, Mezin LCA, Powell DC, Christensen TRL, Lerberg SB, Anderson BA (2000). Applying species-sensitivity distributions in ecological risk assessment: assumptions of distribution type and sufficient numbers of species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19:508-515.
- Pesce S, Bouchez A and Montuelle B (2011) Effects of Organic Herbicides on Phototrophic Microbial Communities in Freshwater Ecosystems. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 214:87-124
- Rimet F and Bouchez A (2011) Use of diatom life-forms and ecological guilds to assess pesticide contamination in rivers: lotic mesocosm approaches. *Ecological Indicators* 11:489-499
- Ritz C, Streibig JC (2005). Bioassay Analysis using R. *Journal of Statistical Software* 12:1-22.
- Sinerchia M., Vallerga S., Woods J. D. (2008) The Lagrangian Ensemble recruitment model (LERM). *Virtual Plankton Ecology Technical Report*, 227 pp.
- Tlili A, Montuelle B, Bérard A and Bouchez A (2011) Impact of chronic and acute pesticides concentrations on periphyton autotrophic communities: testing exposure scenarios and pesticides partition. *STOTEN* 409:2102-2113
- Wilensky U (1999). *NetLogo* [computer software]. Center for Connected Learning and Computer-Based Modeling, Northwestern University, Evanston, IL.
-

5. ANNEXES

ANNEXE 1: CE₅₀ et CE₅ (µg/l) extrapolées des courbes dose-effet pour 5 herbicides et 11 espèces de diatomées.

Species	CE _x	Herbicides				
		Diuron	Atrazine	Isoproturon	Terbutryn	Metolachlor
<i>Craticula accomoda</i>	CE ₅₀	1734 [1578;1985]	919 [865;1011]	853. [808 ; 901]	814 [751; 877]	30147 [17134; 44657]
	CE ₅	261 [210; 292]	524 [514;534]	277 [251; 294]	92[72; 113]	2575 [1729; 2999]
<i>Eolimna minima</i>	CE ₅₀	4236 [3905; 4529]	2510 [2313;2748]	1566 [1536; 1594]	3133 [2728 ; 3512]	>50000
	CE ₅	3007 [2809; 3173]	1443 [1397;1499]	747 [611; 1139]	1450 [1211 ; 1790]	
<i>Mayamaea fossalis</i>	CE ₅₀	463 [311; 658]	8297 [7893;8900]	1664 [1625;1713]	63 [61; 67]	10313 [8510;12020]
	CE ₅	74 [62;89]	4766 [3861 ; 5389]	559 [546; 576]	13 [10;18]	3393 [1791; 4389]
<i>Encyonema silesiacum</i>	CE ₅₀	8.79 [7.51;9.88]	-	44 [42; 47]	5.15 [4.26; 6.30]	6399 [5946; 6522]
	CE ₅	3.11 [2.10;4.21]	-	12.51 [11.26; 13.47]	0.55 [0.40;0.78]	54 [52; 56]
<i>Gomphonema parvulum</i>	CE ₅₀	2255 [1920 ; 2518]	907 [837; 995]	1014 [962; 1065]	464 [409; 564]	4054 [3397;4384]
	CE ₅	904 [739; 1144]	588 [554; 633]	652 [505; 892]	22 [20; 26]	299 [160; 391]
<i>Fragilaria capucina</i> var <i>vaucheriae</i>	CE ₅₀	4.03 [3.93; 4.16]	801[689; 966]	117 [98; 131]	60 [59; 62]	>50000
	CE ₅	0.069 [0.062; 0.073]	205 [125;287]	35 [31; 38]	31 [28; 34]	
<i>Fragilaria ulna</i>	CE ₅₀	51 [48; 54]	306 [289; 318]	74.38 [65.91;85.24]	56 [45; 60]	3314 [2609; 3570]
	CE ₅	12.6 [11.37; 13.0]	191 [173; 207]	30 [27;33]	0.85 [0.73; 0.95]	60 [52; 68]
<i>Fragilaria rumpens</i>	CE ₅₀	122 [117; 127]	629 [596; 756]	357 [319; 450]	477 [457; 497]	>50000
	CE ₅	18 [13; 20]	210 [164;304]	22 [18; 30]	0.70 [0.51; 0.90]	
<i>Nitzschia palea</i>	CE ₅₀	1539 [1336; 1697]	3988 [3519; 4467]	1577 [1364; 1881]	1414 [1186; 1663]	>50000
	CE ₅	106 [77; 129]	596 [411;798]	222 [189; 271]	81 [41; 108]	
<i>Achmanthidium minutissimum</i>	CE ₅₀	108 [89; 137]	748 [562;888]	173 [150; 205]	411 [372; 447]	8551 [7067; 9853]
	CE ₅	3.15 [2.61; 3.87]	129 [109;143]	24.78 [16.83; 24.90]	63 [58; 69]	5957 [5573; 6236]
<i>Cyclotella meneghiniana</i>	CE ₅₀	23 [21; 25]	812 [726;908]	46 [43; 48]	9.62 [9.39; 9.97]	3476 [2582; 4042]
	CE ₅	1.59 [0.90; 2.05]	58 [45;67]	3.16 [2.57; 3.64]	5.38 [5.21; 5.48]	1282 [1084; 1443]

ANNEXE 2: Protocole pour l'analyse des effets d'herbicides sur des souches de phytoplancton du Léman par bioessais.

Les souches de micro-algues ont été préalablement multipliées pour augmenter leurs densités dans un volume d'environ 100ml de milieu DV dans des erlenmeyers de 150 ml stériles dans la chambre climatisée. La concentration cellulaire idéale pour démarrer le test doit se situer aux alentours de 20 000 individus/ml.

Contamination mono-espèce, mono-herbicide :

72 tubes en verre (50ml) sont nécessaires par souche testée (4 herbicides x 5 concentrations différentes, plus un témoin, en triplicat). Les tubes et leurs bouchons semi-perméables sont stérilisés en étuve puis remplis comme suit :

- 1ml de solution de la souche d'algue,
- 1ml d'un mélange de milieu de culture DV et de solution d'herbicide (gamme ci-dessous).

Pour le témoin (C0) 1ml de milieu de culture pur est ajouté à 1 ml de culture de la souche.

[] (µg/L)	C0	C1	C2	C3	C4	C5
Atrazine	0	8	30	130	510	2000
Diuron	0	2	6	18	54	162
Terbutryn	0	3	9	30	80	240
Isoproturon	0	3	9	30	80	240

[] (µg/L)	C0	C1	C2	C3	C4	C5
Atrazine	0	20	80	320	1300	5100
Diuron	0	10	40	160	640	2500
Terbutryn	0	10	35	150	550	2300
Isoproturon	0	5	30	150	750	3500

Les tubes sont ensuite placés en chambre de culture pendant 4 jours. Une mesure à T0 (fluorescence et microscopie) est effectuée sur la solution de culture. Il faut diviser cette valeur par 2 pour comparer avec les valeurs à T4, afin de prendre en compte la dilution pendant la phase de contamination (figure 1). Après 4 jours de contamination, les cultures contaminées de chaque tube sont réparties en quadruplicat de 0.25ml dans des microplaques noires de 96 puits pour mesurer la fluorescence (fluoroskan) à une excitation de 430nm et une émission de 680nm. Des moyennes sont alors effectuées sur les quadruplicats de chaque tube pour obtenir une valeur de fluorescence par tube.

Contamination mono-espèce, mélange d'herbicides :

Le mode opératoire est identique. Le mélange d'herbicide est préparé selon les gammes du tableau suivant (1X, 100X, 1000X, 10000X et 100000X les concentrations d'herbicides retrouvées dans le Léman):

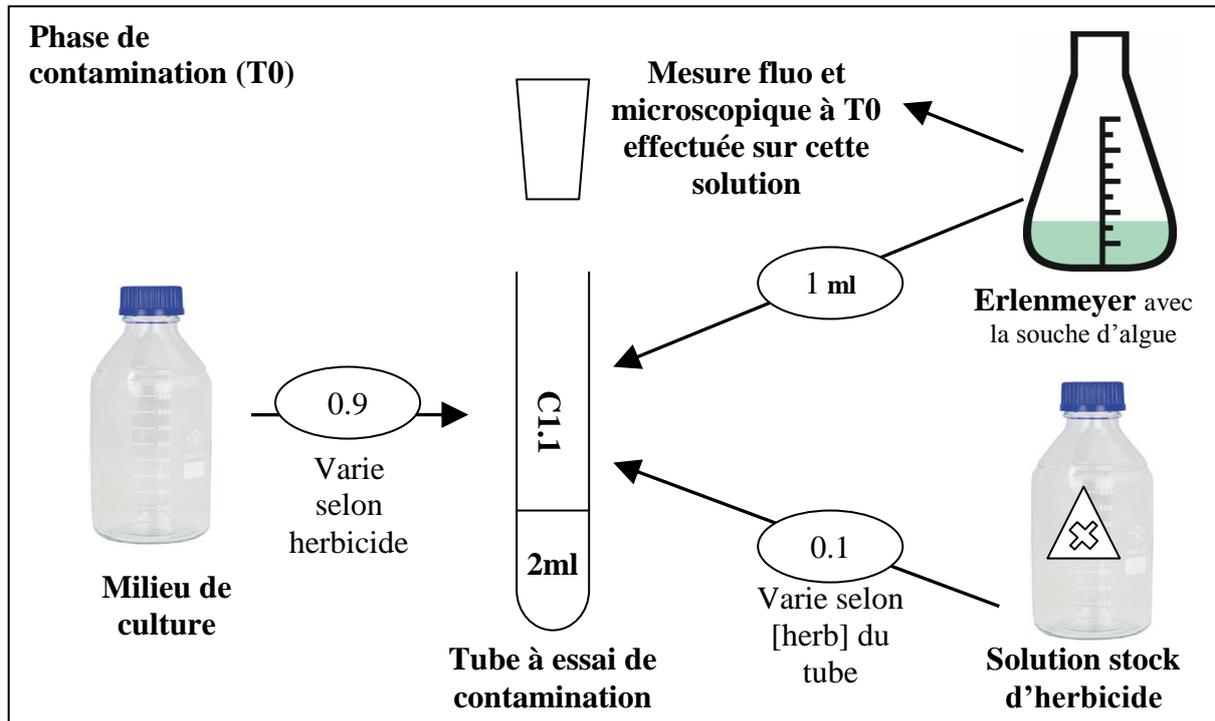
Concentration (µg/L)	C0	C1 (1X)	C2 (100X)	C3 (1000X)	C4 (10000X)	C5 (100000X)
Atrazine	0	0.0256	2.56	25.6	256	2560
Terbutryn	0	0.0024	0.24	24	24	240
Diuron	0	0.0096	0.96	9.6	96	960
Isoproturon	0	0.0024	0.24	2.4	24	240
Total	0	0.04	4	40	4000	4000

Les proportions des quatre herbicides restent constantes dans le mélange (proportions observées dans le Léman - campagne CIPEL 2005). Chaque souche algale est testée en contamination par cette gamme selon le protocole ci-dessus.

Contamination mélange d'espèces, mélange d'herbicides :

Le mélange d'herbicides reste identique au précédent.

Un mélange de souches algales est réalisé de manière à obtenir des densités cellulaires similaires pour toutes les espèces à T4. Pour cela on prend en compte les différences de vitesse de croissance des différentes souches d'algues (obtenues préalablement au cours des tests de croissance) et on effectue des tests préliminaires avec différents ratios de densité. Les souches à croissance rapide sont introduites en quantités plus faibles à T0. Des mesures de l'évolution des densités des espèces au sein du mélange sont effectuées par comptage au microscope sur le témoin pendant 4 jours (durée de l'expérience).



ANNEXE 3: Modèle individus-centré **PhytoHerb**

PhytoHerb est un modèle individus-centré qui permet de modéliser la croissance d'une communauté phytoplanctonique en présence d'un cocktail d'herbicides. Ce modèle a été conçu pour les herbicides inhibiteurs du photosystème II. Il peut être utilisé comme laboratoire virtuel pour tester des scénarios de contaminations en herbicides et évaluer leur impact sur des communautés phytoplanctoniques composées de plusieurs espèces. Il existe deux versions du modèle :

- Une version « laboratoire virtuel » (**PhytoHerbL**), utilisée pour tester et valider le modèle en terme de taux de croissances spécifiques et effets des herbicides (l'environnement étant homogène). Cette version présente deux sous-versions, l'une prenant en considération l'hormesis dans le calcul de la sensibilité aux herbicides et l'autre pas. Ces deux sous-versions ont été réalisées dans l'objectif d'estimer l'importance du rôle de l'hormesis dans la structuration de communautés phytopanctoniques soumises à de très faibles concentrations en pesticides.
- Une version « écosystème » (**PhytoHerbE**), utilisée pour tester des scénarios de contamination dans des conditions environnementales caractérisées par une hétérogénéité spatiale (modèle 1D avec gradient de lumière).

PhytoHerb s'inspire de la composante phytoplanctonique du model LERM (Lagrangian Ensemble Recruitment Model) proposé par Sinerchia et al. (2008). Dans ce modèle, chaque agent est une cellule phytoplanctonique et se comporte selon un ensemble de règles nommées « équations phénotypiques » (Sinerchia et al., 2008). Ces équations phénotypiques décrivent les fonctions biologiques des individus. Les principales règles qui gouvernent les agents sont la photosynthèse et la prise de nutriments, qui résultent en l'accumulation de carbone dans la cellule phytoplanctonique et la respiration, qui consomme le carbone. Pour chaque agent, le pool de carbone et de nutriment limitant (le phosphore) sont modélisés. La prise de nutriment et l'efficacité photosynthétique sont des traits de vies qui diffèrent selon les espèces et définissent des stratégies de vie spécifiques. Ces processus biologiques sont donc paramétrisés pour chaque espèce.

Les équations du LERM ont été utilisées pour la plupart des règles biologiques, mais certaines règles ont été simplifiées (par exemple, la photoadaptation dans le processus de photosynthèse a été supprimée). Enfin, l'effet herbicide a été ajouté dans le processus de photosynthèse. La composition de la communauté (en termes d'abondance spécifique) est donc une propriété émergente du modèle.

Le modèle PhytoHerb

Implémenté sous NetLogo 5.0 (Wilensky, 1999).

Les espèces phytoplanctoniques actuellement paramétrées dans le modèle, sont 4 espèces caractéristiques du Léman (en termes d'abondance) et appartenant à des groupes pigmentaires différents : *Chlorella vulgaris* (chlorophyceae), *Pseudanabaena limnetica* (cyanobacteria), *Cryptomonas sp.* (Cryptophyceae), *Mougeotia gracillima* (Zygothryx).

Les sensibilités de ces espèces aux herbicides ont été mesurées en laboratoire. Des courbes doses-réponses ont été obtenues pour 4 herbicides: atrazine, terbutryne, diuron et isoproturon, tous inhibiteurs du photosystème II.

Les principales règles qui gouvernent les agents sont : la photosynthèse, la sensibilité des espèces aux herbicides, la respiration, la division des cellules, la prise en nutriments, la mortalité

Dans **PhytoHerbH**, les règles de mobilités de LERM ont été maintenues et consistent en un taux de sédimentation constant et obtenu, pour chaque espèce, d'une relation allométrique par rapport au volume de la cellule.

Dans un milieu saturé en nutriments, la croissance spécifique est principalement déterminée par l'équation de photosynthèse qui dépend essentiellement de l'intensité lumineuse et la température. L'effet de cette dernière est incluse dans le modèle selon Sinerchia et al., 2008, il s'agit de multiplier les règles biologiques par un facteur de sensibilité thermique. L'effet de la température sur les processus biologiques est défini par la relation d'Arrhenius (Annexe 3a)

a) Sensibilité aux herbicides et photosynthèse

La sensibilité des espèces à un seul herbicide a été mesurée dans des bioessais monospécifiques qui ont permis d'obtenir des courbes doses-réponses. Beaucoup de ces courbes présentaient un effet d'hormesis. C'est à dire une stimulation de la croissance pour des faibles doses en herbicide. Les modèles log-logistic ou Cedergreen-Ritz-Streibig (Cedergreen et al., 2005) qui rend compte de l'hormesis ont donc été ajustés aux données.

L'accumulation de carbone est contrôlé par l'intensité lumineuse et des paramètres spécifiques, mais également par la concentration en nutriments présents dans la cellule, la température et la concentration en herbicide. Le taux photosynthétique est donné par l'équation présentée en Annexe. Son calcul fait intervenir des paramètres qui traduisent des traits de vie spécifiques aux différentes espèces et correspondant à des stratégies différentes. L'herbicide influence directement le taux photosynthétique maximal selon une équation (Annexe 3b) qui transcrit la sensibilité de l'espèce à l'herbicide ou le cocktail d'herbicide. La sensibilité d'une espèce à un mélange en herbicide a été obtenue en appliquant le modèle de concentration addition (CA) qui est généralement utilisé pour prédire les effets de substances en mélange (substances ayant le même mode d'action).

b) Respiration

Les règles associées à la respiration ont été simplifiées par rapport au modèle LERM (ex : le coût de la biosynthèse a été omise), ceci afin de réduire le nombre de paramètres difficiles à trouver dans la littérature.

Le taux de respiration spécifique est défini comme la perte de carbone dues à des activités métaboliques. On ne considère qu'un taux métabolique de base (Annexe 3c), considéré comme constant et propre à chaque espèce.

c) Division de cellules

Dans **PhytoHerb**, les agents représentent des cellules phytoplanctoniques. Les cellules se divisent quand leur stock de carbone pour la réplication atteint une valeur seuil. Comme dans LERM, la valeur des seuils a été obtenue selon la relation allométrique proposée par Strathmann (1967). Elle est basée sur le volume de la cellule. Les cellules mères et filles sont similaires et héritent de la moitié du pool de carbone et de nutriments de la cellule mère.

d) Prise de nutriments

En milieu lacustre, le nutriment limitant pour la photosynthèse, et donc la production de carbone, est le phosphore. Le taux de prise de nutriment dépend des concentrations environnementales et

de paramètres spécifiques (Annexe 3d). Le taux de prise en nutriment est défini par l'équation de Michaelis-Menten et dépend du quota intracellulaire et de la température ambiante.

e) Mortalité

Les agents meurent lorsque leur pool de carbone diminue en dessous d'une valeur seuil. Comme dans LERM, les résultats de Berges et Falkowski (1998), Veldhuis et al (2001) ont été utilisés. La limite en C qui induit la mortalité dépend du seuil de C pour la réplication (équation en annexe 3e).

Les paramètres du modèle

Les paramètres qui contrôlent la prise en nutriment et la photosynthèse sont des traits de vie spécifiques. Mais leurs valeurs ne sont pas référencées dans la littérature, par conséquent, les valeurs de la plupart des paramètres introduits dans le modèle ont été obtenus par des relations allométriques par rapport au volume de la cellule. Nous avons utilisé les allométries du phytoplancton d'eau douce autant que possible. Quand cette information n'était pas disponible, nous avons utilisé les allométries d'espèces marines. Le travail d'Edwards et al. (2012) liste la plupart des relations allométriques pour la prise en nutriments chez le phytoplancton d'eau douce. La constante de demi-saturation pour la prise du phosphore K_s est significativement corrélée avec le volume de la cellule. La liste des paramètres est présentée en annexe 3f.

Bibliographie :

Cedergreen N., Ritz C., Streibig J.C. (2005). Improved empirical models describing hormesis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 3166-3172.

Greco W.R., Bravo G., Parsons J.C. (1995). The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacological Reviews* 47, 332-85.

Sinerchia M., Vallerga S., Woods J. (2008). The Lagrangian Ensemble Recruitment Model LERM. *Virtual Plankton Ecology - Technical report number 8*.

Wilensky, U. (1999). NetLogo. <http://ccl.northwestern.edu/netlogo/>. Center for Connected Learning and Computer-Based Modeling, Northwestern University, Evanston, IL.

Woods J.D. (2005) The Lagrangian Ensemble metamodel for simulating plankton ecosystems. *Progress in Oceanography* 67, 84-159.

Annexe 3a : Effet de la température

The cellular processes of individual phytoplankton cells are sensitive to ambient water temperature. Temperature influence on phytoplankton cellular processes is included in the model in the same way as in Sinerchia et al (2008), by multiplying the biological rules by a temperature sensitivity factor ($T_{function}$). The effect of temperature on the biological processes is defined by the Arrhenius relationship:

$$T_{function} = \exp(A_E(\frac{1}{T_K} - \frac{1}{T_{ref}}))$$

where $A_E = -10^4$ °K is the Arrhenius constant, $T_{ref} = 293$ °K is the reference temperature (corresponds to 20°C), T_K is the ambient temperature in °K and the conversion from T (°C) to T_K (°K), is defined by:

$$T_K = T + 273.$$

The Arrhenius function increases with temperature, so this function does not account for possible inhibitory effects of temperature. However this should not be a problem for the temperatures found in lake Geneva.

Annexe 3b : Taux de photosynthèse

The photosynthetic rate is given by:

$$P_{\text{phot}} = P_{\text{max}} \left(1 - \exp \frac{-3600 \alpha_{\text{chl}} \theta_C E_0}{P_{\text{max}}} \right)$$

where:

- P_{phot} is the carbon specific rate of photosynthesis at ambient temperature [mmolC mmolC⁻¹ h⁻¹],
- P_{max} is the maximum carbon specific photosynthesis rate at ambient temperature [mmolC mmolC⁻¹ h⁻¹],
- α_{chl} is the initial slope of the photosynthesis-irradiance (PI) curve [mmolC m² (μE mgChl-a)⁻¹], (with 1 μE = 1 μmol photons m⁻² s⁻¹),
- θ_C is the chlorophyl a to carbon ratio within the cell [mgChl-a mmolC⁻¹]
- E_0 is the incident scalar PAR (400nm-700nm) irradiance [μE].

The maximum photosynthetic rate is defined by:

$$P_{\text{max}} = \begin{cases} P_{\text{ref}} T_{\text{function}} \frac{Q_N - Q_{N \text{ min}}}{Q_{N \text{ max}} - Q_{N \text{ min}}} (1 - I_H) & \text{if } Q_N > Q_{N \text{ min}}, \\ 0 & \text{otherwise.} \end{cases}$$

where:

- T_{function} is the effect of temperature on metabolic rates [dimensionless],
- P_{ref} is the maximum C specific photosynthetic rate at the reference temperature T_{ref} [mmolC mmolC⁻¹ h⁻¹],
- Q_N is the nutrient to carbon ratio within the cell [mmolP mmolC⁻¹] (in PhytoHerb the limiting nutrient is phosphorus P),
- $Q_{N \text{ min}}$ is the minimum cellular nutrient to carbon ratio [mmolP mmolC⁻¹],
- $Q_{N \text{ max}}$ is the maximum cellular nutrient to carbon ratio [mmolP mmolC⁻¹],
- I_H is an inhibition factor depending on the ambient herbicides concentrations [dimensionless].

P_{ref} , $Q_{N \text{ max}}$ and $Q_{N \text{ min}}$ are species life traits which can differ between species and correspond to different strategies. I_H also differs among species which exhibit different sensitivities to herbicides and their mixtures (obtained from the single-species single-herbicide dose-response curves).

The sensitivity of a species to a mixture of herbicides was obtained by the concentration addition (CA) model, widely used to predict the effect of mixtures of substances with the same mode of action (Greco et al, 1995). I_H is given by the equation:

$$I_H = \frac{1}{\sum_{i=1}^4 \frac{p_i}{I_{H_i}}}$$

where I_{H_i} is the inhibition induced by herbicide i (obtained from the corresponding single-herbicide dose-response curve) and p_i is the proportion of herbicide i in the mixture (and $\sum_{i=1}^4 p_i = 1$).

The inhibition induced by herbicide i for a given herbicide concentration $[H_i]$ is obtained by:

$$I_{H_i}([H_i]) = 1 - \frac{E_{H_i}([H_i])}{E_{H_i}^{\text{max}}}$$

where $E_{H_i}([H_i])$ is the effect of herbicide i at the concentration $[H_i]$ and $E_{H_i}^{\text{max}}$ is the overall maximum of the dose-response function. In the case of hormesis this will correspond to the maximum hormesis effect, otherwise it corresponds to the effect at concentration 0 ($E_{H_i}(0)$), i.e. the value for the control in the bioassay.

The generic function used to adjust the dose-response data from the laboratory experiments is the Cedergreen-Ritz-Streibig function which accounts for hormesis and with lower limit 0. The log-logistic function is a special case of this model where $f_i = 0$ and $a_i = 0$. For a log-logistic model, the upper limit $E_{H_i}^{\max}$ corresponds to d_i which is also the value for the control in the dose-response trial. The effect of a herbicide on species growth is given by the equation:

$$E_{H_i}([H_i]) = \frac{d_i + f_i \exp\left(-\frac{1}{[H_i]^{a_i}}\right)}{1 + \exp(b_i(\ln[H_i] - \ln c_i))}$$

The parameters a_i, b_i, d_i, c_i, f_i are estimated for each herbicide i and for each species from the dose-response relationships obtained from the bioassays. The dose-response curves were fitted using the R-package `drm`.

Annexe 3c : Respiration

The carbon specific respiration rate R is defined as the carbon loss due to metabolic activities.

$$R = P_{\text{ref}}/10.$$

P_{ref} is the maximum C specific photosynthetic rate at the reference temperature T_{ref} [$\text{mmolC mmolC}^{-1} \text{ h}^{-1}$],

P_{ref} is a phytoplankton trait

Annexe 3d : Prise de nutriment

The carbon specific nutrient-uptake rate is defined by the Michaelis-Menten equation:

$$V_N = V_{\text{max}} \frac{[N]}{K_s + [N]}$$

where:

- V_N is the carbon specific nutrient (phosphorus) uptake rate at ambient temperature [$\text{mmolP mmolC}^{-1} \text{ h}^{-1}$],
- V_{max} is the maximum carbon specific nutrient (phosphorus) uptake rate at ambient temperature [$\text{mmolP mmolC}^{-1} \text{ h}^{-1}$],
- K_s is the half-saturation constant for phosphorus uptake [mmolP m^3],
- $[N]$ is the ambient nutrient (phosphorus) concentration [mmolP].

The maximum carbon specific nutrient uptake rate depends on the cellular nutrient quota and on the ambient temperature:

$$V_{\text{max}} = \begin{cases} 0 & \text{if } Q_N > Q_N^{\text{max}}, \\ V_{\text{ref}} T_{\text{function}} & \text{if } Q_N < Q_N^{\text{min}}, \\ V_{\text{ref}} T_{\text{function}} \left(\frac{Q_N^{\text{max}} - Q_N}{Q_N^{\text{max}} - Q_N^{\text{min}}} \right)^{0.05} & \text{otherwise.} \end{cases}$$

where V_{ref} is the maximum carbon specific nutrient-uptake rate at the reference temperature T_{ref} .

Annexe 3e : Mortalité

Agents in PhytoHerb die when their carbon pool decreases below a starvation threshold C_{starve} .

$$C_{\text{starve}} = C_{\text{rep}} \exp(-0.408x) \quad \text{where } x = 18 \text{ days.}$$

With C_{rep} : carbon threshold for replication being determined from allometric relationship proposed by Strathmann (1967).

Annexe 3f : Paramètres

Parameters	Description	Unit	Reference
V	cell volume	μm^3	INRA database
C_{rep}	carbon threshold for cell division	mmolC	Strathmann (1967)
C_{starve}	carbon threshold for cell starvation	mmolC	Berges and Falkowski (1998)
K_s	half-saturation constant for P uptake	mmolP m ³	Edwards et al (2012)
V_{ref}	maximum C specific P uptake rate at T_{ref}	mmolP mmolC ⁻¹ h ⁻¹	Edwards et al (2012)
$Q_{N \text{ min}}$	minimum phosphorus to carbon cell ratio	mmolP mmolC ⁻¹	Edwards et al (2012)
$Q_{N \text{ max}}$	maximum P to C cell ratio	mmolP mmolC ⁻¹	Nogueira et al (2006)
P_{ref}	max C specific photosynthetic rate at T_{ref}	mmolC mmolC ⁻¹ h ⁻¹	
R	C specific respiration rate	mmolC mmolC ⁻¹ h ⁻¹	

Berges J.A., Falkowski P.G. (1998). Physiological stress and cell death in marine phytoplankton: induction of proteases in response to nitrogen or light limitation. *Limnology and Oceanography*, 43, 129-135.

Edwards K.F., Thomas M.K., Klausmeier C.A., Litchman E. (2012). Allometric scaling and taxonomic variation in nutrient utilization traits and maximum growth rate of phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 57, 554-566.

Hee-Mock Oh, G-Yull Rhee (1991). A comparative study of microalgae isolated from flooded rice paddies: light-limited growth, C fixation, growth efficiency and relative N and P requirement. *Journal of Applied Phycology* 3, 211-220.

Litchman E., Klausmeier C.A., Yoshiyama K. (2009). Contrasting size evolution in marine and freshwater diatoms. *PNAS* 106, 2665-2670.

Nogueira E., Woods J.D., Harris C., Field A.J., Talbot S. (2006). Phytoplankton co-existence: Results from an individual-based simulation model. *Ecological Modelling* 198, 1-22.

Passarge J., Hol S., Escher M., Huisman J. (2006). Competition for nutrients and light: stable coexistence, alternative stable states, or competitive exclusion? *Ecological Monographs* 76, 52-72.

Strathmann R.R. (1967). Estimating the organic carbon content of phytoplankton from cell volume or plasma volume. *Limnology and Oceanography*, 12, 411-418.

Veldhuis M.J.W., Kraay G.W., Timmermans K.R. (2001). Cell death in phytoplankton: correlation between changes in membrane permeability, photosynthetic activity, pigmentation and growth. *European Journal of Phycology*, 36, 167-177.