ParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY

AgroParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY FOR LIFE, FOOD AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

Ecole Doctorale ABIES
Agriculture
Agriculture
Alimentation
Food
Biologie
Biology
Environnement
Environment
Santé
Health

Doctorat ParisTech

T H È S E

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement

(AgroParisTech)

Spécialité : Sciences de l'Environnement

présentée et soutenue publiquement par

Goulwen de KERMOYSAN

le 13 septembre 2013

Caractérisation de la dynamique de population de l'épinoche à trois épines, *Gasterosteus aculeatus*, dans un mésocosme lotique:

Application à l'évaluation des effets du bisphénol A dans un contexte écosystémique.

Direction de la thèse : **M. Alexandre PERY et M. Rémy BEAUDOUIN**

Composition du jury

M. Alain GEFFARD,	Professeur, Université Reims Champagne – Ardennes	Président
M. Thierry CAQUET,	Directeur de Recherche, INRA, Rennes	Rapporteur
M. Alain DEVAUX,	Ingénieur de Recherche, Université de Lyon, Vaulx-en-Velin	Rapporteur
M. Alexandre PERY	Responsable d'Unité, INERIS, Verneuil-en-Halatte	Directeur de la thèse
M. Rémy BEAUDOUIN	Ingénieur de Recherche, INERIS, Verneuil-en-Halatte	Co-directeur de la thèse

AgroParisTech
Unité « Modèles pour l'écotoxicologie et la toxicologie » (METO)
INERIS, Parc technologique ALATA, 60550 Verneuil-en-Halatte

REMERCIEMENTS

Le projet d'une thèse est à l'image d'un bateau. Certes il faut un skipper pour tenir le cap et mener à bien l'embarcation vers la destination souhaitée, mais seul, il ne va pas loin....

Il lui faut un propriétaire, garant de son fonctionnement. Dans ce projet, il y en avait deux : Alexandre PÉRY *et Rémy* BEAUDOUIN*. Je souhaite vous remercier à la hauteur de la qualité de votre encadrement. Vos compétences professionnelles ont été pour moi une mine de savoir et d'apprentissage tant dans le domaine professionnel que personnel.*
Ce bateau ne peut être admiré et jugé que par des connaisseurs, cap-horniers et passionnés. Je tiens à exprimer mes remerciements à monsieur GEFFARD*, Président du jury et messieurs* DEVAUX *et* CAQUET *qui ont accepté d'être rapporteurs de ma thèse.*
Au fil des mers, les architectes ont amélioré les pièces et les rouages de sorte que le navire ne sombre pas, mais se renforce et s'embellisse. Ces architectes formaient à mes yeux, un trio d'expérience. Je tiens particulièrement à vous remercier, Gilles MONOD*, Jean-Marc* PORCHER *et Nicolas* DESASSIS *pour vos conseils avisés et éclairés, que vous m'avez adressés lors des comités de pilotage. Ces comités sont venus m'aider plus que je ne l'aurais pensé.*

*Ce bateau a également un port d'attache. Ce fut l'*INERIS *et en particulier, le pôle VIVA. Merci à vous monsieur* THYBAUD*, de m'avoir accueilli au sein de votre pôle et de vous être intéressé à mon travail. Ce fut gratifiant de ne pas être un inconnu pour vous.*
Un port, nécessite obligatoirement une capitainerie, centre névralgique de l'organisation et de l'accompagnement pour aider le marin pendant sa navigation. Je souhaite adresser

mes remerciements à Vanessa et Caroline. Merci pour votre investissement et toutes vos petites attentions pour que nous puissions travailler dans les meilleures conditions possibles, parfois avec du matériel à renouveler, souvent avec des commandes compliquées à gérer (surtout les posters), toujours avec le sourire.
Je souhaite également remercier l'école doctorale ABIES, et ses équipes dirigeantes et professorales. J'ai toujours apprécié votre professionnalisme pour nous former et nous accompagner tout au long de notre projet. Je souhaitais remercier en particulier, mesdames Launay, Lefort, Vassileva *et* Fiers *et monsieur* Kao.

Sur le pont d'un bateau, il y a de multiples compétences et connaissances à avoir. Elles nécessitent de savoir se répartir les tâches pour tirer le maximum de la monture. Sandrine et Patrick, je tenais à vous remercier pour le travail accompli et les heures passées ensemble aux "mésos". Je ne connaissais pas le monde des végétaux et des "bébêtes" mais Sandrine, par ta passion et ta quête d'identification, j'ai l'impression d'en connaître un rayon ! En parlant de "bébêtes", je ne peux bien-sûr penser qu'à toi Matthieu, maître ès zooplancton à mes yeux.
Je tenais à te dire combien j'ai apprécié nos longues heures de travail tout les deux à faire "cracher" des infos à ces pauvres épinoches qui n'avaient rien demandé ! Pêchées, disséquées, mesurées, taguées, sexées, euthanasiées, anesthésiées, marquées, photographiées, comptées... toutes les techniques étaient bonnes pour la Science. A tes cotés, j'ai beaucoup appris humainement. Je te souhaite un bon vent et j'espère qu'un jour nos mers se recroiseront...

Lors des coups de vent l'équipage doit être renforcé pour répondre à Eole. Il faut savoir adapter la voilure aux éléments rencontrés. Je tenais à remercier Zhira, Edlyn, Pierre, Victor et Nicolas que j'ai eu la chance d'encadrer et avec qui j'ai travaillé pendant cette thèse. Vos noms ne sont peut être pas tous mentionnés dans ce manuscrit, mais beaucoup de résultats ont été acquis avec votre aide, votre patience et votre bonne humeur et sans votre présence, nous n'aurions jamais pu tout faire seul.

Une embarcation n'est jamais seule sur l'eau. Au gré de la navigation, nous croisons d'autres bateaux. Je ne veux pas oublier tous les membres des unités ECOT *et* METO *avec lesquels j'ai eu la chance d'échanger, de discuter, de travailler et ... de partager nos idées autour d'un café le matin. Vous rencontrer a été une expérience très enrichissante.*
*Céline, je te remercie pour ta gentillesse lors des corrections et des conseils que tu me donnais. J'ai été touché par ton constante implication pour m'aider. Florence, merci pour ton accueil, notamment au début de ma thèse. Cléo, nous sommes arrivés le même jour à l'*INERIS*. Merci de m'avoir dépanné en première année. Enrico, j'ai apprécié pouvoir échanger sur beaucoup de sujets avec toi. J'ai eu la chance d'apprendre beaucoup de choses grâce à toi. Que se soit au niveau scientifique ou personnel, ta grande culture était un puits de savoir. Frédéric, merci de ta bonne humeur que tu nous faisais partager lors des pauses café. Plus généralement, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont eu la gentillesse de venir aider lors des "vidanges", en particulier Anne, Manue et Edith, ou nous apporter leur soutien et leurs encouragements lors du pique-nique. Cyril et Benjamin, merci de vous être occupés de l'élevage et des installations au sous-sol lorsque je ne pouvais pas le faire.*

Parfois, nous croisons des bateaux identiques au nôtre. Il y a alors une amicale salutation et une franche sympathie qui nous lie (et un regard dans la grand-voile pour voir qui a le plus petit numéro, signe de respect car signe d'ancienneté). Ce fut le cas avec les autres doctorants et post-doctorants de l'unité.
Sophie, garde ta motivation pour tes nombreux projets de reprise d'asso, de participation à pleins de clubs de sport. Ton peps t'aidera au cours de ces deux années et demie qu'il te reste. Dévores ton projet autant que tes sucreries pour mener à bien ta thèse et tu la réussiras brillamment.
Antonio, bravo pour tes progrès fulgurants en français. Je suis vraiment ravi d'avoir pu t'apprendre des expressions "bien de chez nous" et j'ai beaucoup apprécié ta volonté de les réutiliser, ta gentillesse et ton humour.
Marie-Emilie, arrivée il y a quelques temps maintenant, je suis heureux de t'avoir rencontré. Bon courage pour la fin de ta thèse. J'ai apprécié ta simplicité et ta motivation dans ton projet pour mener de front tes expériences, tes analyses et ton modèle sans jamais

paraître débordée. Ton organisation et ton assurance sont des qualités que nous devrions tous apprendre.
Benoit, collègue de bureau, jeune thésard (bah oui, tu as commencé après moi), jeune marié... (quel copieur !) bon courage pour la fin de ta thèse. Merci pour ton aide lors de mon apprentissage de LaTeX. J'ai apprécié que notre fin de thèse ne soit pas une rivalité, mais un chemin parallèle pour produire un manuscrit de qualité.

Lorsqu'un skipper part sur son bateau, il rempli les soutes de ce dont il a besoin tous les jours pour sa survie : de la nourriture, du réconfort et tous les instruments vitaux pour une navigation en toute sécurité.
Pour ma part, dans mes soutes, j'avais toute ma belle famille, avec leur soutien et leurs encouragements. Je vous remercie de m'avoir écouté patiemment raconter la vie trépidante de mes épinoches.
J'avais également mes grands-parents (et leurs poissons rouges "de la maison blanche"), ma fratrie et mes parents. Merci de vous être toujours intéressés à ce que je faisais et de m'avoir appris à mener ma barque. J'espère ne pas vous avoir déçu et avoir su prendre des ris dans la GV ou envoyer le spi au bon moment.

Enfin, pour m'aider à hisser toutes les voiles, affronter toutes les difficultés, savourer tous les surfs en grand largue et m'aider à chaque instant en étant à l'endroit le plus utile pour ne pas chavirer et avancer plus vite, j'avais ma famille à qui je souhaite offrir ce travail. Nous avons fais avancer ce bateau tous les trois et je tenais à vous en remercier. Certaines fautes de frappes sont peut-être de toi Gaspard, lorsque le matin, pour laisser ta Maman dormir et pour aider ton Papa fatigué tu souhaitais apporter ta contribution rédactionnelle... Merci pour tes sourires et tes éclats de rire quand je rentrais le soir... Ils sont une véritable raison d'avancer.
Ma Béné, merci à toi de ton aide depuis le début de cette thèse (et même avant !), de ton soutien de chaque instant, de tes encouragements quotidiens, de ta patience continue, de ta compréhension lorsque je partais tôt le matin, ou que nous n'avions ni week-end, ni vacances, merci de tous tes efforts et sacrifices que tu as fait pour moi gratuitement et sans attendre de retour. Ton Amour fut ma potion magique pour avancer et surtout me dépasser.

Enfin, tout bateau, à besoin d'un océan pour s'exprimer pleinement. Cet océan fut, pour moi, les quelques 31641 épinoches (au minimum) qui sacrifièrent volontairement (ou pas !) leur vie. Sans elles, rien de cette thèse n'aurait pu être présenté... Mon bateau n'aurait pas pu naviguer...

SOMMAIRE

Remerciements **i**

Introduction générale **1**

1 Revue bibliographique **6**

1.1 Les mésocosmes en écotoxicologie aquatique 7

1.1.1 Introduction 7

1.1.2 Les écosystèmes expérimentaux lotiques 8

1.1.3 Les différentes espèces de poissons étudiées 11

1.1.4 Analyse des données de populations en mésocosmes 12

1.1.5 Conclusions 15

1.2 L'épinoche à trois épines 16

1.2.1 Taxonomie 16

1.2.2 Répartition géographique 18

1.2.3 Habitat 20

1.2.4 Alimentation 20

1.2.5 Cycle de vie 20

1.2.6 Croissance 22

1.2.7 Reproduction 24
1.2.8 Conclusions 28
1.3 Le bisphénol A (BPA) 29
1.3.1 Utilisation 30
1.3.2 Caractéristiques chimiques 30
1.3.3 Dégradation et métabolites 31
1.3.4 Concentrations dans l'environnement 31
1.3.5 Mode d'action et écotoxicité sur les poissons 32
1.3.6 Conclusions 33

2 Méthodologies générales **35**
2.1 Introduction 36
2.2 Généralités 37
2.2.1 Mesure de la taille standard 37
2.2.2 Manipulation, anesthésie, euthanasie et conservation des poissons . 39
2.2.3 Nourrissage des poissons en conditions de laboratoire 43
2.2.4 Sexage 45
2.2.5 Récupération des ovocytes secondaires 51
2.2.6 Obtention de juvéniles et synchronisation 54
2.2.7 Marquage des poissons 55
2.3 Expériences en mésocosmes 57
2.3.1 Mise en place des systèmes 58
2.3.2 Variables suivies 68
2.3.3 Variables finales mesurées 74
2.3.4 Chronologie et moyens humains 78
2.4 Calculs et analyses statistiques 81
2.4.1 Calculs des degrés jours 81
2.4.2 Calcul de la nourriture disponible 82
2.4.3 Les variables biologiques de la population en fin d'expérience en mésocosme 90
2.4.4 Ajustement de modèles non-linéaires 92

2.4.5 Comparaison des modèles 92
2.4.6 Classification ascendante hiérarchique 93
2.4.7 Tests statistiques réalisés 94

3 Estimation des valeurs des traits d'histoire de vie de l'épinoche à trois épines à Verneuil - en - Halatte 95

3.1 Introduction 96
3.2 Matériel et Méthode 98
3.2.1 Niveau de satiété de l'épinoche à Verneuil - en - Halatte 98
3.2.2 La croissance 99
3.2.3 La reproduction 105
3.3 Résultats 111
3.3.1 Niveau de satiété de l'épinoche 111
3.3.2 Croissance de l'épinoche 113
3.3.3 Reproduction de l'épinoche 121
3.4 Bilan et discussion 131
3.4.1 La croissance 131
3.4.2 La reproduction 135
3.5 Conclusions 143

4 Mise au point des expériences en mésocosme 144

4.1 Introduction 145
4.2 Les fondateurs 146
4.2.1 Sexage des fondateurs 146
4.2.2 Stades de maturité des fondateurs 146
4.2.3 Effectifs introduits 147
4.2.4 Tailles standard des fondateurs 147
4.2.5 Identification des fondateurs 148
4.2.6 Conditionnement des fondateurs avant leur introduction 148
4.3 Le suivi durant l'expérience 150
4.3.1 La physico-chimie 150
4.3.2 Le suivi de la structure de l'habitat 151

4.3.3 Le suivi des proies et des prédateurs de l'épinoche 151
4.3.4 L'estimation de l'effectif des populations d'épinoches 152
4.3.5 Suivi de la distribution de taille de la population 161
4.4 Récupération finale des populations et acquisition des données 162
4.4.1 La récupération des populations dans les canaux 162
4.4.2 L'acquisition des données 165
4.5 Comparaison entre les années 167

5 Description de la dynamique de population d'épinoche en mésocosme en conditions témoins 168

5.1 Introduction 169
5.2 Matériel et Méthode 170
5.2.1 Protocoles 170
5.2.2 L'habitat 170
5.2.3 Les fondateurs 170
5.2.4 Suivi de la population 171
5.2.5 Fin d'expérience 171
5.3 Résultats 173
5.3.1 Suivi de l'habitat 173
5.3.2 Suivi de la nourriture 175
5.3.3 Suivi de la dynamique de population de l'épinoche 177
5.3.4 Effets sur les variables au temps final 184
5.4 Discussion 191
5.4.1 Dynamique de population 191
5.4.2 Variabilité 197
5.5 Conclusions 205

6 Étude des effets du bisphénol A sur une population d'épinoches. 206

6.1 Introduction 207
6.2 Matériel et Méthode 208
6.2.1 Contamination par le BPA 208
6.2.2 L'habitat : Aménagement et stabulation 210

6.2.3 Les fondateurs . . . 210
6.2.4 Suivi de la population . . . 211
6.2.5 Fin d'expérience . . . 211
6.2.6 Acquisition et analyse des données . . . 211
6.3 Résultats . . . 213
6.3.1 Suivi de la contamination . . . 213
6.3.2 Suivi de l'habitat . . . 213
6.3.3 Suivi de la nourriture . . . 218
6.3.4 Effets sur la dynamique de population d'épinoches . . . 218
6.3.5 Effets sur les variables au temps final . . . 226
6.4 Discussion . . . 236
6.4.1 La contamination . . . 236
6.4.2 Les conditions physico-chimiques . . . 237
6.4.3 La dynamique de population . . . 237
6.4.4 Effets sur les variables au temps final . . . 238
6.4.5 Comparaison avec les témoins des expériences précédentes . . . 241
6.5 Conclusions . . . 242

7 Discussion générale **243**
7.1 Introduction . . . 244
7.2 Les voies d'amélioration du protocole . . . 245
7.2.1 Impact de l'échantillonnage sur la dynamique de la population de l'épinoche . . . 245
7.2.2 La standardisation des mesures des poissons . . . 245
7.3 L'amélioration de l'analyse des données des expériences en mésocosmes . . . 247
7.4 Les expériences et développements futurs . . . 250

Conclusions générales **251**

Bibliographie **253**

Annexes **282**
A Expériences préalables . . . 284

A.1 Quantité de nourriture 284
A.2 Conservation dans le formol 285
B Évolution des plantations des végétaux dans les mésocosmes 287
C Mesure de la taille standard *via* Image J 290
D Coefficient allométriques des populations témoins 291
E Article 1 293
F Quantité d'éthanol injecté dans les canaux 300
G Article 2 301
H Valorisation scientifique pendant la thèse 315
H.1 Publications 315
H.2 Communications orales 315
H.3 Communications affichées 316

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le milieu aquatique fait partie des réservoirs ultimes recevant des substances chimiques issues des activités anthropiques. L'évaluation du risque des substances chimiques nouvelles ou déjà mises sur le marché est donc cruciale et fait l'objet de plusieurs réglementations, notamment européennes (Règlement Reach, Directive cadre sur l'eau).

Parmi les espèces aquatiques considérées lors des tests écotoxicologiques permettant d'évaluer l'impact des produits xénobiotiques dans l'environnement, le poisson a une place déterminante. Il fait partie des trois groupes (algues, crustacés, poissons) sur lesquelles se basent beaucoup de calculs de seuils réglementaires (comme les PNECs, *Predicted No Effect Concentrations*). Dans le milieu, il a un rôle structurant du réseau trophique, en particulier lorsque les espèces considérées sont des prédatrices, car elles régulent les populations des autres espèces présentes. Il est considéré *in situ* comme un indicateur de l'état de santé du milieu (Adams et Greeley, 2000; van der Oost *et al.*, 2003; Yeom et Adams, 2007).

De nombreuses études sur le poisson sont réalisées au niveau de l'individu (Andersson *et al.*, 2010; Bell, 2001, 2004; Bernhardt *et al.*, 2006; Brian *et al.*, 2006; Hahlbeck *et al.*, 2004a,b; Jolly *et al.*, 2009; Katsiadaki *et al.*, 2006, 2010; Santos *et al.*, 2013), et le niveau de la population est encore peu étudié pour évaluer le risque écotoxicologique d'un produit (Beaudouin *et al.*, 2012; Köhler et Triebskorn, 2013; Willson *et al.*, 2012). Or, des informations à ce niveau sont attendues et demandées par les gestionnaires (Giesy et Graney, 1989; Lin *et al.*, 2005). Le niveau de la population, en particulier s'il est étudié dans des conditions proches du milieu naturel, permet d'intégrer à l'évaluation du risque écotoxicologique, les interactions complexes entre les individus, les espèces et leur environnement (Giesy et Graney, 1989). De plus, l'étude du niveau de la population permet d'intégrer les effets sur la croissance, la reproduction et la survie (Giesy et Graney, 1989) et d'étudier les effets multi-générations dans un contexte d'écotoxicologie évolutive.

Les études sur le poisson à l'échelle de la population peuvent être réalisées dans des mésocosmes. Parmi toutes les formes de cet outil qui peuvent se présenter, il est possible de trouver des bassins (Beaudouin *et al.*, 2012), des rivières artificielles (Ciric, 2012; Rous-

sel *et al.*, 2007a,b), des enclos (Knuth et Heinis, 1995). Ces outils cherchent à créer des conditions écosystémiques d'exposition *i.e.* étudier une (des) espèce(s) dans un contexte ou elle(s) interagit(ssent) avec la biocénose et le biotope dont elle(s) fait (font) partie. Les mésocosmes permettent d'observer et de caractériser les effets sur l'ensemble des niveaux d'organisation caractérisant un écosystème aquatique (Boyle et Fairchild, 1997; Caquet *et al.*, 2000). Les mésocosmes se situent à l'intermédiaire, dans l'échelle des conditions expériementales, entre la réplicabilité (conditions contrôlées de laboratoire) et la complexité allant de pair avec la représentativité du milieu naturel (Caquet *et al.*, 2000). La forte variabilité qui en résulte est donc une caractéristique intrinsèque de l'outil. Cette variabilité est une problématique qui est fortement présente dans la littérature (Beaudouin *et al.*, 2012; Caquet *et al.*, 2001; Sanderson, 2002; Shaw *et al.*, 1994). Une revue bibliographique montre que la moyenne des coefficients de variation (variables étudiées : animaux et végétaux) est de 51 % dans les mésocosmes (9 études, Sanderson 2002). Cette forte variabilité conduit à une forte probabilité de conclure à l'absence de différences entre des conditions exposées à un perturbateur et des conditions témoins alors qu'il y en a, *i.e.* notion de faux-négatif (Caquet *et al.*, 2001; Sanderson, 2002).

Les études en mésocosmes ont des coûts élevés, financier, matériel et humain, pour la mise en place et de l'utilisation de ces systèmes. Dans le cadre des études réglementaires, les études en mésocosmes sont quasi systématiques, mais s'intéressent généralement aux végétaux ou aux macro-invertébrés. Parmi les études réalisées, peu d'entre elles concernent le poisson. Le faible nombre d'études portant sur les poissons peut s'expliquer par l'impact de la prédation, trop important pour évaluer les effets sur les autres communautés (Shaw et Kennedy, 1996). Il nous apparaît cependant qu'une étude écosystémique réaliste peut intégrer le poisson, car le poisson, lorsqu'il a un rôle de prédateur ultime, comme c'est le cas dans nos rivières artificielles, est susceptible de rendre compte d'impacts aux niveaux trophiques inférieurs dans la mesure où les autres niveaux trophiques survivent. Cependant, comme les études visent la dynamique de la population et non pas l'écosystème, cet impact a un poids moins important (notion de "cosmes dédiés" selon Shaw et Kennedy 1996). En raison de la taille des mésocosmes, peu d'espèces de poisson peuvent être testées. *Gasterosteus aculeatus* fait partie de ces quelques espèces. Cette espèce, plusieurs

fois étudiée dans les mésocosmes (Ciric, 2012; Roussel *et al.*, 2007a,b), est acceptée par l'OCDE (Sebire *et al.*, 2008) et par la Commission Européenne (2001) pour l'étude des perturbateurs endocriniens, pour lesquels certaines études ont déjà été réalisées (Katsiadaki *et al.*, 2006; Sebire *et al.*, 2008). Son écologie est bien connue, ce qui permet aisément de reproduire un environnement propice à son développement.

La problématique de ce travail de thèse se pose de la manière suivante : Comment évaluer les conséquences d'une perturbation sur la dynamique de population de l'épinoche à trois épines en mésocosme ?

Trois questions découlent de cette problématique :

- Quel protocole doit être proposé pour étudier la dynamique de population de l'épinoche en mésocosme ?
- Quelles sont, dans les conditions de ce protocole, la dynamique de population en conditions témoins ?
- A l'aide de comparaison entre les dynamiques de population et les mesures effectuées à la fin d'une expérience, peut-on mettre en évidence les effets d'une perturbation ?

L'hypothèse de travail de cette thèse est que l'incertitude expérimentale masquerait la mise en évidence de perturbation dans les expériences menées en mésocosmes. Ce point est fortement étudié et caractérisé dans la littérature. La prémisse de ce travail est donc de supposer que lorsque l'incertitude expérimentale sera mieux caractériser, et voire même modéliser, alors les différences entre les conditions pourront être observées.

Afin de répondre à cette problématique et aux trois questions méthodologiques, la stratégie proposée est la suivante :

- Tout d'abord, établir un protocole standardisé pour les expériences en mésocosmes afin de réduire la variabilité expérimentale qui peut masquer les effets substantiels ;
- Ensuite, après avoir caractérisé les traits d'histoires de vie de l'épinoche, la dynamique des populations témoins pourra être définie en se basant sur deux expériences de 8 mois en mésocosmes sans contaminant ;
- Enfin, un cas d'étude est proposé en évaluant les effets d'une exposition au bisphénol A sur la dynamique de population de l'épinoche.

Afin de résumer les différentes étapes de la thèse, elles sont schématisées dans la figure 1. La survie ne sera pas abordée expérimentalement dans le cadre de cette thèse.

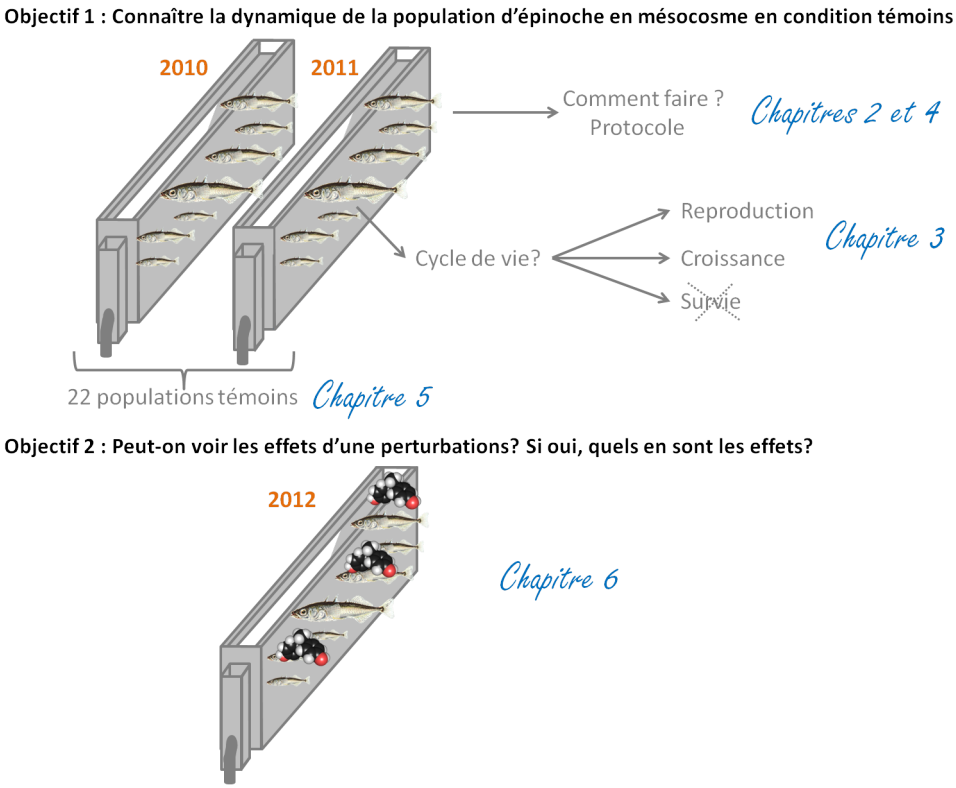

FIGURE 1 – Schéma des étapes de la thèse, des expériences réalisées et de l'organisation des chapitres.

CHAPITRE 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Les mésocosmes en écotoxicologie aquatique

1.1.1 Introduction

Les mésocosmes sont des dispositifs expérimentaux délimités et partiellement clos, généralement construits en plein air (Odum, 1984). Lorsqu'ils sont dédiés à une application aquatique, le terme de mésocosme est utilisé pour décrire des rivières artificielles, des enclos d'exposition en intérieur ou en extérieur et des bassins (Caquet *et al.*, 2000). Ils peuvent être sans courant d'eau (lentique) ou parcouru par un courant d'eau (lotique).

Depuis les années 1970, ils sont utilisés en écologie et en écotoxicologie (Perceval *et al.*, 2009) car ils permettent de mettre en avant les effets directs et indirectes d'une perturbation à différents niveaux d'organisation : individus, populations et communautés (Boyle et Fairchild, 1997; Caquet *et al.*, 1996; Shaw *et al.*, 1994).

En écotoxicologie aquatique, les mésocosmes sont un niveau intermédiaire et complémentaire entre le laboratoire et les études de terrain (Fig. 1.1, Caquet *et al.* 1996). Ils offrent des conditions écologiques plus réalistes que les tests en laboratoire (Caquet *et al.*, 1996).

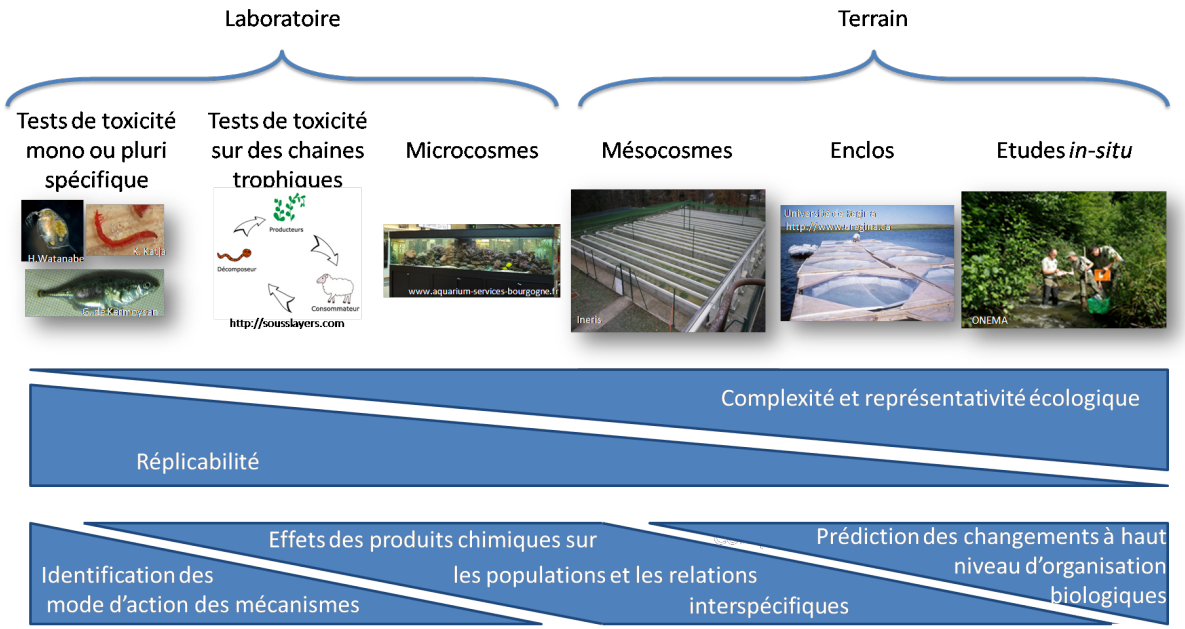

FIGURE 1.1 – Représentation des outils pour les tests écotoxicologiques en milieu aquatique, d'après Caquet *et al.* (1996, 2000).

Dans ces écosystèmes reconstitués, les poissons occupent une place importante, avec des impacts directs et indirects sur le fonctionnement de l'écosystème complet par une régulation importante de la structure des communautés de phytoplancton et de zooplancton, voire de macro-invertébrés (Caquet *et al.*, 2000).

Compte tenu des spécificités des mésocosmes de l'INERIS (rivières artificielles) cette revue bibliographique se focalise sur les écosystèmes expérimentaux lotiques utilisés pour étudier les effets écotoxicologiques sur les poissons.

1.1.2 Les écosystèmes expérimentaux lotiques

1.1.2.1 Les différents types de mésocosmes lotiques

De nombreuses revues existent pour décrire ces écosystèmes expérimentaux (Belanger, 1997; Caquet *et al.*, 2000; Joachim *et al.*, 2010; Kosinski, 1989). Lors de ces descriptions, de nombreuses différences sont mises en avant (emplacement, agencement, taille, forme) tant et si bien qu'il est impossible de définir un système expérimental type.

La majorité des installations se trouvent en extérieur (Belanger, 1997; Joachim *et al.*, 2010; Kosinski, 1989) et environ 15 % se trouvent en intérieur ou sous serre (Joachim *et al.*, 2010). Les systèmes expérimentaux extérieurs sont ouverts à la colonisation par d'autres espèces (insectes) et sont soumis aux aléas climatiques (température, pluie, vent...). Cette caractéristique permet d'être plus proche de conditions climatiques naturelles, mais ceci augmente la difficulté pour travailler (visibilité des individus dans les canaux, confort vis-à-vis des conditions extérieures, prolifération des algues...).

Les mésocosmes sont constitués de deux zones distinctes, (cas des systèmes de l'INERIS) dans une minorité de cas (17, 31 et 45% des cas, respectivement selon Belanger 1997, Joachim *et al.* 2010 et Kosinski 1989). La première zone a un courant fort et une profondeur faible. La seconde a un courant faible et une profondeur plus importante (Belanger, 1997; Joachim *et al.*, 2010). Dans le reste des installations il y a un habitat unique (Joachim *et al.*, 2010). L'inconvénient de la présence de deux zones est qu'elles ajoutent de la varia-

bilité aux expériences car au minimum trois biotopes différents sont créés (amont, aval et la pente entre les deux). Les espèces colonisant les trois biotopes ne sont pas forcément les mêmes (*e.g.* le cresson des fontaines a besoin d'une faible profondeur pour se développer alors que la callitriche nécessite des profondeurs plus importantes). Cependant, cela permet d'étudier le comportement d'un polluant dans des biotopes variés et sur des espèces différentes appartenant au même niveau trophique (Joachim *et al.*, 2010).

En termes de taille du système, il est primordial qu'elle permette l'étude de l'espèce ciblée, qu'il y ait suffisamment de complexité pour que les interactions directes et indirectes entre les espèces présentes puissent se mettre en place (Caquet *et al.*, 2000; Perceval *et al.*, 2009) et que le système soit auto-suffisant (Perceval *et al.*, 2009). Ce volume est estimé à plus de 15 m^3, volume minimum pour mettre en place des relations écologiques selon divers auteurs (Caquet *et al.*, 1996; Heimbach *et al.*, 1994; Volatier, 2004). Les mésocosmes recensés par Joachim *et al.* (2010) mesurent entre 11 et 1000 m de long et quelques centimètres à plusieurs mètres de large. Caquet *et al.* (2000) relèvent que dans plusieurs études, les mésocosmes de types rivières artificielles mesurent 20 m^3 ou 20 m de long, qui est une taille permettant qu'aucun compartiment n'ait un impact majeur sur la structure et le fonctionnement du reste de l'écosystème. Les rivières contenant des poissons mesurent plus de 6 m de long dans la revue bibliographique de Kosinski (1989), 6,8 m dans celle de Belanger (1997) et plus de 11 m dans celle de Joachim *et al.* (2010).

La forme des mésocosmes est importante car elle définit certaines caractéristiques de l'écosystème reconstitué. Par exemple, les parois verticales des mésocosmes favorisent le développement du périphyton (Caquet *et al.*, 2000; Joachim *et al.*, 2010). Or, l'abondance du périphyton peut avoir des répercussions importantes sur les paramètres physico-chimiques (Beketov et Liess, 2008), en modifiant la pénétration de la lumière, l'oxygène dissous ou la concentration de nutriments dans le milieu. La prédation va également être impactée, car les espèces consommant le périphyton vont davantage se développer.

Le plus souvent, le nombre de répliquas des conditions testées est minimisé et le nombre de traitements est maximisé (Belanger, 1997) pour établir une courbe dose-réponse pour

la molécule testée (Belanger *et al.*, 2000; Volatier, 2004). Dans les études à grande échelle en mésocosme, trois conditions différentes et un témoin sont généralement testés (Shaw *et al.*, 1994).

1.1.2.2 Habitat reconstitué

a- Composante abiotique

Dans leur revue bibliographique, Caquet *et al.* (2000) relevaient dans la littérature que peu d'études étaient réalisées avec une bonne qualité d'eau, car fréquemment elle était issue d'écosystèmes naturels adjacent lotiques ou lentiques, voire même de systèmes dérivés d'eau polluée.
Dans le cas des mésocosmes lotiques, le système peut être en flux continu (sans recirculation), en boucle fermée (seule l'eau évaporée est remplacée) ou partiellement en boucle (Kosinski, 1989). Le débit d'eau en entrée doit être régulièrement contrôlé afin d'être sûr qu'il y ait toujours le même volume d'eau. En particulier, dans le cas d'une expérience avec un apport de produit polluant *via* cette eau, il est important que le débit d'entrée soit constant pour assurer des conditions identiques au cours du temps (Caquet *et al.*, 2000).

Le sédiment est une composante importante à introduire dans les mésocosmes selon l'OCDE (2006) car c'est un habitat renfermant un grand nombre de micro-invertébrés, de larves et d'espèces benthiques (Roussel, 2005). Caquet *et al.* (2000) recommandent que les sédiments occupent 10 % de la hauteur de la colonne d'eau. La granulométrie du sédiment introduit est choisie de façon à permettre un bon développement des espèces présentes telles que les macro-invertébrés ou les poissons (Caquet *et al.*, 2000). Même s'il est possible de mettre des sédiments naturels dans les mésocosmes (OCDE, 2006; Roussel, 2005), l'utilisation de sédiments artificiels lors de l'aménagement des mésocosmes assure une reproductibilité de la composition de l'écosystème en termes de physico-chimie et d'activité biologique initiale (Caquet *et al.*, 2000) diminuant ainsi la variabilité. Enfin, le sédiment étant un réceptacle de toutes sortes de polluants (OCDE, 2006), le fait d'avoir un sédiment artificiel assure qu'il ne garde pas de trace d'une ancienne contamination.

b- Composante biotique

Les différentes études en mésocosmes incluent des communautés naturelles variées (*e.g.* invertbérés, algues et macrophytes) et des populations structurées de vertébrés (Boyle et Fairchild, 1997). L'introduction de macrophytes est importante car ils constituent des refuges pour la biocénose du système (OCDE, 2006). Les invertébrés étudiés sont le zooplancton (rotifères, cladocères et copépodes) ; les organismes zoobenthiques classiquement étudiés sont les annélides (dont les oligochètes), les mollusques (gastéropodes et bivalves), les arthropodes (insectes, crustacés) et les plathelminthes (OCDE, 2006).

Les effets peuvent ne pas être seulement des effets directs, mais également des effets indirects, influencés par la densité dépendance et les relations entre les espèces et les communautés (Shaw *et al.*, 1994).

Lors de leur revue bibliographique, Joachim *et al.* (2010) ont noté que les études réalisées suivaient les macro-invertébrés (32 %) le zooplancton (18 %) et les macrophytes (5 %). Enfin, les poissons sont introduits après que le systèmes soit stabilisé (OCDE, 2006) et étudiés dans 25% des études (Joachim *et al.*, 2010). A noter que si les espèces clés sont des macro-invertébrés ou du zooplancton, il vaut mieux ne pas introduire de poissons (OCDE, 2006).

1.1.3 Les différentes espèces de poissons étudiées

Plusieurs espèces de poissons ont déjà été étudiées en mésocosmes. Parmi elles, le saumon royal, *Oncorhynchus tshawytscha* (Bisson et Davis, 1976; Seim *et al.*, 1977), le saumon argenté *Oncorhynchus kisutch* (Bowen *et al.*, 2006; Chaloner *et al.*, 2002; Clements et Schreck, 2004; Crouse *et al.*, 1981; Shaw et Richardson, 2001), la perche truitée, *Micropterus salmoides* (Deutsch *et al.*, 1992; Olson et Nickol, 1996) la perche soleil, *Lepomis macrochirus* (Hermanutz *et al.*, 1992; OCDE, 2006; Wrenn et Granneman, 1980), la truite fardée, *Oncorhynchus clarki* Warren *et al.* (1964), le vairon tête-de-boule, *Pimephales promelas* (Brazner et Kline, 1990; Detenbeck *et al.*, 1996; Gordon *et al.*, 2006; OCDE, 2006; Rickwood *et al.*, 2006; Zischke *et al.*, 1983), l'épinoche à trois épines, *Gasterosteus aculeatus* (Ciric, 2012; Lehtinen, 1989; Maccoll et Chapman, 2011; Maunder

et al., 2007; Moran *et al.*, 2010; OCDE, 2006; Roussel *et al.*, 2008, 2007a,b) et la gambusie, *Gambusia holbrooki* (Beaudouin *et al.*, 2012; Caquet *et al.*, 2001; OCDE, 2006).
Le choix de l'espèce de poisson doit être cohérent avec la taille des mésocosmes et l'espèce doit être de préférence endémique (OCDE, 2006). Par exemple, la taille des systèmes de l'INERIS est de 10 m^3 (20 m de long, 1 m de large, 2 zones de profondeur différentes), ce qui est insuffisant pour suivre des populations de grands poissons (perches, saumons...) mais permet le suivi de populations de plus petites espèces. De même, la présence ou l'absence de courant d'eau peut aussi limiter le choix (Jones *et al.*, 1974). Enfin, le choix des espèces de poissons doit également être fait en prenant en compte des caractéristiques écologiques (régime alimentaire) et ses exigences environnementales (température de l'eau).

1.1.4 Analyse des données de populations en mésocosmes

1.1.4.1 Grande variabilité des données

Lors de la réalisation d'expériences en mésocosmes, il est compliqué de répliquer strictement les conditions (Caquet *et al.*, 1996), qui cherchent à optimiser la balance entre la représentativité écologique et la réplicabilité (Fig. 1.1, Sanderson 2002). La variabilité élevée est donc une conséquence intrinsèque des expériences en mésocosmes (Caquet *et al.*, 2001; Sanderson, 2002; Shaw *et al.*, 1994). Cette variabilité associée au faible nombre de répliquas dans les études en mésocosmes (Sanderson, 2002) conduisent à ne pas identifier les effets si ces derniers ne sont pas très importants (Caquet *et al.*, 2001; Kennedy *et al.*, 1999; Sanderson, 2002; Shaw *et al.*, 1994). Il faut donc analyser les données issues des études en mésocosme à l'aide de méthodologies bien adaptées.

1.1.4.2 Tests applicables dans l'étude des populations

Quelques soient les méthodes utilisées, en amont des tests statistiques, les conditions préalables à leurs réalisations (normalité des données et homoscédasticité des variances) sont souvent supposées sans être testées (Kennedy *et al.*, 1999). Les tests non-paramétriques sont appliqués pour supplanter les théories des méthodes basées sur la loi normale (Kennedy *et al.*, 1999). Cependant, ils souffrent d'un manque de puissance statistique en comparaison des tests paramétriques (Kennedy *et al.*, 1999).

La revue bibliographique de Beaudouin et Péry (2011) recense quatre grands types d'analyses statistiques utilisés (ANOVA, Student inversé, principal responses curve, la modélisation) et est complété dans ce manuscrit.

a- Analyse de la variance, Anova

L'analyse de variance (ANOVA) est la plus utilisée (Kennedy *et al.*, 1999). Elle compare les moyennes entre les traitements dans une étude en mésocosme. Le design de l'expérience est basé sur des traitements répliqués correspondant à différentes concentrations de toxiques testées et un contrôle (Shaw *et al.*, 1994). Cependant, l'ANOVA ne permet de mettre en évidence que des effets très marqués en raison de la forte variabilité entre les mesures et du faible nombre de répliquas des conditions, limité par le nombre de canaux de l'installation (Caquet *et al.*, 2001; Kennedy *et al.*, 1999; Sanderson, 2002; Shaw *et al.*, 1994).

b- Student inversé

Le test de Student inversé (Shaw *et al.*, 1994) propose de retourner la question en testant l'hypothèse nulle "il y a un effet supérieur à un niveau donné". Cependant, selon Beaudouin et Péry (2011), ce test exige des connaissances approfondies pour définir le niveau (considéré comme marquant une différence importante entre les conditions) en fonction de la pertinence écologique du paramètre suivi. De plus, il faut que le coefficient de variation soit inférieur (ou du même ordre de grandeur) que le niveau défini afin que le test ait une puissance statistique acceptable (Shaw *et al.*, 1994).

c- Régression

Certains auteurs utilisent des modèles de régressions pour analyser de manière perfomantes les données issues de mésocosmes (Kennedy *et al.*, 1999). Parmi ces régressions, citons les modèles linéaires mixtes (Jamil *et al.*, 2012) ou les modèles linéaires généralisés (Searle *et al.*, 2013; Unser *et al.*, 2010). Ce n'est pas une méthode normalement utilisée pour les hypothèses spécifiques des études en mésocosmes, mais elle peut être proposée pour obtenir des courbes dose-réponses et définir des seuils (Shaw *et al.*, 1994), tels que la NOEC (*i.e.* concentration minimale sans effet observé). Ensuite, les concentrations causant un effet spécifique peuvent être déterminées par interpolation et extrapolation vers des concentrations non testées (Shaw *et al.*, 1994). Par conséquent, cette méthode a plus de flexibilité dans son utilisation et demande moins de rigueur dans le design expérimental mis en œuvre, mais ne mettra pas en avant des différences entre les conditions.

d- Modélisation

La modélisation est de plus en plus utilisée afin d'analyser les données issues de mésocosmes (Beaudouin *et al.*, 2012; Dueri *et al.*, 2009; Jamil *et al.*, 2012; Wirtz et Sommer, 2013). Ces modèles peuvent être de types matriciels (Bergek *et al.*, 2012; Hayashi *et al.*, 2008). Ils servent, alors, à la simulation et à la prédiction des impacts des substances toxiques.

Une autre méthode est la modélisation, en conditions témoins, de la dynamique des populations en mésocosmes (Beaudouin, 2007; Beaudouin *et al.*, 2012). L'idée de cette méthode repose sur la compréhension de la dynamique en condition témoins pour déceler des perturbations. La solution consiste à modéliser la dynamique de population pour prédire les observations d'une expérience donnée en l'absence de contaminant et ainsi obtenir des lois de distribution des variables mesurées. Ainsi, en intégrant la variabilité physico-chimique et trophiques, elles sont mieux caractérisée que des distributions estimées directement des trois mesures dans les canaux témoins (réduction de l'incertitude). Ces distributions pourront être comparées aux observations faites en conditions perturbées afin de mettre en

avant des différences entre elles. L'avantage de la méthode est que les moyennes et la variabilité ne sont pas calculées à partir de quelques données (égales au nombre de répliquas de conditions) mais issues du modèle qui se nourrit des expériences passées, des connaissances fondamentales sur l'espèce (croissance, reproduction...) et des facteurs propres à chaque expérience tels que la température ou la nourriture (Beaudouin et Péry, 2011). L'inconvénient d'une telle méthode est son besoin d'un nombre important de données afin de construire et de calibrer le modèle.

1.1.5 Conclusions

Les mésocosmes sont des outils pertinents pour évaluer les effets d'une perturbation dans un contexte écosystémique. Il n'y a pas de système expérimental typique ou idéal mais les choix de dimensionnement et de peuplement doivent être liés. Le protocole expérimental doit chercher à limiter au maximum la variabilité des mesures. Malgré toutes les précautions et la rigueur apportées lors des expériences, cette variabilité demeure, le plus souvent, élevée en raison du caractère environnemental de l'étude. Par conséquent, les résultats obtenus nécessitent une analyse statistique fine. Il semble que la modélisation soit la méthode la plus appropriée pour analyser les données et augmenter la puissance statistique, mais, tant que le modèle propre à l'espèce n'est pas calibré, il faut choisir d'autres tests en veillant à vérifier les hypothèses de ces tests.

1.2 L'épinoche à trois épines

1.2.1 Taxonomie

L'épinoche est un poisson téléostéen (ordre des Gasterosteiformes) du genre *Gasterosteus*. Selon les sources prospectées, le nombre d'espèces dans ce genre varie. D'après FishBase, ce genre comporte six espèces :

- *Gasterosteus crenobiontus* Bacescu et Mayer 1956 ;
- *Gasterosteus gymnurus* Cuvier 1829 ;
- *Gasterosteus islandicus* Sauvage 1874 ;
- *Gasterosteus microcephalus* Girard 1854 ;
- *Gasterosteus wheatlandi* Putnam 1867 ;
- *Gasterosteus aculeatus* Linnaeus 1758.

En revanche, d'après l'institut national américain pour l'information biologique moléculaire (NCBI), le registre mondial des espèces marines (WoRMS) et le système d'information taxonomique intégré (SITI), ce genre comporte seulement les deux dernières espèces de la liste, parmi lesquelles, *Gasterosteus aculeatus* Linnaeus 1758, qui est le modèle biologique étudié dans cette thèse.

Le nom scientifique de l'espèce *Gasterosteus aculeatus* vient du latin "*gaster*", signifiant "ventre" et "*ăcŭlĕus*" signifiant "aiguillons" [1]. Son nom vernaculaire, "épinoche à trois épines", renvoie au nombre d'"épines" présentes sur son dos. Cette espèce comporte trois sous-espèces : marine (résidant dans l'eau de mer et se reproduisant dans l'eau de mer), anadrome (résidant dans l'eau de mer et se reproduisant dans l'eau douce), dulçaquicole (résidant et se reproduisant dans l'eau douce). Dans le cadre de cette thèse, le modèle biologique est la sous-espèce dulçaquicole.

G. aculeatus est un poisson fusiforme (Fig. 1.2). Son rapport longueur : largeur est compris entre 5 : 1 et 4 : 1 (Wootton, 1984) mais selon les sites, ce rapport peut changer, modifiant ainsi sa forme (Bell et Foster, 1994). Par ailleurs, la forme du museau peut changer selon le type de nourriture disponible (Nettleship, 2011). A titre d'exemple, le museau est long et étroit dans le cas de population planctonivores (Bell et Foster, 1994).

1. traduction dictionnaire Gaffiot, 1934 latin - français

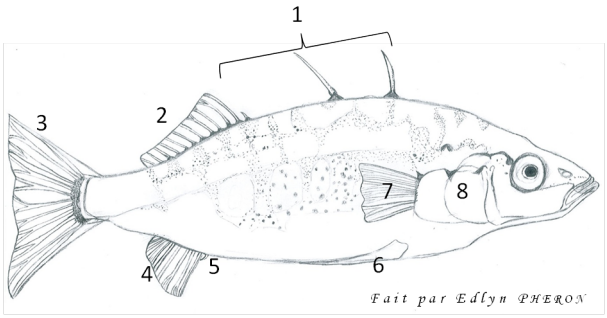

FIGURE 1.2 – Anatomie externe de l'épinoche à trois épines.
1 : Épines dorsales ; 2 : Nageoire dorsale ; 3 : Nageoire caudale ; 4 : Nageoire anale ; 5 : Épine anale ; 6 : Épine pectorale ; 7 : Nageoire pectorale ; 8 : Branchies.

Devant sa nageoire dorsale, il y a les trois épines (Fig. 1.2) desquelles le poisson tire son nom vernaculaire. Deux autres épines se retrouvent sur les flancs du poisson. Les cinq épines peuvent être érigées et maintenues en position par un mécanisme de blocage (Wootton, 1984). Une sixième épine est placée juste devant la nageoire anale. Ses nageoires caudale et pectorales sont grandes comparées aux autres téléostéens (Bell et Foster, 1994). Elles ont une fonction de propulsion (Bell et Foster, 1994), mais elles servent également, pour le mâle, à oxygéner les œufs dans le nid (Järvenpää et Lindström, 2011; Mehlis *et al.*, 2010).

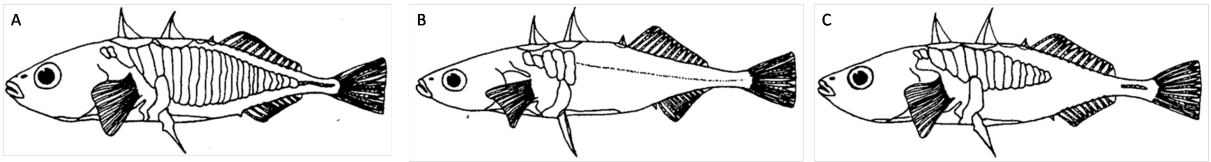

FIGURE 1.3 – Les trois formes de *G. aculeatus*, (A) *trachurus*, (B) *leirus* and (C) *semiarmatus*. Dessins de Wootton (1976).

Le corps de *G. aculeatus* n'est pas constitué d'écailles mais de plaques latérales qui se chevauchent, dont le nombre peut varier (Hagen et Gilbertson, 1973; Reimchen, 1983). Les plaques se développent jusqu'à ce que *G. aculeatus* atteigne une longueur standard de 28 mm (Hagen et Gilbertson, 1973). Le nombre de plaques définit la "forme" de l'épinoche (Fig. 1.3). Ainsi, une forme *trachurus* possède 30 à 35 plaques (Nettleship, 2011) réparties tout au long du corps du poisson ainsi que sur sa nageoire caudale (Fig. 1.3 A).

Cette forme peut se retrouver pour la sous-espèce anadrome et la sous-espèce dulçaquicole, la littérature parle alors de morphologie entièrement plaquée (Hagen et Gilbertson, 1973). La forme *leirus*, aussi appelée "*gymnura*" (Wootton, 1976) n'a que 1 à 9 plaques latérales (Nettleship, 2011; Wootton, 1976, 1984), placées généralement dans la partie antérieure de son corps (Fig. 1.3 B). Cette forme ne concerne que la sous-espèce dulçaquicole (Wootton, 1976). La troisième forme, *semiarmatus* (Fig. 1.3 C) est un intermédiaire entre les deux précédentes. Elle possède un nombre variable de plaques allant de 8 à 30 (Wootton, 1976). Elles sont toujours réparties entre la partie antérieure et postérieure du corps. Dans le cadre de cette thèse, le modèle biologique est de forme *semiarmatus*. Dans de rare cas, il est possible qu'un individu n'ait aucune plaque. On parle alors de "*hologymnura*".
Les différences entre ces formes pourraient être dues à des différences de salinité et de température entre les habitats dans lesquels vivent les individus d'après Bertin (1925 *in* Wootton 1976). Cependant, le nombre de plaques ne renvoie pas nécessairement au type de vie de l'épinoche (Karve *et al.*, 2008). Enfin, certains auteurs suggèrent que le nombre de plaques est dépendant de l'abondance et du type de prédateur (Reimchen, 1980) alors que d'autres ne sont pas en accord avec cette supposition (Hagen et Gilbertson, 1973).

Dans la suite de cette revue bibliographique, nous nous intéresserons uniquement à la littérature concernant notre modèle biologique : *Gasterosteus aculeatus semiarmatus* dulçaquicole.

1.2.2 Répartition géographique

L'épinoche est autochtone des trois continents de l'hémisphère nord (Fig. 1.4), et se rencontre préférentiellement sur la côte des océans Pacifique et Atlantique (Bell et Foster, 1994; Wootton, 1984).

En Europe, *G. aculeatus* est présent dans la majorité des pays (Fig. 1.5) entre 35 °N et 70 °N (Wootton, 1976). La sous-espèce dulçaquicole est largement distribuée le long des côtes européennes et méditerranéennes (Bell et Foster, 1994).



FIGURE 1.4 – Répartition mondiale de *Gasterosteus aculeatus* d'après Wootton (1976). Les zones rouges sont les zones dans lesquelles *Gasterosteus aculeatus* a été observé.

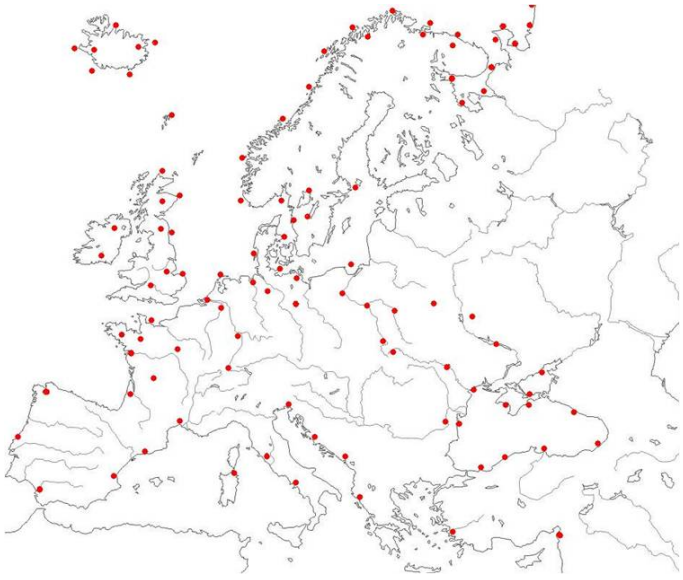

FIGURE 1.5 – Répartition européenne de *Gasterosteus aculeatus* d'après Wootton (1976). Les points rouges correspondent aux observations de cette espèce (pour toutes les sous-espèces) en milieu naturel.

1.2.3 Habitat

Son habitat est caractérisé par une faible profondeur (Barber *et al.*, 2001; Black et Wootton, 1970; Kraak *et al.*, 1999a; Kynard, 1978; Moodie, 1972; Östlund Nilsson *et al.*, 2007) puisque la construction des nids se situe, en moyenne, à une profondeur de 28 ± 11 cm (Mori, 1994). En outre, la vitesse d'écoulement doit être faible (Barber *et al.*, 2001; Kraak *et al.*, 1999a; Östlund Nilsson *et al.*, 2007). En effet, aucun nid n'a été observé dans un habitat ayant une vitesse d'écoulement supérieur ou égale à 20 $cm.s^{-1}$ (Mori, 1994). La très forte majorité des nids ($> 85\%$) sont observés sur une surface plane, composée de vase ou de sable (Mori, 1994).

1.2.4 Alimentation

G. aculeatus est un prédateur visuel (Wootton, 1976, 1984) qui ne s'alimente que pendant la phase diurne (Bell et Foster, 1994). Le régime alimentaire de l'épinoche change en fonction de la saison (Wootton, 1976), du site (Wootton, 1984) et de la taille de sa bouche (Nettleship, 2011). L'épinoche mange des crustacés (Wootton, 1976, 1984), des insectes (Wootton, 1976, 1984), des mollusques (Wootton, 1976), des végétaux (Wootton, 1976, 1984), des œufs de congénères (FitzGerald et van Havre, 1987; Hyatt et Ringler, 1989; Mori, 1995; Whoriskey et FitzGerald, 1985; Wootton, 1984) et des épinoches juvéniles (Kraak *et al.*, 1999b; Wootton, 1984).
La quantité de nourriture consommée est dépendante de la taille de l'individu (Kislalioglu et Gibson, 1976; Wootton, 1976, 1984), de la température de son environnement (Wootton, 1976, 1984) et potentiellement d'autres facteurs de l'environnement tels que le pH ou la salinité.

1.2.5 Cycle de vie

La Figure 1.6 présente les différents stades de développement de l'épinoche. Ils se déroulent dans ou hors du nid. La durée n'est pas la même d'un stade à un autre (quelques jours pour le stade œuf jusqu'à plusieurs mois pour le stade juvénile).

Pour se reproduire, les mâles construisent un nid dans lequel les femelles, attirées par le mâle, viennent déposer leurs ovocytes secondaires (Craig-Bennett, 1931; Wootton, 1984).

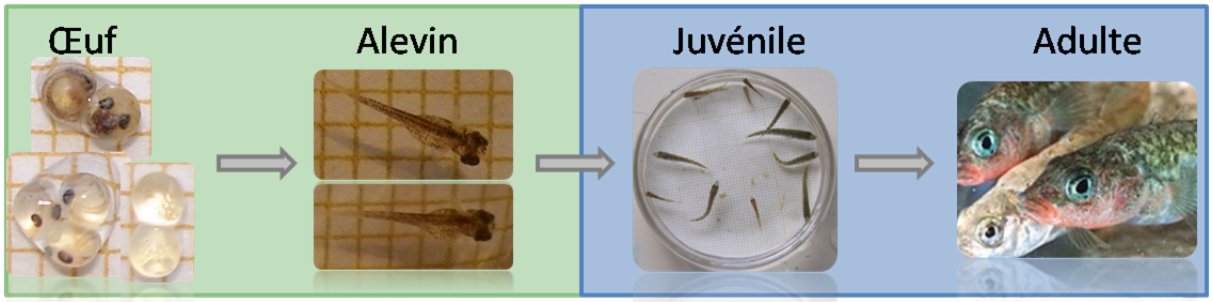

FIGURE 1.6 – Stades de développement de *Gasterosteus aculeatus*.
■ : Stade de développement qui se déroule dans le nid ;
■ : Stade de développement qui se déroule dans un environnement "libre".

Ensuite, le mâle vient fertiliser les ovocytes secondaires (Craig-Bennett, 1931; Wootton, 1984). Un ovocyte secondaire fertilisé est le premier stade : l'œuf. Le mâle protège sa progéniture (aux stades œuf et alevin) dans le nid, de tous les prédateurs (Östlund Nilsson *et al.*, 2007; Pressley, 1981). Le développement de l'œuf a été très bien décrit (à 18 - 19 ˚C) par Swarup (1958). Juste après la fertilisation par le mâle, l'œuf devient de plus en plus transparent et se segmente jusqu'à atteindre le stade blastula au bout de 15 heures. Au bout de 50 heures, les lobes oculaires apparaissent. Après 168 heures, la bouche est formée et les nageoires pectorales bougent dans l'œuf. Quelques heures après (192 heures), l'œuf éclot.

La vitesse de développement des œufs dépend de la température de l'eau. La relation entre la durée du développement et la température de l'eau a été étudiée par de nombreux auteurs (Kynard, 1978; van Iersel, 1953; Wootton, 1976, 1984). Le développement des œufs dure entre 8 jours à 18 - 20 ˚C (van Iersel, 1953; Wootton, 1976) et 40 jours à 8 ˚C (Wootton, 1976, 1984). Selon les sites, le taux d'éclosion varie entre 32 % (Foster, 1988) et plus de 90 % (Mori, 1987b). Cette variabilité dépend de la prédation (Hyatt et Ringler, 1989; Reimchen *et al.*, 1994; Semler, 1971; Vickery *et al.*, 1988), de la température de l'eau (Wootton, 1976, 1984) et de l'impact de maladies tels que le développement de champignons (Kynard, 1978) ou de celui du parasitisme (Kraak *et al.*, 1999a; Poulin et Fitzgerald, 1989).

Lorsque les œufs éclosent, les épinoches passent au stade alevin. Ce stade est caractérisé par la présence du sac vitellin (Fig. 1.6) qui est un appendice hyper-protéiné qui assure le développement de l'alevin dans les meilleures conditions jusqu'à l'ouverture de la bouche. Le temps de résorption du sac vitellin dépend de la température (Kraak *et al.*, 1999a; Kynard, 1978; Moodie, 1972; Wootton, 1984). Il est compris entre 4 (Wootton, 1984) et 16 jours (Foster, 1988). Tout comme la mortalité des œufs, la mortalité des alevins dépend de la prédation, de la température de l'eau, des maladies et du parasitisme.

La résorption du sac vitellin correspond à l'ouverture de la bouche pour se nourrir. L'alevin quitte le nid et devient un juvénile. Ce stade est défini comme une période ou les jeunes sont immatures et indépendants de leur père (Bell et Foster, 1994). En conditions contrôlées et sans stress de prédation, aucune mortalité des épinoches juvéniles (entre 5 et 20 mm) n'est observée (Foster *et al.*, 1988). Cependant, en milieu naturel les juvéniles peuvent être consommées (Foster *et al.*, 1988; Rice *et al.*, 1993) par des épinoches adultes (Kraak *et al.*, 1999b), des macro-invertébrés (*e.g.* notonectes ou odonates Foster *et al.* 1988).

La durée de vie rapportée d'une épinoche n'est pas la même selon les auteurs. Ainsi, d'après Mori et Nagoshi (1987), *G. aculeatus* ne survit pas à son second hiver, alors que selon Dufresne *et al.* (1990) les épinoches vivent plus de deux ans, voire quatre ans (Wootton, 1984) et jusqu'à sept ans selon Reimchen (1990). La mortalité peut être induite par la température (Bell et Foster, 1994) et accentuée en cas de reproduction (Dufresne *et al.*, 1990; Hyatt et Ringler, 1989; Mori et Nagoshi, 1987).

1.2.6 Croissance

La croissance est fonction de la température (Allen et Wootton, 1982; Lefébure *et al.*, 2011; Wootton, 1984), de la quantité de nourriture (Allen et Wootton, 1982; Muller-Feuga, 1990; Wootton, 1984), mais ne semble pas dépendre du type de nourriture (Lefébure *et al.*, 2011). En mesurant les gains de taille pour une même durée, la croissance est beaucoup plus importante chez l'épinoche, durant le printemps et l'été que pendant l'automne et l'hiver (Allen et Wootton, 1983).

La température est un facteur prépondérant pour la croissance des épinoches du fait que les poissons sont poïkilothermes [2]. Le taux de croissance est nul jusqu'à une température minimale de croissance. Puis le taux de croissance augmente avec la température jusqu'à la température optimale de croissance et diminue ensuite jusqu'à la température maximale de croissance au-delà de laquelle la croissance est nulle (Allen et Wootton, 1982; Lefébure *et al.*, 2011; Wootton, 1984). La température minimale de croissance est estimée entre 3˚C (Allen et Wootton, 1982) et 4 ˚C, (Lefébure *et al.*, 2011). La température optimale de croissance est comprise entre 19 et 22 ˚C, respectivement selon Allen et Wootton (1982) et Lefébure *et al.* (2011). Enfin la température maximale de croissance est comprise entre 29 et 31 ˚C (Lefébure *et al.*, 2011). Les taux de croissance initiaux (croissance des juvéniles à leur sortie du nid) trouvés dans la littérature vont de 0.030 mm/j (Wootton, 1984) à 0.50 mm/j (Bell et Foster, 1994), selon les niveaux de nourriture et les températures de l'eau.

La taille maximale de l'épinoche est dépendante de facteurs génétiques et environnementaux (Bell et Foster, 1994). Elle est peu documentée pour les mâles, mais très documentée pour les femelles. Cette remarque n'est pas expliquée. La taille standard maximale des femelles est très variable selon les régions et les latitudes (35 à 116 mm d'après Wootton 1984 et Bell et Foster 1994). A titre d'exemple, Bell et Foster (1994) rapportent que la taille maximale d'une épinoche en Norvège (60 ˚N) est de 72 mm alors qu'elle sera comprise entre 47 à 59 mm en Ecosse (57.5 ˚N). Dans leur revue bibliographique, la plus petite valeur de taille standard maximale relevée est de 36 mm (Ecosse). La plus grande valeur de taille standard maximale rencontrée dans la littérature est de 116 mm (Colombie britannique, Canada). En France, Bell et Foster (1994) recensent des tailles standard maximales allant de 52 à 63 mm.

2. animaux ayant une température corporelle qui varie selon celle du milieu

1.2.7 Reproduction

La reproduction est dépendante de nombreux facteurs, tels que la photopériode (Borg, 1982; Wootton, 1976; Yeates-Burghart *et al.*, 2009), la température de l'eau (Borg et Van Veen, 1982; Wootton, 1976) et la nourriture (Wootton, 1976). La trajectoire de la croissance de l'individu pendant sa phase juvénile à des répercussions sur la reproduction (Lee *et al.*, 2012). Les auteurs expliquent qu'un juvénile ayant une croissance ralentie au début de sa vie optimisera sa reproduction.

La période de reproduction s'étend du printemps à l'été à la latitude de 50 °N (Östlund Nilsson *et al.*, 2007; Wootton, 1984; Wootton et Fletcher, 2009). Plus précisément, elle débute en mars (Baker, 1994; Wootton, 1984) et se termine en octobre (Baker, 1994). Selon le site étudié, la période de reproduction n'est pas exactement la même car la température et la photopériode sont les deux facteurs environnementaux ayant une forte influence sur cette période (Sokolowska et Kulczykowska, 2006).
En effet, de la mélatonine est sécrétée au niveau d'une partie photosensible du cerveau à partir d'une valeur seuil de photopériode. Cette hormone gouverne le début et la fin de la période de reproduction. Des données de terrain ont confirmé ces informations, sans pour autant donner de valeur de seuil (Sokolowska et Kulczykowska, 2006). La réponse à la photopériode semble être de type "*tout-ou-rien*" (Wootton, 1984). Il faudrait un minimum de 8 heures de lumière et 16 heures d'obscurité pour activer la reproduction (Wootton, 1984). Cette valeur ne fait pas l'unanimité, en particulier Yeates-Burghart *et al.* (2009) a montré que le minimum était de 11.5 heures et 13 heures de lumière quotidienne, respectivement pour des populations d'épinoches de l'Oregon et d'Alaska. La température minimale pour la reproduction varie entre 8 °C (Borg, 1982) et 10 °C (Wootton, 1984). Afin que l'épinoche se reproduise, il faut à la fois que le seuil de température et le seuil de photopériode soient dépassés, sinon les épinoches ne sont pas capable de développer leurs caractéristiques sexuelles secondaires et ne peuvent donc pas se reproduire (Wootton, 1976).

La taille standard maximale des juvéniles immatures (taille au début de la puberté) recensée dans la littérature s'étend de 22 mm (Baggerman *in* Wootton 1976) à 28 mm (Hagen et Gilbertson, 1973).
La taille à la maturité est la taille minimale à partir de laquelle une épinoche peut se reproduire (Wootton, 1973b). Cette taille minimale dépend du site (Mori, 1987a), de la population (Baker, 1994), de la nourriture disponible (Wootton, 1973b) et de la taille maximale de l'individu (Bell et Foster, 1994; Froese et Binohlan, 2000). Les femelles sont matures sexuellement en moyenne à 41 mm (taille minimale 24 mm) selon Bell et Foster (1994), à 45 mm (taille minimale 33 mm) selon Mori et Nagoshi (1987), entre 50 et 75 mm selon Mori (1987a). Les mâles deviennent fonctionnellement matures à partir de 40 mm (Wootton, 1976).

a- <u>Les femelles</u>

⇒ L'intervalle inter-parturition

L'intervalle entre deux pontes, aussi appelé intervalle inter-parturition, est défini comme le temps nécessaire à la femelle pour effectuer un cycle complet de reproduction : maturation des œufs et expulsions de ces derniers. Ces œufs pondus peuvent représenter 15 à 25% de la masse de la femelle (Wootton, 1976).

La durée de la période entre deux pontes successives dépend de la quantité de nourriture disponible pour la femelle (Poizat *et al.*, 1999; Wootton, 1976, 1985) et de la température (Bolduc et FitzGerald, 1989; Borg et Van Veen, 1982; Boulé et Fitzgerald, 1989; Wootton, 1984), mais ne semble pas être influencée par la masse de la femelle (Wootton *in* Bell et Foster 1994). Les valeurs trouvées dans la littérature pour des individus nourris *ad-libitum* sont comprises entre 2,2 jours à 17,5 ˚C (Brown-Peterson et Heins, 2009) et 17.8 jours à 6 ˚C (Boulé et Fitzgerald, 1989). Les valeurs de la littérature pour des individus exposés à 18 - 20 ˚C sont comprises entre 4,1 ± 0,6 et 8,2 ± 1,6, selon le niveau de nourriture (Wootton, 1973b).

⇒ La production des œufs

La femelle épinoche peut pondre plusieurs fois pendant une saison à quelques jours d'intervalle (Poizat *et al.*, 1999). Au cours d'une période de reproduction, une femelle peut pondre jusqu'à 20 fois (Wootton, 1976). Le nombre de pontes, mais également le nombre d'œufs produits à chaque cycle, dépendent de la quantité de nourriture disponible pour la femelle pendant une période de reproduction (Bell et Foster, 1994; Poizat *et al.*, 1999; Wootton, 1973a, 1976, 1985; Wootton et Fletcher, 2009). Le nombre d'œufs produits à chaque cycle dépend également de la taille standard des femelles (Kume, 2011; Kynard, 1978; Wootton, 1973a, 1976).

b- Les mâles

La nourriture disponible pour les mâles est un facteur important pour leur reproduction. Des mâles matures maintenus avec de faibles rations de nourriture ont des reins significativement plus petits que les mâles conservés avec de fortes rations de nourriture. Les reins produisent de la spiggine qui est une protéine permettant de "coller" les éléments du nid entre eux. Cette observation suggère qu'il y aurait une inhibition de la construction des nids à de faibles niveaux de nourriture (Stanley, 1984, *in* Wootton, 1985). Cette observation s'explique par la production, par les reins, de la spiggine qui est une protéines structurant pour la construction des nids des épinoches.

A une densité de mâles donnée, le nombre de territoires[3] est plus élevé lorsqu'il y a plus de nourriture (Wootton, 1985). En revanche, la compétition entre les mâles fait diminuer la taille du territoire (Stanley, 1984, *in* Wootton, 1985). Par conséquent le nombre de mâle établissant un territoire augmente avec la ration de nourriture et la densité jusqu'à ce que la taille minimale de territoire soit atteinte (Wootton, 1985). Cette taille minimale est de 0,15 à 0,20 m^2 (van den Assem, 1967; Wootton, 1984). Ces données sont en accord avec des observations de terrain qui montre que la distance entre deux nids, en zone ouverte est d'environ 40 cm (Black et Wootton, 1970; Kynard, 1978; Wootton, 1972). D'après Candolin (2000), la taille du territoire du mâle est positivement corrélée à

3. zone dans laquelle le mâle construit son nid qu'il défend de ses congénères et courtise les femelles.

sa taille standard, à la structure de l'habitat et à la probabilité de rencontrer une femelle, mais pas avec son niveau d'activité. En revanche, Mori (1993) considère que la taille du mâle et la taille du territoire ne sont pas corrélés.

Pendant la période de reproduction, le mâle attire la femelle dans son nid (Ishikawa et Mori, 2000; Wootton, 1976, 1984) pour qu'elle vienne y déposer ses œufs prêt à être fécondés. Ensuite, le mâle fertilise les œufs déposés. Le mâle peut aller courtiser d'autres femelles (Kraak *et al.*, 1999a,b; Östlund Nilsson *et al.*, 2007; Pressley, 1981; Wootton, 1976). Le temps de collecte est conditionné par rapport à la première ponte (Kraak *et al.*, 1999b). Il dure généralement 2 à 3 jours (Kraak *et al.*, 1999b; Kynard, 1978) et au maximum 10 jours (Kraak *et al.*, 1999b). Un mâle peut collecter théoriquement jusqu'à 30 pontes différentes (Kraak *et al.*, 1999b), mais les observations montrent plutôt 3 à 5 pontes tout au plus (Pressley, 1981; van Iersel, 1953; Wootton, 1976). Quant au nombre d'œufs collectés, il varie entre 300 et 3000 (Mori, 1987a; Wootton, 1984) et n'est pas dépendant de la température (Kraak *et al.*, 1999b).
Le mâle entre ensuite dans la phase parentale qui dure depuis la fécondation des œufs jusqu'à la sortie des alevins (Mori, 1993). Si le mâle perd tous ses œufs au début de la phase parentale, il retourne courtiser des femelles. En revanche, s'il perd ses œufs alors que la phase parentale est bien entamée (œufs presque tous éclos), il détruit le nid et en construit un nouveau (Wootton, 1984). Durant toute la phase parentale, le mâle a deux activités principales : la ventilation du nid pour oxygéner les œufs et la défense du nid contre les prédateurs con- et hétéro-spécifiques (Östlund Nilsson *et al.*, 2007; Pressley, 1981; Wootton, 1984).

Le temps entre la construction de deux nids est majoritairement inférieur à 3 jours (Kynard, 1978). Il a été estimé qu'un mâle peut construire 5 nids pendant la période de reproduction (Wootton, 1976), mais les observations en milieu naturel montrent que les mâles ne font généralement qu'un ou deux cycles complets (Kynard, 1978; Mori, 1993).

1.2.8 Conclusions

L'épinoche à trois épines est une espèce dont le cycle de vie, malgré sa complexité, est bien décrit dans la littérature. Son ubiquité et ses caractéristiques font d'elle une espèce recommandée par l'OCDE pour l'étude des perturbateurs endocriniens. Cependant, certaines valeurs de paramètres de cette espèce dépendent fortement du site, de la latitude ou encore de son environnement (température, nourriture) et demandent donc à être précisées dans le cadre des expérimentations en mésocosmes à l'INERIS.

1.3 Le bisphénol A (BPA)

Les perturbateurs endocriniens sont définies selon l'OMS (2002) comme *"des substances ou mélanges exogènes qui altèrent la (les) fonction(s) du système endocrinien et par conséquent, induisent des effets nocifs sur la santé d'un organisme sain, de ses descendants ou (sous-) populations"*.
Ces substances peuvent avoir une origine naturelle, comme les hormones stéroïdiennes (*e.g.* testostérone), les phyto-œstrogènes (*e.g.* flavonoïdes) etc. ou une origine anthropique, dont 889 substances étaient identifiées le 18 juin 2013 [4], parmi lesquelles, le bisphénol A (BPA).

Le BPA est aujourd'hui une substance qui inquiète le grand public et qui fait l'objet d'articles dans la presse quotidienne française (Le Monde, Le Figaro, Le Télégramme...) et les journaux télévisés (par exemple le 20h de TF1 du 9 avril 2013 [5]) et a créé une inquiétude au sujet des "tickets de caisse" dont l'impression thermique était rendu possible par le BPA. Cette substance a créé également des débats dans le monde politique (Sénat, Assemblée) et a contraint le gouvernement à prendre des décisions législatives importantes (interdiction formelle pour les nourrissons). L'utilisation du BPA est interdite dans la fabrication des biberons dans l'Union Européenne (European Council, 2011). En France, "tout conditionnement, contenant ou ustensile comportant du bisphénol A et destiné à entrer en contact direct avec des denrées alimentaires pour les nourrissons et enfants en bas âge [..] ont été suspendues à compter du" 1er janvier 2013 (Art 1 de la Loi 2012 - 1442, Journal Officiel de la Republique Française 2012). De plus, "cette suspension prend effet, dans les mêmes conditions, au 1er janvier 2015 pour tout autre conditionnement, contenant ou ustensile comportant du bisphénol A et destiné à entrer en contact direct avec des denrées alimentaires" (Art 1 de la Loi 2012 - 1442, Journal Officiel de la Republique Française 2012).

4. Liste pour laquelle au minimum une publication scientifique a démontré l'effet de la molécule sur le système endocrinien. Organisation TEDX (The Endocrine Disruption Exchange) : `http://www.endocrinedisruption.com/endocrine.TEDXList.overview.php`.

5. `http://lci.tf1.fr/science/sante/bisphenol-a-ou-se-cache-t-il-7918430.html?xtmc=bpa&xtcr=1`

Dans un contexte environnemental, cette molécule se retrouve dans les cours d'eau européens et nord américains (Klecka *et al.*, 2009) et pose la question d'effets possibles sur les écosystèmes aquatiques.

1.3.1 Utilisation

Le BPA est principalement utilisé par les industriels comme produit intermédiaire dans la production de polycarbonates, d'époxy, de retardateurs de flamme et d'autres produits spécifiques. Les produits finis qui en résultent sont les adhésifs, les revêtements de protections, les matériaux de construction, les papiers thermiques et les matériaux destinés à l'encapsulation électrique et les parties électroniques (Staples *et al.*, 1998).

1.3.2 Caractéristiques chimiques

Le BPA (2,2-(4,4dihydroxydiphenyl)propane) est une substance chimique issue de la réaction deux équivalents de phénol et un équivalent d'acétone. Il a une formule brute $C_{15}H_{16}O_2$ (Fig. 1.7). Il est soluble dans l'eau (jusqu'à 300 mg/L). La molécule est reconnue comme nocive, corrosive, sensibilisante, mutagène, cancérogène et reprotoxique. Son numéro CAS est le 80-05-7. Il est reconnu comme irritant pour les voies respiratoires (R37) peut provoquer des lésions oculaires graves (R41), peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau (R43) et présente un risque possible d'altération de la fertilité (R62). Il doit être conservé hors de portée des enfants (S2). Lors de son utilisation, il faut porter un appareil de protection des yeux et du visage (S26) ainsi qu'un vêtement de protection et des gants appropriés (S36/37). Des compléments d'informations sur les propriétés physico-chimiques sont référencées dans la revue de (Staples *et al.*, 1998).

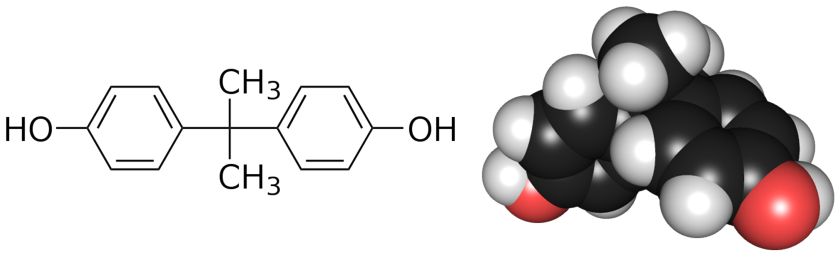

FIGURE 1.7 – Le bisphénol A, formule développée plane et structure moléculaire 3D.

1.3.3 Dégradation et métabolites

Le BPA peut être dégradé dans l'environnement selon diverses processus : la dégradation bactérienne (Irmak *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2007) et la photo-dégradation (Kang *et al.*, 2007; Katsumata *et al.*, 2004; Ohko *et al.*, 2001).
La dégradation est surtout le résultat d'une biodégradation en aérobie (Kang *et al.*, 2007). La photo-dégradation est la voie la plus importante de dégradation non biologique du BPA dans les environnements aquatiques (Kang *et al.*, 2007; Katsumata *et al.*, 2004). Les processus dominant alors sont la photolyse ou la photo-oxydation (Irmak *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2007). La dégradation du BPA par les UV ou de façon plus générale, par la lumière est très lente (Kang *et al.*, 2007; Katsumata *et al.*, 2004; Ohko *et al.*, 2001). Des molécules peuvent être ajoutées afin de catalyser le traitement. Ces molécules peuvent être, à titre d'exemple, être du dioxide de titane TiO_2 (Ohko *et al.*, 2001), de l'ozone, O_3 (Irmak *et al.*, 2005) ou encore du fer, Fe^{++} (Katsumata *et al.*, 2004).
Le temps de demi-vie du BPA dans l'environnement aquatique est compris entre 0,5 et 6 jours (Klecka *et al.*, 2001; West *et al.*, 2001).

Dans les organismes, les métabolites retrouvés sont le BPA-glucuronide qui est un métabolite majeur retrouvé chez le rat (Falcy *et al.*, 2013), mais également chez le *Danio rerio* (Kang *et al.*, 2007). Il y a également des métabolites mineurs, tels que le 5-hydroxybisphénol A et le BPA sulfate. Ce dernier, étant formé uniquement à forte dose, ce qui suggère une saturation métabolique à ces doses chez le rat (Falcy *et al.*, 2013).
Afin d'être complet et d'aborder une notion physique de la dégradation du BPA et pas seulement biologique, à température élevée, le BPA se décompose lentement et forme du phénol et de l'isopropénylphénol (Falcy *et al.*, 2013).

1.3.4 Concentrations dans l'environnement

En 2006, en Europe de l'ouest, la production annuelle globale de BPA fut estimée à 1 150 000 tonnes (European Union, 2008). En 1993, Staples *et al.* (1998) estiment que 0,017% du BPA produit est relargué dans l'air, les eaux de surfaces ou dans les usines de traitement des eaux usées. Le BPA se dégrade rapidement dans l'environnement

(temps de 1/2 vie aquatique estimé entre 0,5 et 6 jours), tel que démontré dans les tests standardisés de biodégradation et les suivis dans l'environnement (Klecka *et al.*, 2001; West *et al.*, 2001). L'exposition à de faibles concentrations de BPA se produit dans les systèmes aquatiques par les rejets des stations d'épuration des eaux usées lors de sa fabrication et de son utilisation (Cousins *et al.*, 2002; Staples *et al.*, 1998).
Le BPA est trouvé dans les rivières d'Amérique du Nord et d'Europe (Klecka *et al.*, 2009). Dans la rivière de l'Elbe, en Allemagne, le BPA avait été mesuré à $0,105 \pm 0,204$ μg/L (Heemken *et al.*, 2001). Dans les eaux de surfaces hollandaises, des valeurs de 0,33 μg/L ont été mesurées et une observation à 21 μg/L (Belfroid *et al.*, 2002). Miege *et al.* (2012) a dosé du BPA dans 38% des 32 échantillons de tissus de poissons (4 espèces différentes). Les concentrations moyennes mesurées étaient de $0,137 \pm 0,211$ μg/L.

1.3.5 Mode d'action et écotoxicité sur les poissons

Le BPA peut avoir des affinités avec différents récepteurs (Delfosse *et al.*, 2012; Inserm, 2011) :

- Les récepteurs nucléaires œstrogènes α et β (ERα et β) ;
- Les récepteurs des œstrogènes membranaires ;
- Les récepteurs nucléaires orphelins EERα ;
- Les récepteurs nucléaires des androgènes (AR).

Selon les concentrations d'exposition, les affinités pour les différents récepteurs seront favorisées (Delfosse *et al.*, 2012). Ainsi les faibles doses de BPA, < 50 ng/mL d'après Wetherill *et al.* (2007), favorisent les récepteurs des œstrogènes membranaires (Delfosse *et al.*, 2012; Inserm, 2011). Une exposition à de fortes doses favorisera les affinités avec les ERα et β.

Comme le décrit Bursztyka (2008), les activités vont être différentes selon les récepteurs activés (activation des ER : activité œstrogénique ; activation des AR : activité anti-androgénique). Les ER agissent comme des facteurs de transcription ligand-inductibles qui jouent un rôle important dans la croissance et dans la maintenance des tissus tels que les glandes mamaires, l'utérus, le système cardio-vasculaire et le système nerveux central (Delfosse *et al.*, 2012).

De nombreuses revues rapportent des effets au niveau de l'individu chez le poisson (Crain *et al.*, 2007; Flint *et al.*, 2012; Mills et Chichester, 2005; Segner *et al.*, 2003), cependant, un manque est identifié au niveau des impacts du BPA sur des populations de poissons. Le tableau 1.1 rapporte les LOEC pour différentes variables observées sur les individus. Pour résumer les informations, le BPA a des effets sur la structure et la composition des gonades à partir de 1 μg/L de BPA (Flint *et al.*, 2012), la production de vitellogénine est induite à partir de 10 μg/L de BPA (Flint *et al.*, 2012) et la production des œufs et le taux d'éclosion de ces œufs sont affectés à partir de 640 μg/L de BPA (Crain *et al.*, 2007; Sohoni *et al.*, 2001).

Le BPA affecte significativement la survie des juvéniles du vairon (*P. promelas*) après 32 jours post éclosion, entre les générations F0 et F1 dès 160 μg/L (Staples *et al.*, 2011) et réduit le nombre d'œufs produit par femelles quotidiennement à 640 μg/L, entre les générations F0 et F1 (Staples *et al.*, 2011).

1.3.6 Conclusions

Le bisphénol A est une molécule d'utilité reconnue pour les industriels de domaines multiples. Ses effets de perturbateurs endocriniens sont également avérés par la communauté scientifique et sont décrits dans la littérature chez beaucoup d'espèces de poissons. Cependant, les études ont été menées principalement à l'échelle individuelle et dans des conditions contrôlées. Il y a donc un manque d'informations pour des populations exposées sur le long terme dans des conditions écosystémiques, telle que l'étude menée au cours de cette thèse.

TABLEAU 1.1 – Revue synthétiques des effets du BPA sur les poissons.

Poissons	**LOEC (μg/L)**	**Durée (j)**	**Point de sortie**	**Références**
Dicentrarchus labrax	10	15	Induction de VTG	Flint *et al.* (2012)
Pimephales promelas	64	164	Induction de VTG	Mihaich *et al.* (2012)
P. promelas	160	71	Induction de VTG	Sohoni *et al.* (2001)
P. promelas	1	164	Augmentation du pourcentage de spermatocytes	Flint *et al.* (2012)
Cyprinus carpio	1	15	Modification de la structure de la gonades des mâles et augmentation de l'atrésie des ovocytes	Flint *et al.* (2012)
Salmo trutta fario	1.75	100	Réduction de la qualité du sperm, ovulation retardée	Flint *et al.* (2012)
Orizias latipes	10	-	Ova - testis	Metcalfe *et al.* (2001)
P. promelas	16	-	Altération des types de cellules sexuelles dans les gonades mâles	Mihaich *et al.* (2012)
P. promelas	160	-	Diminution de la fréquence de spermatocytes	Mihaich *et al.* (2012)
Danio rerio	375	-	Modification de l'histologie des gonades	Segner *et al.* (2003)
P. promelas	640	-	Réduction du taux d'éclosion	Crain *et al.* (2007); Sohoni *et al.* (2001)
P. promelas	1280	-	Inhibition de la production des œufs	Crain *et al.* (2007); Sohoni *et al.* (2001)
O. latipes	2280	-	Diminution du nombre d'œufs	Shioda et Wakabayashi (2000)
C. carpio	1	15	Diminution des ratios d'œstrogène et d'androgène	Flint *et al.* (2012)

CHAPITRE 2

MÉTHODOLOGIES GÉNÉRALES

2.1 Introduction

Lors du précédent chapitre, nous avons mis en avant des variations importantes des valeurs des traits d'histoire de vie d'un site à un autre, mais également de l'influence des conditions environnementales (température, nourriture) sur ces traits. Afin de comprendre la dynamique de la population, il est important de définir ces valeurs lors d'expériences menées à l'Ineris et dont les protocoles sont présentés dans ce chapitre. Dans une première partie, nous présentons les protocoles expérimentaux généraux (manipulations des poissons, mesurage de la taille standard, sexage...). Dans une seconde partie, nous détaillons le protocole des expériences en mésocosmes. Enfin, la dernière partie de ce chapitre définit comment on été traitées les données.

2.2 Généralités

2.2.1 Mesure de la taille standard

La taille standard est définie comme la taille entre le bout de la lèvre supérieure du poisson et le milieu de la ligne noire qui se trouve à la base de la nageoire caudale (Fig. 2.1).

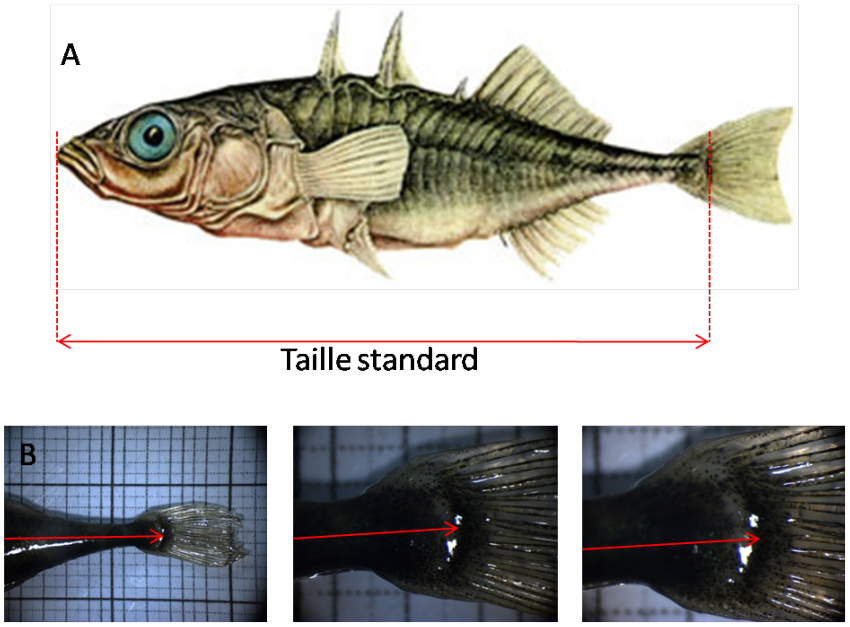

FIGURE 2.1 – Mesure de la taille standard d'une épinoche à trois épines.
A : Mesure de la taille standard ; B : Illustration de la mesure au milieu de la bande noire.

La mesure pouvait être effectuée au pied à coulisse, sur du papier millimétré ou à l'aide d'une photographie traitée ensuite avec le logiciel ImageJ (Rasband, 2012). Pour la photographie, le poisson est positionné sur le flanc pour faciliter la mesure.

2.2.1.1 Mesure au pied à coulisse

La méthode de mesure au pied à coulisse est fiable et performante. La précision dépend du pied à coulisse utilisé. Dans le cas de ce travail, le pied à coulisse utilisé est toujours le même : le pied à coulisse "DIGIMATIC Caliper", certifié, de la marque Mitutoyo, avec une précision de ± 0,02 mm.

2.2.1.2 Mesure par photographie

Outre la précision, la méthode par photographie présente plusieurs avantages. Le premier d'entre eux est que lorsqu'une expérience est réalisée avec des poissons vivants, le stress est moindre car les poissons ne sont pas manipulés à outrance. Selon les mesures, ils peuvent même rester dans l'eau. Le second avantage est qu'il est possible de revenir sur la mesure *a posteriori* et ainsi contrôler les résultats obtenus.

La moyenne des écarts entre les mesures par analyse de photographie sous ImageJ et au pied à coulisse est de 3,1 ± 1,8 % (Georges, 2010). L'écart entre les mesures sur poissons anesthésiés et poissons non-anesthésiés était en moyenne de 2 % (Georges, 2010). L'écart étant inférieur à 5 % de la mesure, et indépendant de la taille standard du poisson, la méthode de mesure par photographie a été considérée comme acceptable.
Georges (2010) a photographié 10 poissons de 25 à 27 mm qu'il a mesuré sous ImageJ en redéfinissant l'échelle pour chaque photographie (Fig. C - 5, Annexe C, page 290). L'écart entre la mesure et la moyenne des mesures pour un même poisson est toujours inférieur à 0,25 %. La méthode de mesure par photographie a été considérée comme réplicable.
La précision de la méthode dépend de la qualité de la photo et surtout du nombre de pixels composant la photographie. Elle peut atteindre ± 0,01 mm près car l'image chargée sous ImageJ peut être zoomée.

La méthode de mesure par photographie étant acceptable, précise et réplicable, le protocole retenu est le suivant :
Le poisson est placé sur le flanc sur du papier millimétré, ou dans un récipient contenant un volume d'eau, lui même posé sur du papier millimétré. Une photographie est prise en réglant l'appareil photo sur le mode *"macro"* (appareil photo PENTAX compact digital de 12.1 mégapixels, autofocus). Afin de gagner en netteté, approcher l'appareil du poisson, mais ne pas zoomer. Ne pas utiliser de flash avant d'éviter les reflets avec les gouttes d'eau. En cas de luminosité trop faible, privilégier les sources de lumière froide pour limiter la dessiccation du poisson et les changements de température. Deux à trois clichés par individus sont réalisés.

2.2.1.3 Mesure sur papier millimétré

La mesure de la taille standard sur du papier millimétré peut s'avérer très utile, notamment lors du tri des poissons. La mesure n'est pas très précise (± 1 mm). L'avantage principal de cette méthode de mesure est qu'elle est sa rapidité.

2.2.2 Manipulation, anesthésie, euthanasie et conservation des poissons

2.2.2.1 Généralités sur les manipulations

Pour le bien être des poissons et pour limiter leur stress, nous avons veillé à toujours les manipuler calmement et à limiter leur temps hors de l'eau. L'excitation prolongée d'un poisson peut l'amener à se blesser en se cognant contre les parois de l'aquarium, ou à sauter hors de son récipient, avec une chute qui peut être relativement importante comparativement à sa taille (*e.g.* chute d'une table) et qui, sans être systématiquement fatale, peut le blesser sévèrement (hémorragie, fracture...).
Avant une expérience impliquant une manipulation importante (photos, anesthésie...), les épinoches sont mises à jeun pendant 24 h afin de limiter le stress (Farbridge et Leatherland, 1992). De plus, lors du changement d'aquarium pouvant intervenir au début d'une expérience (transfert des poissons depuis l'élevage jusqu'aux aquariums expérimentaux), les paramètres physico-chimiques de l'eau sont mesurés pour ne pas provoquer de choc. Pour ce faire, le plus souvent possible, la même eau était utilisée, dans le cas ou cette solution n'était pas réalisable, les poissons étaient placés dans un bain marie. Concernant le transfert des poissons, comme la pêche augmente le stress des poissons (Bau et Parent, 2000), elles sont limitées au maximum en privilégiant le transvasement d'un bac à un autre. A défaut, une épuisette est utilisée avec un réservoir pour que le poisson reste toujours dans l'eau.

2.2.2.2 Anesthésie

Parmi tous les anesthésiants possibles pour le poisson, le choix du produit s'est porté sur le méthane sulfonate de tricaïne (MS 222) du fait de son usage fréquent et connu pour anesthésier l'épinoche (Aguirre, 2009; Santos *et al.*, 2013; Wootton, 1984).

TABLEAU 2.1 – Les différents stades de l'anesthésie.

Stades	Descriptions
Normal	Réagit aux stimuli, rythme operculaire et tonus musculaire normaux.
Légère sédation	Légère perte de réactivité aux stimuli externes à l'exception d'une forte pression ; réagit uniquement aux forts stimuli tactiles et vibratiles.
Forte sédation	Perte totale de réactivité aux stimuli externes à l'exception d'une forte pression ; Légère diminution du taux operculaire ; équilibre normal.
Perte partielle d'équilibre	Perte partielle du tonus musculaire ; nage erratique ; augmentation du taux operculaire ; réagit uniquement aux forts stimuli tactiles et vibratiles.
Perte totale d'équilibre	Perte totale du tonus musculaire et de l'équilibre ; taux operculaire faible mais régulier ; perte des réflexes spinaux.
Perte des réflexes	Perte totale de réactivité ; mouvements operculaires lents et irréguliers ; rythme cardiaque très lent ; pertes de tous les réflexes.
Asphyxie	Arrêt du mouvement operculaire ; rapidement suivi d'un arrêt cardiaque (en général).

Des tests ont été effectués à des concentrations de MS 222 de 50, 60, 70, 80 et 100 mg/L. La température de l'eau était de 15 °C. Les stades de l'anesthésie vont du stade "normal" au stade "asphyxie" (Tableau 2.1). Nous avons considéré que l'anesthésie devait conduire à la perte totale d'équilibre du poisson. Les résultats pour atteindre ce stade sont recensés dans le tableau 2.2. Nous avons considéré que la meilleure concentration pour anesthésier les poissons avec du MS 222 était 70 mg/L car elle permettait de les anesthésier, puis de les réveiller dans un temps rapide sans risquer de les tuer. La même concentration a d'ailleurs été utilisée par Santos *et al.* (2013).

2.2.2.3 Euthanasie

Les méthodes utilisables sont : la surdose d'anesthésique, l'hémorragie cérébrale (provoqué par un coup sur la tête) suivi de la décapitation, la section de la moelle épinière ou la décapitation (Brian *et al.*, 2006; Sokolowska et Kulczykowska, 2009). Dans le cas de cette thèse, nous avons procédé soit à une décapitation, soit à une surdose d'anesthésique (lorsqu'il fallait conserver les poissons). La décapitation est une méthode simple, rapide et efficace (ne nécessite pas une préparation de solution de MS 222).

TABLEAU 2.2 – Les conditions d'anesthésie testées.

Concentrations (mg/L)	Nombre d'individus	Sédation	Réveil	Nombre de morts
50	5	$>$ 6 min	-	0
60	5	$>$ 6 min	-	0
70	5	1 à 2 min	1 à 2 min	0
80	5	1 min	1 min	0
100	8	$>$ 40 sec	-	2

2.2.2.4 Conservation

Lorsque les épinoches ne peuvent pas être traitées immédiatement (*e.g.* lors de la récupération en fin d'expérience en mésocosme), il convient de les stocker. Trois méthodes peuvent être envisagées pour conserver les tissus : la congélation, la conservation dans l'éthanol, la conservation dans le formaldéhyde (noté formol). La congélation n'était pas pratique en raison d'un manque de place et d'une difficulté d'organisation pour le traitement des poissons décongélation un poisson par un poisson. La conservation dans l'éthanol a été proscrite car elle ne permet pas d'utiliser les tissus pour des coupes histologiques. Par conséquent, la méthode de la conservation dans le formol a été retenue. Cette méthode possède certains désagréments tels que la restriction faite pour les analyses éventuelles des tissus (analyses moléculaires proscrites par exemple), mais également la nécessité d'une protection adaptée pour les opérateurs et enfin la gestion du produit ainsi que son élimination. Enfin, le formol peut altérer la forme et les dimensions de l'épinoche. C'est pourquoi nous avons étudié la modification de la masse et de la taille dans le formol à 4%, en fonction de la durée de conservation des épinoches dans le formol.

a- <u>Effet du formol sur la masse et la taille standard</u>

Des expériences ont permis de mettre en relation la taille standard avant et après conservation (de plus d'une journée) dans le formol, ainsi que la relation entre la masse avant et après conservation dans le formol (Eq. 2 - 1). Les valeurs des coefficients de

détermination de la relation entre les mesures avant et après conservation dans le formol sont de 0,9964 et 0,9996, respectivement pour la taille standard et la masse (Fig. A - 2).

$$\begin{cases} Ls_{Frai} = \alpha_{Ls} \times Ls_{Formol} + \beta_{Ls} \\ M_{Frai} = \alpha_{masse} \times M_{Formol} + \beta_{masse} \end{cases} \quad \text{(Eq. 2 - 1)}$$

Dans l'équation Eq. 2 - 1, α_{Ls} est égal à 0.97 ± 0.01, α_{masse} est égal à 1.1 ± 0.005, β_{Ls} est égal à -0.087 ± 0.4, β_{masse} est égal à -3.8 ± 2.6.

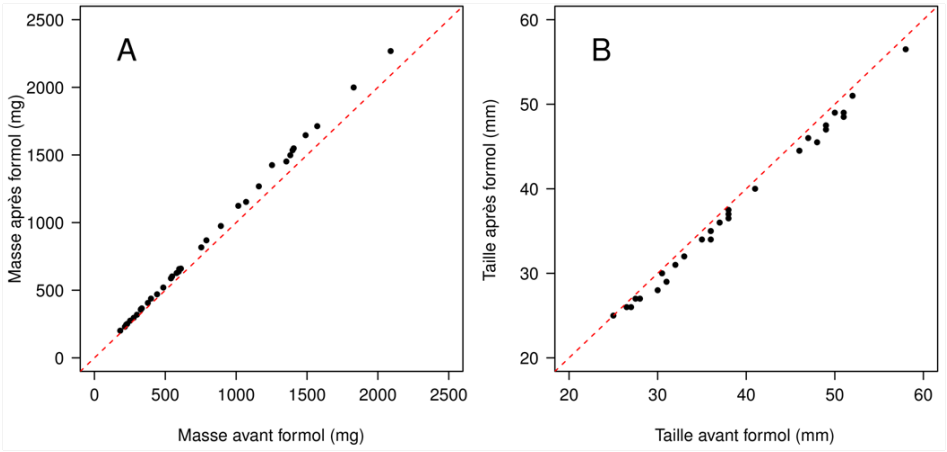

FIGURE 2.2 – Effet du formol sur la masse (A) et sur la taille (B) des épinoches. La droite en pointillés est la droite de pente = 1 et d'ordonnée à l'origine nulle.

Lors des expériences réalisées, les relations sont les mêmes au bout de 6 jours dans le formol ou au bout de 24 jours.

b- Protocole de mesure après formol, de la masse et de la taille standard

Afin d'effectuer des mesures de pesées des épinoches conservés dans le formol et d'estimer leur masse fraîche, il faut égoutter le poisson, puis le sécher entre deux feuilles de papier essuie-tout, et attendre au minimum 5 minutes entre la sortie du formol et la mesure (évaporation du formol). Si le temps d'attente n'est pas respecté, les mesures sont biaisées car la masse n'est pas stabilisée en raison de l'évaporation du formol (Données

non présentées). En revanche, dans le cas ou les poissons restent trop longtemps à l'air libre (30 à 40 minutes), ils se dessèchent. La mesure de la masse est donc mauvaise et conduira à une mauvaise estimation de la masse fraîche de l'individu
En revanche, les mesures de la taille standard peuvent être faites immédiatement après la sortie car le temps de séchage des épinoches sortant du formol n'influe pas sur la taille standard mesurée.

2.2.3 Nourrissage des poissons en conditions de laboratoire

2.2.3.1 Poissons de moins de 15 mm

Les poissons mesurant moins de 15 mm sont nourris avec des nauplii d'*Artemia* fraîchement écloses. Pour produire ces nauplii d'*Artemia*, le protocole ci-dessous a été utilisé. Dans un litre d'eau du réseau, il faut introduire 32 g / L de sel nutritif pour *Artemia*. La solution obtenue est placée dans une ampoule à décanter (Fig. 2.3). Le taux d'éclosion maximal est obtenu lors de l'ajout de 3 g de kystes d'*Artemia* par litre d'eau salée au maximum (Données non présentées). L'ampoule est oxygénée en continue en plaçant le diffuseur d'air dans le bas de l'ampoule à décanter (Fig. 2.3) et éclairée de façon à obtenir le maximum de lumière (permet un bon développement des algues nutritives contenues dans le sel pour *Artemia* utilisé pour l'éclosion des kystes). L'éclosion des nauplii d'*Artemia* sp. survient au bout de 24 h. Pour récupérer les nauplii d'*Artemia* sp., il faut arrêter l'oxygénation. Après quelques minutes, les kystes vides remontent en surface alors que les nauplii d'*Artemia* sp. et les kystes non éclos décantent doucement. Il est alors possible de soutirer les nauplii d'*Artemia* sp. dans un erlenmeyer. Pour séparer les nauplii d'*Artemia* sp. des kystes non éclos, il faut laisser à nouveau la solution se décanter pendant quelques minutes. Les kystes tombent alors au fond alors que les nauplii d'*Artemia* sp. se concentrent dans la zone basse sans se poser sur le fond. Le contenu de l'erlemeyer est ensuite versé sur un petit tamis très fin maintenu dans un peu d'eau, permettant d'obtenir des nauplii d'*Artemia* sp. semi-égouttées. La masse fraîche des nauplii d'*Artemia* sp. semi-égouttées est proportionnelle au volume de nauplii d'*Artemia* sp. avec un facteur multiplicatif de 811,82 (r^2 = 0,996, Beaudouin (2007)).

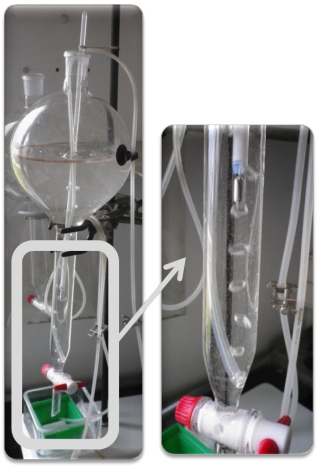

FIGURE 2.3 – Photographie de l'installation de production de nauplii d'*Artemia* sp.

2.2.3.2 Poissons de plus de 15 mm

Les poissons ayant une taille standard supérieure à 15 mm ont une bouche suffisamment grande pour pouvoir manger des chironomes congelés. C'est l'alimentation qui leur est donnée lors de leur stabulation ou des expériences diverses. Afin de connaître précisément la quantité de nourriture donnée, quelques expériences ont été menées pour caractériser les relations entre la masse de chironomes sous différentes états (congelés, décongelés, déshydratés).

a- Relation entre la masse congelée et décongelée de *Chironomus* sp.

Les chironomes sortis du congélateur sont immédiatement pesés. Ils sont ensuite mis à décongeler dans des béchers d'eau (environ 5 min à température ambiante). Les chironomes décongelés sont passés sur un filtre de diamètre 45 μm pesé humide préalablement. Après filtration, la masse [filtre + chironomes décongelés] est obtenue.
Nous avons trouvé une relation affine entre la masse de chironomes congelés et décongelés après filtration (Fig. A - 1 A, Annexe A, page 284 et Eq. 2 - 2).

$$M_{Décongelé} = \alpha \times M_{Congelé} + \beta \qquad \text{(Eq. 2 - 2)}$$

Dans l'Eq. 2 - 2, $M_{Décongelé}$ est la masse de chironomes décongelés (mg) et $M_{Congelé}$ est la

masse de chironomes congelés (mg).(r^2 = 0,9834). La valeur de α est égale a 2,07 ± 0.05 et la valeur de β est égale a -155 ± 82,5 (coefficients statistiquement différent de 0).

b- Relation entre la masse décongelée et déshydratée de *Chironomus* sp.

Pour établir une relation entre la masse décongelée et déshydratée de *Chironomus* sp., la masse déshydratée des chironomes a été mesurée selon deux conditions. Un premier lot était déshydraté immédiatement après décongélation et l'autre au bout de 24 heures (après une journée dans l'eau à température ambiante). La déshydratation est obtenue en plaçant les chironomes 24 heures à l'étuve à 105 °C.
Selon le temps laissé dans l'eau, les chironomes perdent de la masse lors de la déshydratation (Fig. A - 1 B, Annexe A, page 284). La relation entre la masse de chironomes décongelés et la masse de chironomes déshydratés est représentée par une fonction affine (Eq. 2 - 3).

$$M_{Déshydratée} = \alpha \times M_{Décongelé} + \beta \times t \qquad \text{(Eq. 2 - 3)}$$

Dans l'Eq. 2 - 3, $M_{Déshydratée}$ est la masse de chironomes déshydratés (mg), $M_{Décongelé}$ est la masse de chironomes décongelés (mg) et t le temps (heure) pendant lequel les chironomes sont restés dans l'eau avant la déshydratation. La valeur de la pente α est 0.192 ± 0.003 et celle de l'ordonnée à l'origine β est -2.69 ± 0.23.

2.2.4 Sexage

2.2.4.1 Poissons vivants

Lors de la période de reproduction, la distinction entre les mâles et les femelles est aisée en se basant sur les caractères sexuels secondaires. En effet, les femelles (Fig. 2.4 A) présentent un ventre arrondi alors que les mâles présentent une gorge rouge et des yeux bleus (Fig. 2.4 C). Cependant, en dehors de la période de reproduction, la distinction est impossible (Fig. 2.4 B et D).

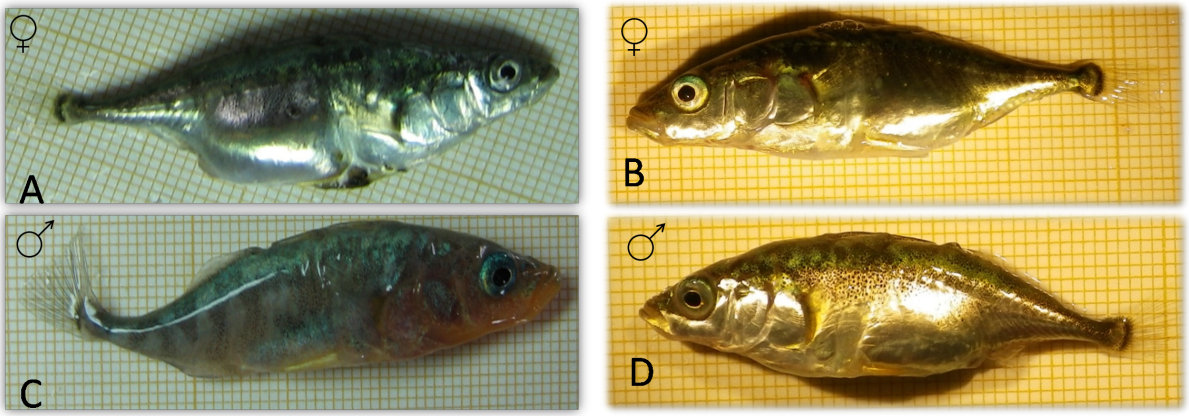

FIGURE 2.4 – Photographie d'une femelle(A) et d'un mâle (C) pendant la période de reproduction et d'une femelle (B) et d'un mâle (D) hors de la période de reproduction.

Une des méthodes utilisées pour sexer les individus est le déclenchement des caractères sexuels secondaire par des conditions thermique et photopériodique artificielles. Cependant, l'appréciation est laissée à l'expérimentateur. La détermination du sexe est faite de façon visuelle. Par conséquent, il peut y avoir des erreurs de commises. De plus, en raison de conditions artificielles proposées aux poissons, un stress peut survenir. Afin de limiter ces erreurs de sexage et ce stress, une méthode plus robuste a été proposée : l'utilisation d'un modèle mathématique, basé sur la morphologie céphalique. Ce modèle a été construit, calibré et validé pour déterminer le sexe selon 5 ratios de longueur. En fonction d'un risque accepté α, un pourcentage donné de poisson "sexable" avec un taux d'erreur admis est défini. Cette méthode est fiable, réplicable et applicable, quelle que soit la saison, pour les poissons issus de l'élevage de l'INERIS. A noter cependant que les paramètres du modèles sont dépendants des conditions d'élevage (*Cf.* Annexe E, page 293).
La méthode permet de discriminer trois groupes : les mâles, les femelles et les indéterminés.

2.2.4.2 Poissons morts

a- <u>Les différences entre les mâles et les femelles</u>

Les gonades se situent sous les viscères, dans la partie postérieure de la cavité abdominale. Lors de la dissection des individus, les mâles présentent des gonades plus petites et plus fines que les femelles (Fig. 2.5). Les gonades de mâles sont opaques et foncées alors que les gonades de femelles sont translucides et claires (Fig. 2.5) chez les épinoches sexuellement matures. Avec cette méthode, il est également possible, pour les mâles, de définir le stade de maturité.

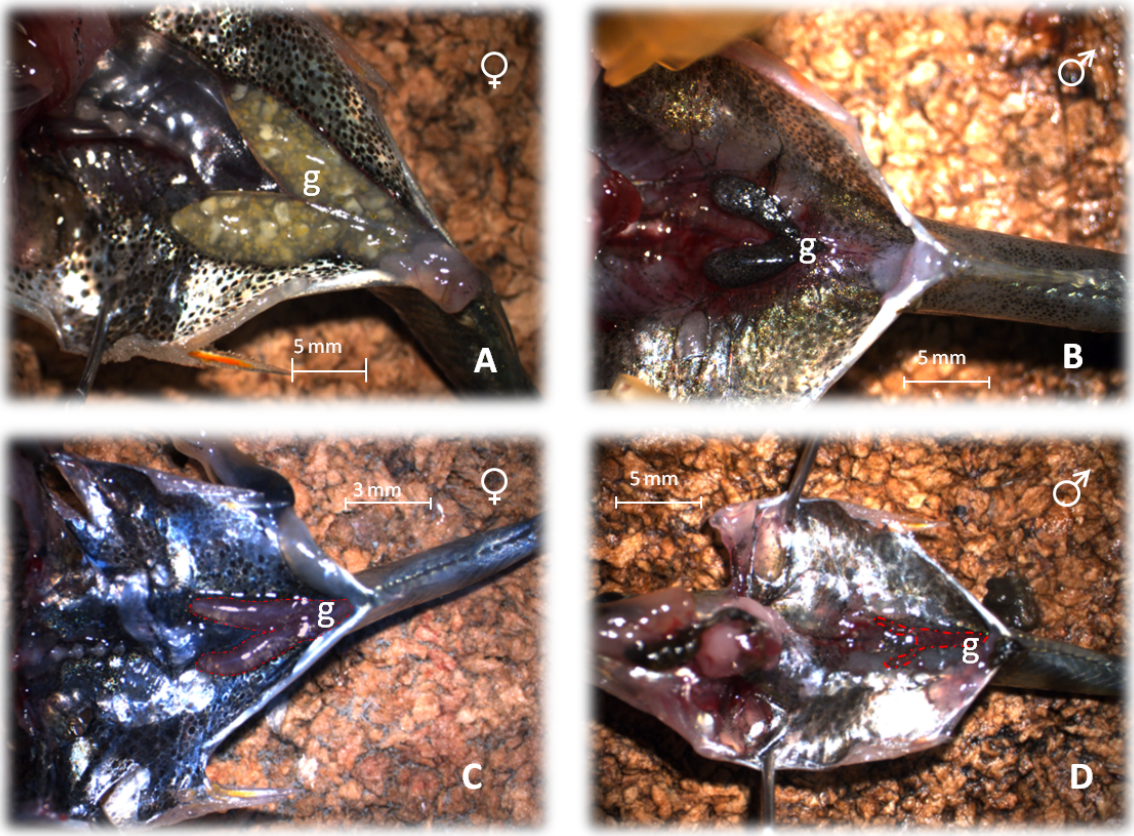

FIGURE 2.5 – Photographie de gonades de femelle mature sexuellement (A), de mâle mature sexuellement (B), de femelle immature (C) et de mâle immature (D) pendant la période de reproduction.
g. correspond aux gonades des individus.

b- Définition des stades de maturité

⇒ Les femelles

La distinction entre les femelles immatures (Fig. 2.6) et matures (Fig. 2.7) est difficile à réaliser. Aucune discrimination visuelle n'a pu aboutir à l'identification des stades de maturité chez la femelle mis-à-part la présence des ovocytes dans les gonades prouvant *de-facto* la maturité de la femelle observée.

⇒ Les mâles

La longueur des gonades est significativement différente selon les stades de maturité des mâles (ANOVA ; ddl résiduel = 43 ; $p < 0{,}001$, Fig. 2.8). Il en est de même pour la largeur maximale (ANOVA ; ddl résiduel = 43 ; $p < 0{,}001$, Fig. 2.8) des gonades. Ainsi, trois stades sont, *a priori*, identifiables par observations sous la loupe binoculaire.

- Les gonades des mâles immatures se caractérisent par une petite taille (Fig. 2.9). Elles sont translucides et difficiles à apercevoir car elles se confondent avec la muqueuse. Les gonades forment un long cylindre ayant un diamètre constant (moins d'un millimètre) sur l'ensemble de la longueur.
- Les gonades des mâles matures se caractérisent par une forme de massue, généralement opaque et noir avec des reflets de couleurs (Fig. 2.10). Les gonades sont formées de 2 parties : une première, très fine, permet à la gonade d'être attachée à la cavité intestinale. Fragile, blanche et translucide, cette partie peut représenter la moitié de la taille totale de la gonade. La seconde partie, noire (ou grise foncée et tachetée) et opaque est retournée sur elle-même. C'est cette partie qui contient les spermatozoïdes matures.
- Les gonades mâles en cours de maturation sont difficiles à décrire car c'est un stade intermédiaire. Généralement, les gonades s'allongent et deux parties se distinguent : la première est fine (et correspondra au filament) et la deuxième est plus large, mais pas encore recroquevillée sur elle même. Les gonades sont grises et se foncent en fonction du degré de maturation.



FIGURE 2.6 – Photographie de gonades de femelles immatures, *in situ* dans la cavité intestinale (gauche) et sous loupe binoculaire *ex-situ* (droite).

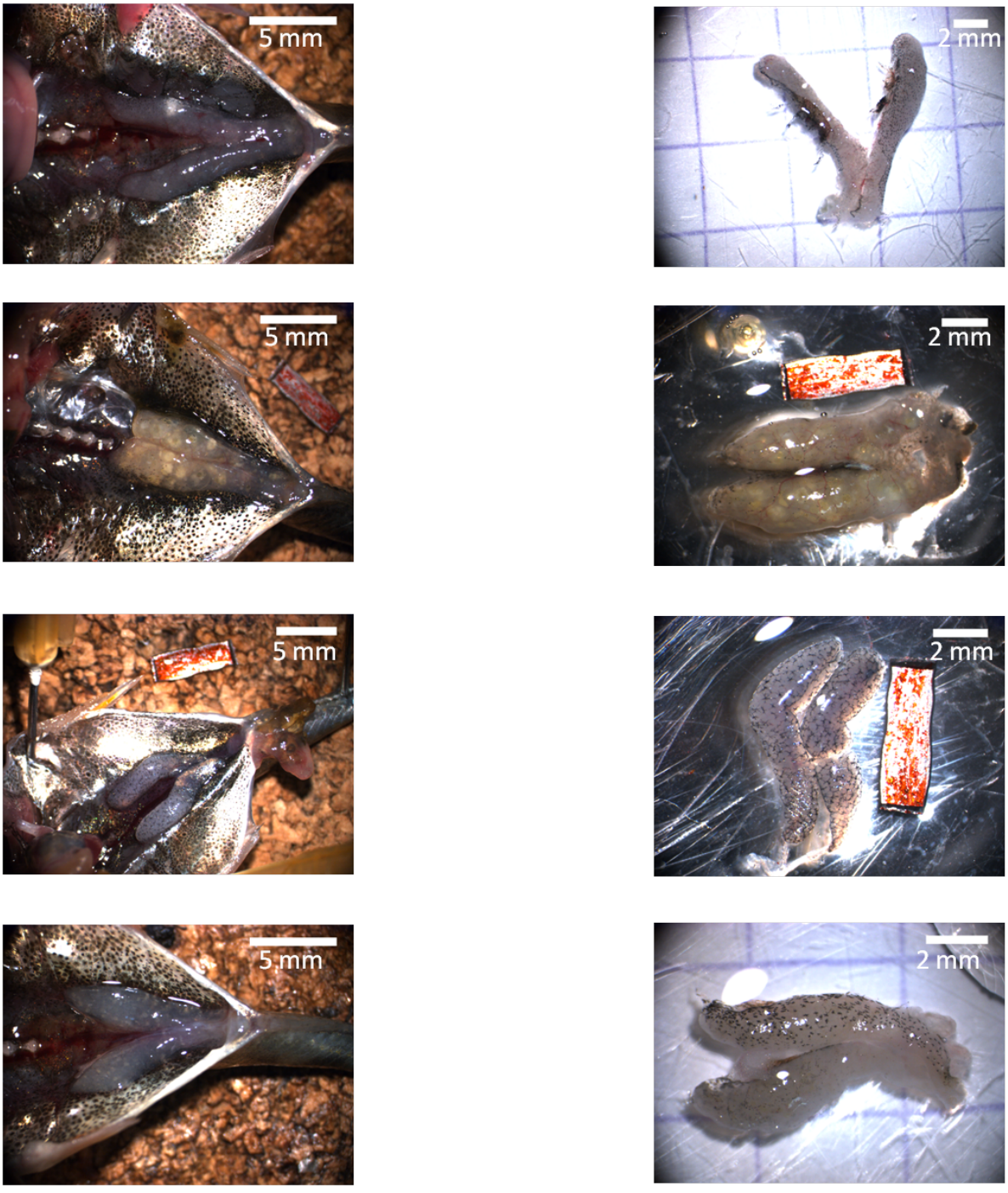

FIGURE 2.7 – Photographie de gonades femelles matures, *in situ* dans la cavité intestinale (gauche) et sous loupe binoculaire *ex-situ* (droite).

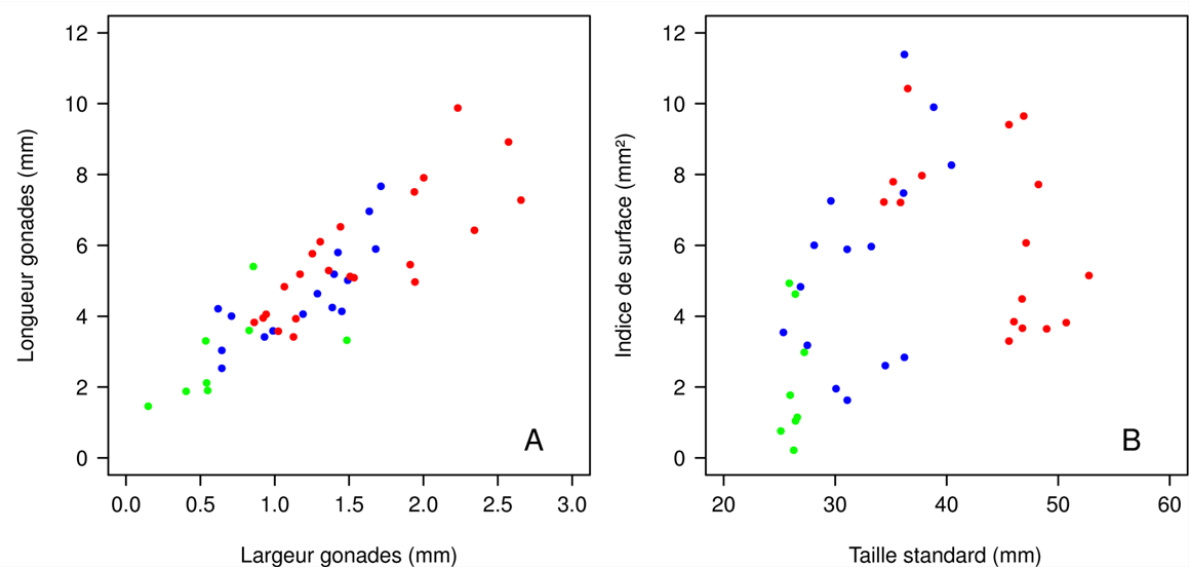

FIGURE 2.8 – Taille d'une gonade en fonction du stade de maturité du mâle : immatures (■) ; maturants (■) et matures (■).
A : Longueur de la gonade en fonction de sa largeur
B : Taille standard des mâles en fonction de l'indice de surface (longueur × largeur).

2.2.5 Récupération des ovocytes secondaires

2.2.5.1 Sélection de femelles prêtes à pondre

Pour sélectionner les femelles prêtes à pondre, le jour *n - 1*, toutes les femelles sont mises à la diète. Le lendemain, elles sont placées dans un récipient pour pouvoir être observée par dessus. Une femelle présentant un large ventre (Fig. 2.11) est pêchée et, sans la sortir de l'eau, est retournée délicatement pour observer ses papilles anales qui doivent être rosées et dilatées.

2.2.5.2 Récupération des ovocytes secondaires

Lorsqu'une femelle prête à pondre est sélectionnée, elle est anesthésiée (MS-222, 70 mg/L pendant 5 minutes) puis mesurée. Les ovocytes secondaires de la femelle sont ensuite collectés selon la méthode de "*stripping*" : le ventre de la femelle est délicatement pressé entre le pouce et le majeur en partant de la nageoire pectorale pour aller jusqu'à la queue. Si la femelle est prête à pondre, elle expulsera ses ovocytes secondaires. Dans ce cas, l'opération est renouvelée pour collecter l'intégralité des ovocytes secondaires prêts à être fécondés.

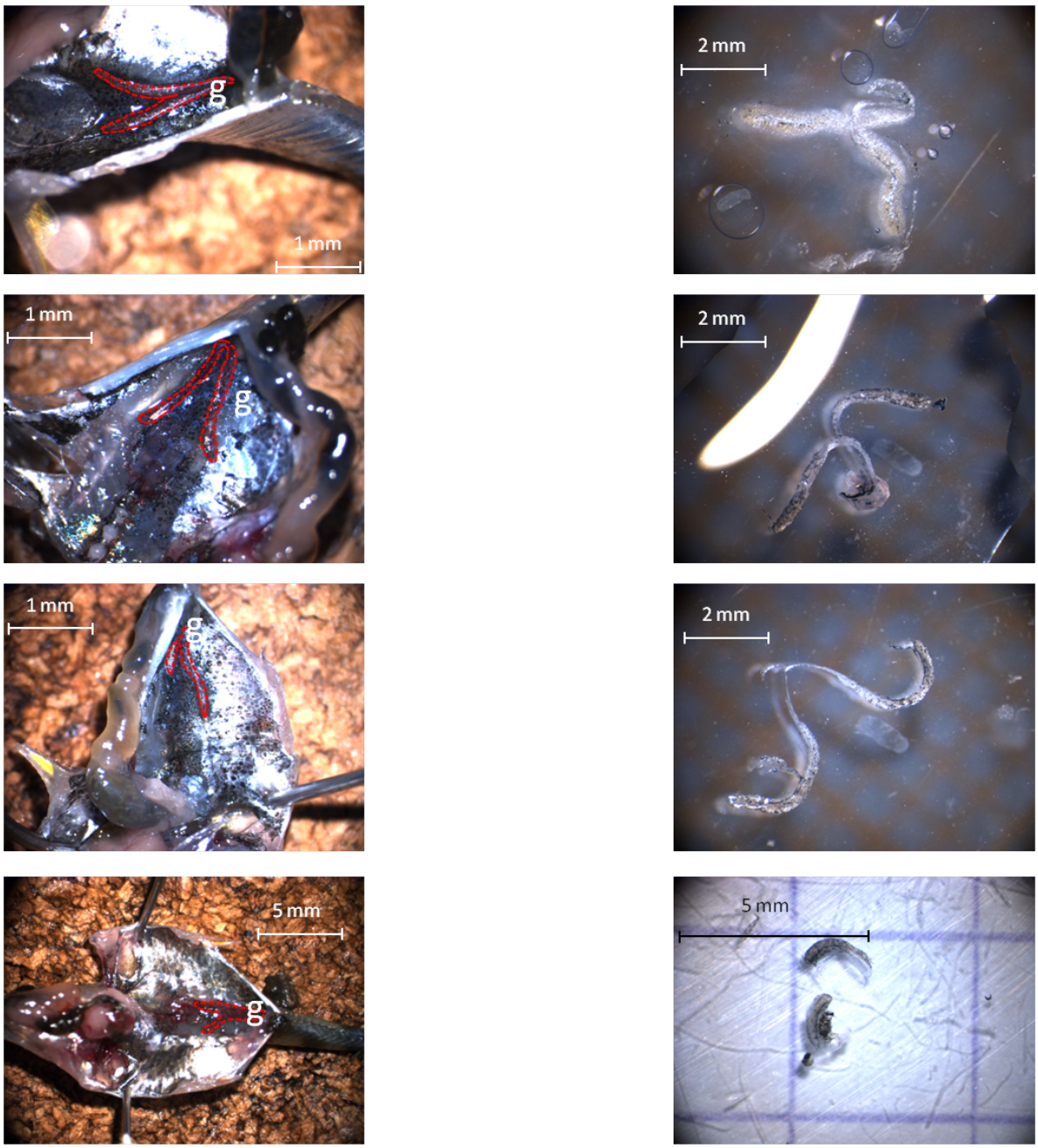

FIGURE 2.9 – Photographie de gonades mâle immatures, *in situ* dans la cavité intestinale (gauche et en rouge) et sous loupe binoculaire *ex-situ* (droite). *g.* correspond aux gonades des individus.

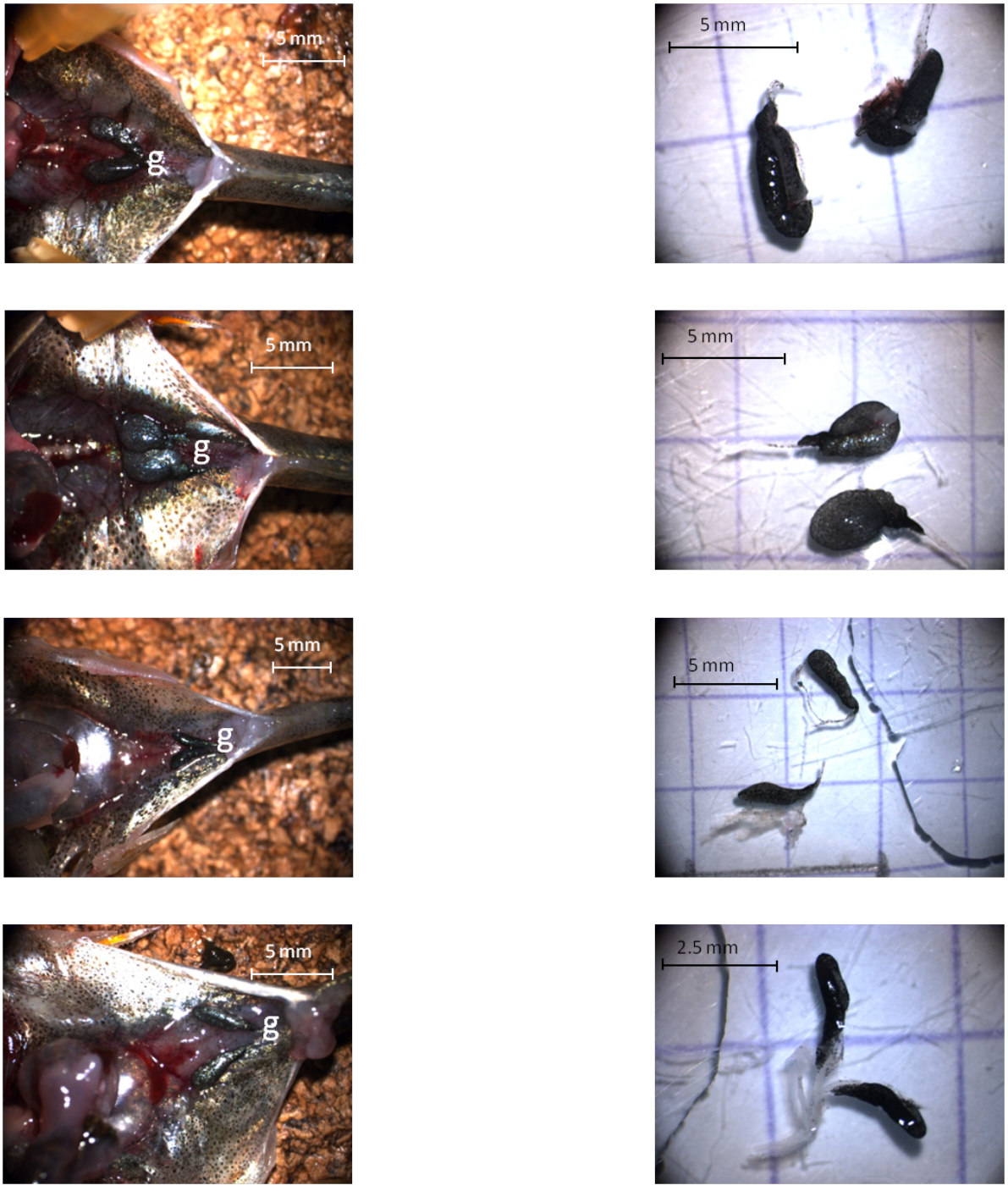

FIGURE 2.10 – Photographie de gonades mâle matures, *in situ* dans la cavité intestinale (gauche) et sous loupe binoculaire *ex-situ* (droite).
g. correspond aux gonades des individus.



FIGURE 2.11 – Femelle prête à être strippée.

Cette méthode est fiable et permet de récupérer l'intégralité des ovocytes secondaires (expériences préliminaires réalisées). La femelle est ensuite remise dans l'eau. Le réveil et la reprise totale de ses facultés natatoires et respiratoires sont attendus (quelques minutes) avant de replacer la femelle dans le bac de stockage dont elle est issue.

2.2.5.3 Comptage des ovocytes secondaires

Les ovocytes secondaires obtenus sont disposés dans une coupelle contenant une solution de NaCl à 0,7%. La solution saline va dissoudre le mucus qui maintient les œufs en grappe. Après 5 minutes dans la solution, la ponte est rincée pendant 2 minutes à l'eau du réseau, on sépare délicatement les ovocytes secondaires avec une pipette de 1 mL pour les disposer en mono-couche. Une photographie du récipient est prise. Le nombre d'ovocytes secondaires est ensuite dénombré sur la photographie à l'aide du logiciel ImageJ (Rasband, 2012). Cette méthode nous permet de diminuer très largement les erreurs de comptage par rapport à un dénombrement à l'œil nu ou sous loupe binoculaire, et permet également de revenir sur la photographie si besoin.

2.2.6 Obtention de juvéniles et synchronisation

Les juvéniles qui ont été utilisé pour les expériences provenaient d'ovocytes secondaires fécondés naturellement par les mâles lors d'expériences portant sur l'étude de la reproduction des mâles. Lors de l'éclosion des œufs, ces derniers étaient placés à 4 °C afin de ralentir leur développement et ainsi synchroniser tous les individus si le nombre d'alevins nécessaire n'était pas disponible. Une fois cette condition remplie, les œufs étaient placés dans un bécher contenant de l'eau à 17 °C dans laquelle un système d'oxygénation a

été installé. Quotidiennement, $\frac{2}{3}$ de l'eau était renouvelée et les œufs contaminés par des champignons étaient séparés des œufs sains pour limiter la prolifération de l'infection.

2.2.7 Marquage des poissons

2.2.7.1 Sous-cutané

Le marquage sous-cutané consiste à déposer un tag alphanumérique (VI Alpha Tags, Northwest Marine Technology, Shaw Island, WA, USA) sous la peau. Ces tags sont de petites plaques de dimensions 1,2 × 2,7 mm adaptées aux poissons (Andersen *et al.*, 2005; Lynch et Mensinger, 2011).

Pour les poser, il est nécessaire que les poissons soient anesthésiés (70 mg / L de MS-222 pendant 5 minutes Fig. 2.12 A). Les effets de l'anesthésie durent 1 à 2 minutes. Pendant ce temps, l'individu est pesé et mesuré. L'aiguille permettant l'introduction du tag est nettoyée dans de l'éthanol pour limiter les contaminations. Puis, elle est délicatement introduite sous la couche des plaques osseuses sans aller profondément afin d'éviter de blesser le poisson. Il est ensuite nécessaire de bien rentrer l'aiguille (1 à 2 mm) afin de déposer le tag le plus loin possible (Fig. 2.12 D) pour en limiter sa perte lorsque l'aiguille est ôtée (Fig. 2.12 E). Les tags retenus sont de couleur verte.

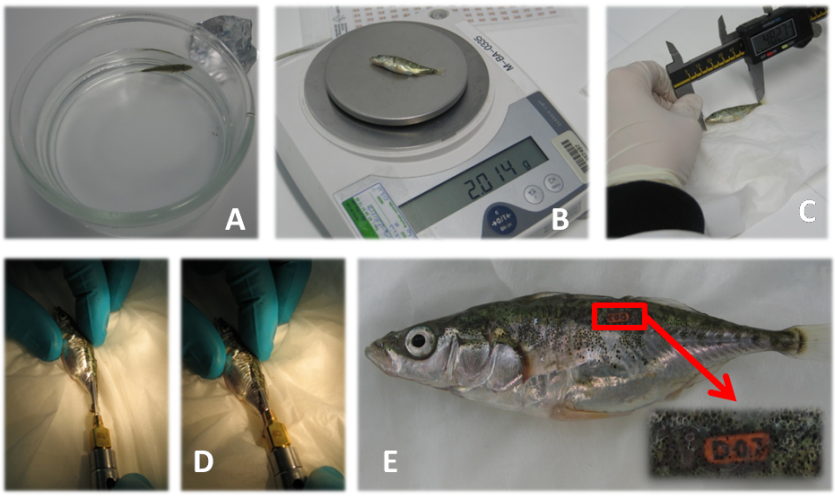

FIGURE 2.12 – Protocole de mise en place d'un tag sur un poisson.

2.2.7.2 Coloration par balnéation

Afin de marquer temporairement les poissons, ils sont placés pendant 40 minutes dans une solution de Brun de Brismark à 0,05 g/L, oxygénée en continue. Afin d'éviter de sortir les poissons de l'eau, les poissons sont transvasés avec 200 mL d'eau dans la solution de marquage. Lorsque l'étape de marquage est finie, les poissons sont récupérés par transvasement et le résidu de solution est dilué avec de l'eau claire (Fig. 2.13).

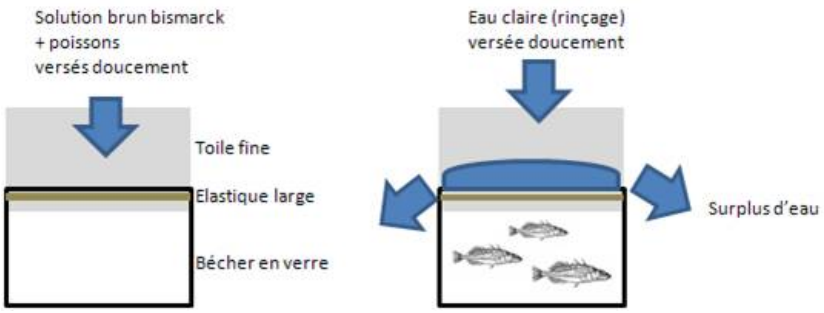

FIGURE 2.13 – Récupération des poissons après marquage.

Il n'y a pas de limitation de taille des individus pour ce marquage qui persiste 24 à 48 h selon les individus. Après coloration, les poissons prennent une teinte orangée, principalement marquée au niveau des nageoires pectorales et caudales (Fig. 2.14 C).

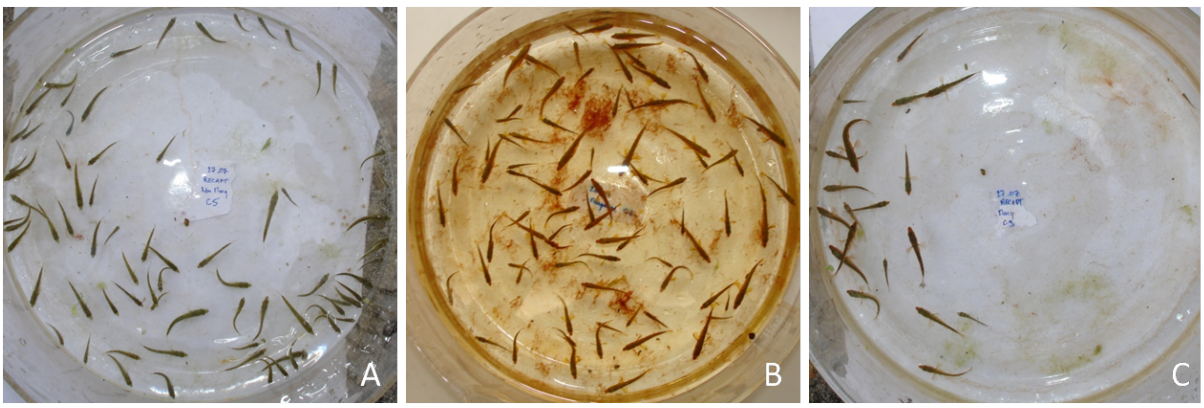

FIGURE 2.14 – Photographie des poissons avant la balnéation (A), après 40 minutes dans une solution de Brun de Brismark à 0,05 g/L (B) et 24 h après la balnéation (C).

2.3 Expériences en mésocosmes

Les mésocosmes de l'INERIS sont constitués de 12 canaux rectilignes de 10 m^3 mesurant 20 m de long, 1 m de large et profond de 30 à 70 cm d'eau (Fig. 2.15). Chaque canal possède ainsi une zone amont peu profonde, dans lequel l'écoulement de l'eau est plus rapide que dans la zone aval plus profonde. Les deux parties sont composées de sédiment artificiel. Entre ces deux parties se situe une pente dont le fond est tapissé de pierres. L'eau alimentant les canaux provient du réseau d'eau potable. Cette eau est dénitrifiée avant sa distribution. Cette dernière est assurée *via* un système en flux ouvert, à un débit de 0,8 m^3/h (renouvellement complet en 12,5 heures ; vélocité du courant égale à 1,6 m/h soit moins de 0,5 mm/s). Un bac de mélange est présent en amont de chaque canal. Il a pour but, d'une part, d'oxygéner l'eau avant son arrivée dans le canal, et d'autre part, d'homogénéiser la solution de polluant dans le cas d'une contamination. Un système de déversoir et de bac de récupération permettent d'évacuer le surplus d'eau des canaux tout en conservant les organismes vivants. Pendant l'expérience le bac de récupération est entretenu quotidiennement. Chaque matin, les juvéniles récupérés dans le bac sont dénombrés, puis relâchés dans le mésocosme (de façon homogène sur la longueur) et la nasse est rincée pour limiter le colmatage par les algues.

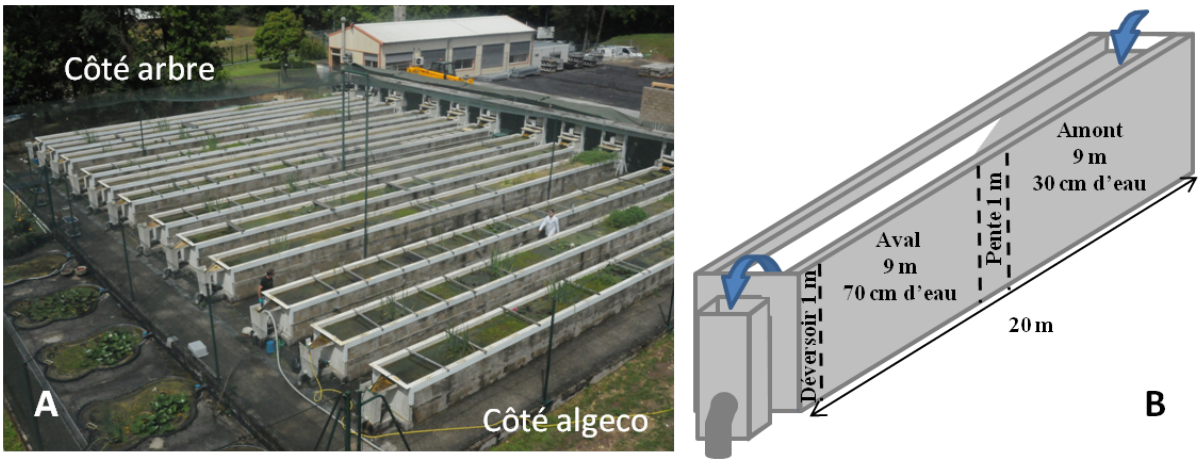

FIGURE 2.15 – Plate-forme canaux de l'INERIS.
A : Photographie de la plate-forme ; B : Représentation schématique d'un canal

2.3.1 Mise en place des systèmes

Cette phase a pour but d'établir un écosystème simplifié propice au bon développement de l'épinoche. Elle dure trois mois et demi environ. Concernant la composition des communautés initiales (abondance des espèces, tailles des individus introduits...), elles doivent être proches entre les canaux et permettre à l'épinoche de réaliser son cycle de vie dans de bonnes conditions.

2.3.1.1 Protection des canaux

Les résines et les matériaux poreux sont connus pour adsorber les molécules organiques (*e.g.* les pesticides, Kyriakopoulos *et al.* 2005). Le BPA, testé dans les canaux, peut se retrouver à l'origine de la fabrication de certaines résines en polymères époxydes (aussi appelées "résines époxy"), voire même, dans certains cas, les résines peuvent être des catalyseurs de la réaction de production de BPA (Kawase *et al.*, 1999). C'est pourquoi, une bâche de protection a été installée.
L'installation de cette bâche répondait à trois objectifs : le premier était d'éviter la contamination des résines par le BPA, la seconde de garantir son étanchéité vis-à-vis des autres substances contenues dans les résines et la troisième d'être neutre pour ne pas relarguer d'autres molécules dans l'eau. Afin de satisfaire ces exigences, le choix du matériau s'est porté sur le polyéthylène, car il a un pouvoir d'étanchéité important, conduisant les industriels (agro-alimentaires, BTP...) à l'utiliser pour créer une barrière étanche entre les contenants (boîtes métalliques, bouteilles plastiques, gaines...) et les contenus (aliments, eau, air...).
Cette bâche fut posée pour la première fois en octobre 2011, juste avant la contamination par le BPA. Avant, la résine des canaux n'était pas protégée et à pu être contaminée.

Les canaux sont protégés avec une bâche en polyéthylène de 100 μm d'épaisseur. Lors de son installation, il est très important de veiller à ne pas la percer mais également de bien la plier pour ne pas créer de poche d'eau qui casserait la dynamique de l'eau dans le canal et augmenterait la surface du canal, modifiant ainsi la surface de colonisation disponible.
Tout d'abord la bâche est déroulée et coupée à 25 m de long. Ensuite, elle est dépliée sur

le canal, en la mettant en contact avec le fond du canal dans le sens amont - aval. Dès que la bâche est plaquée contre les parois, du sédiment est placé pour la maintenir (un coté puis l'autre Fig. 2.16 A). A l'approche de la pente, la bâche est plaquée contre le fond, jusqu'à revenir au niveau de la partie aval. Les corrections de dénivelés seront ajustées par la suite, grâce à des pliages (Fig. 2.16 B, C, D et E). Enfin, la partie aval est couverte à son tour. Pour ce faire, le protocole de pose est le même que celui pratiqué pour la partie amont. Lorsque tout le canal est recouvert par la bâche, il faut ajuster la pose dans les coins et les extrémités. Il est nécessaire de bien suivre la forme du canal et faire des plis simples (Fig. 2.16 F, G, H et I) et identiques entre les canaux.



FIGURE 2.16 – Mise en place de la bâche de polyéthylène dans les canaux.

2.3.1.2 Le sédiment

Le sédiment est un point important pour le bon déroulement de l'expérience car, pour se reproduire, les mâles construisent des nids sur le sédiment (Mori, 1993, 1994; Wootton, 1984). Le sédiment choisi est artificiel afin de pouvoir reproduire plus facilement les conditions entre les canaux et entre les années, notamment en termes de physico-chimie (Caquet *et al.*, 2000). Cependant, l'inconvénient d'une telle décision est qu'elle ôte le caractère naturel d'un sédiment issu d'un site propice au développement de l'épinoche.

En accord avec les informations de Mori (1994), le sédiment est un mélange de 80 %

de sable et de 20 % d'argile. Cette proportion a été choisie afin que le milieu soit favorable à la reproduction de l'épinoche (Mori, 1994) car il permet de reconstitué un substrat sur lequel les épinoches se reproduisent préférentiellement. Il est réparti uniformément sur 5 cm et 10 cm d'épaisseur, respectivement en amont et en aval (Fig. 2.17). Au niveau de la pente (entre la partie amont et aval) et de la sortie du canal (vanne de vidange) des pierres sont placées (Fig. 2.17).



FIGURE 2.17 – Mise en place du sédiment dans les canaux.

2.3.1.3 Les pierres

Dans la pente et 1,5 m avant la sortie des canaux, des pierres sont installées. Elles ont pour but de limiter la dérive du sédiment provoqué par le courant d'eau. La conséquence de l'introduction des pierres est qu'elles ajoutent un nouveau biotope dans lequel, les communautés colonisatrices seront différentes de celles rencontrées sur le sédiment (Downes *et al.*, 1993).

2.3.1.4 Le peuplement végétal : habitat de l'épinoche

a- Les macrophytes

Le peuplement végétal initial doit permettre à l'épinoche de réaliser son cycle de vie dans de bonnes conditions (construction du nid, nourriture), mais doit être assez simple pour être reproduit à l'identique entre les canaux. Par ailleurs, l'introduction des macrophytes doit être faite en évitant l'introduction involontaire d'espèces animales (œufs de

poissons et invertébrés) comme l'ont relevé Roussel *et al.* (2007b).

Les macrophytes sont des composants majeurs des écosystèmes aquatiques peu profonds (Walker *et al.*, 2013) et ils jouent un rôle physique important (Wilcock *et al.*, 1999). Ils constituent une source de nourriture (Newman, 1991; Walker *et al.*, 2013), de dissimulation (Bell et Foster, 1994) et de supports physiques pour la reproduction (Jones *et al.*, 1999) à de nombreuses espèces, dont l'épinoche et certains macro-invertébrés.

Trois espèces de macrophytes sont plantées dans les canaux : la Callitriche (*Callitriche platycarpa*), le Cresson de Fontaines (*Nasturtium officinale*) et le Myriophylle (*Myriophyllum aquaticum*).

A chaque ré-aménagement, les plans de macrophytes sont entièrement renouvelés. Leur provenance et leur quantité sont référencées dans le tableau 2.3.

TABLEAU 2.3 – Origine et quantité introduites de macrophytes dans chaque canal.

Espèce	**Origine**	**Quantité**
Nasturtium officinale	Cressonière de Bazincourt	4.72 **kg** 2×800 g mh (jardinières) 39×80 g mh (plans)
Callitriche platycarpa	L'aronde à Gournay sur Aronde	2.4 **kg** 3×600 g mh (jardinières) 8×75 g m h (plans)
Myriophyllum aquaticum	Bassins noirs de l'INERIS	2×800 g mh (jardinières)

(mh) : *Masse humide*

Lors de la plantation, 5 litres de terreau universel sont ajoutés dans chaque jardinière pour introduire de la matière organique dans le milieu afin de favoriser le développement des végétaux au début de l'expérience.

Les végétaux sont frais (moins d'une semaine entre le prélèvement et la plantation). Pour leur conservation, ils sont laissés immergés. Afin de favoriser leur développement, les pots de Myriophylle sont préparés en août. En revanche, le Cresson des fontaines et la Callitriche sont traités juste avant leur installation dans les canaux. A chaque aménagement des canaux, les végétaux sont nettoyés au jet d'eau afin de limiter l'introduction d'espèces non souhaités (*e.g.* Mousse de java et Elodée du Canada, œufs d'invertébrés...) mais aussi d'apports de matières (*e.g.* feuilles, glands...).

L'agencement et la disposition des végétaux sont clairement définis. (Fig.2.18). Les jardinières (6 L) sont posées de façon à ce que les rebords reposent sur le sédiment (le fond de la jardinière est enfoncée dans le sédiment). Dans la partie amont, le patron de base (sur 1 m^2) est de la forme 2 - 1 - 2 - 1 - 2 (Fig. 2.19). Dans la partie aval, 4 pieds ont été sortis des jardinières. Ces pieds ne sont pas pesés.

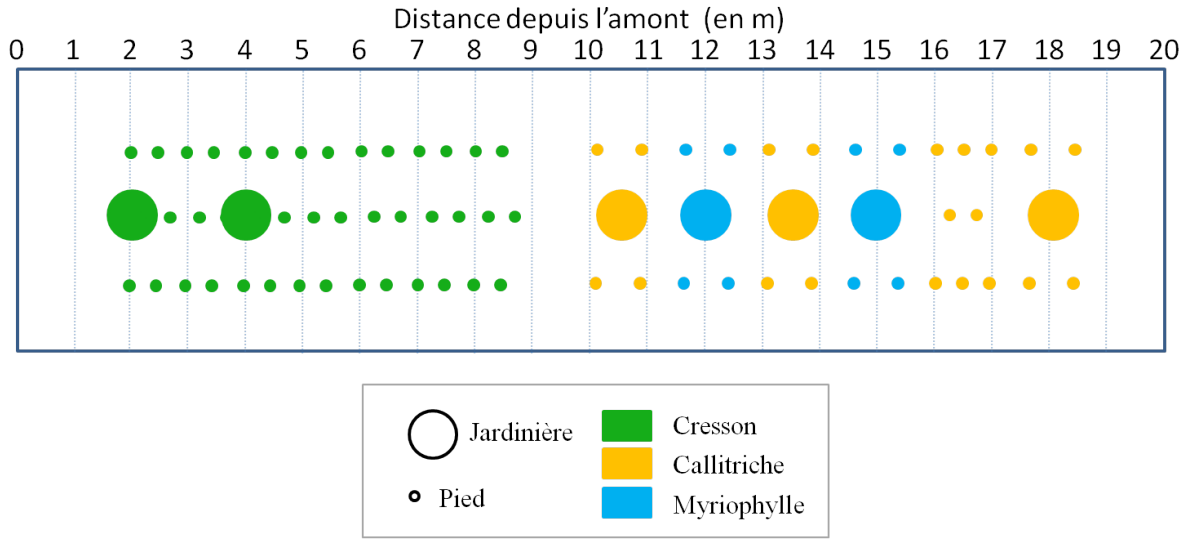

FIGURE 2.18 – Plan d'introduction des végétaux dans un canal.

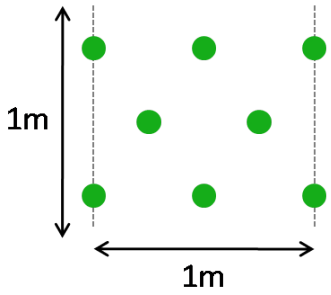

FIGURE 2.19 – Patron de base (sur 1 m^2).

Cette implantation n'a été établie qu'à partir de l'expérience 2011, car la première expérience en conditions témoins (2010) a révélé que le développement des macrophytes n'était pas homogène entre les conditions. Le détail de la méthode précédente et ces inconvénients sont présenté en annexe (Annexe B p. 287).

b- Le périphyton

Le périphyton se développe naturellement dans les canaux à partir des espèces introduites avec les macrophytes. Le périphyton est une communauté définie comme un complexe d'algues unicellulaires, de bactéries, de champignons, de détritus organiques et inorganiques attachés sur un substrat organique ou inorganique, mort ou vivant. Les algues du périphyton représentent la plus importante contribution à la production primaire des eaux courantes et sont le facteur limitant le plus important pour la production d'insectes benthiques et de poissons. Les épinoches au stade juvénile se nourrissent de ces algues benthiques.

2.3.1.5 Les proies et les prédateurs de l'épinoche

Les consommateurs primaires, secondaires et les décomposeurs constituent les proies des épinoches. Selon les stades, les consommateurs primaires peuvent également s'avérer être des prédateurs (*e.g.* les sangsues dans les nids).

Les espèces de proies de l'épinoche choisies pour peupler les canaux appartiennent à des classes phylogénétiques classiquement introduites lors d'expériences conduites en mésocosmes : crustacés (van den Brink et Ter Braak, 1999), oligochètes (Belanger *et al.*, 1995; Caquet *et al.*, 2007; van den Brink et Ter Braak, 1999), éphéméroptères (Belanger *et al.*, 1995), mollusques (Caquet *et al.*, 2007, 2001), Lymnaeidae (Caquet *et al.*, 2007). Les espèces choisies sont citées dans les études (Tableau 2.4).

Chaque année la difficulté principale est de trouver les espèces de proies et de prédateurs dans le milieu naturel. Par conséquent, les origines des espèces ne sont pas les mêmes. En outre, la difficulté est réelle pour obtenir suffisamment d'individus lors d'une seule sortie sur un site. Dans certains cas, pour obtenir les effectifs suffisant, différents sites doivent être prospectés au cours de l'aménagement pour une même espèce. Afin de maintenir une répétabilité, les individus provenant d'un même site sont répartis de manière identique dans tous les canaux. Les sites étant différents et le nombre d'individus issus d'un même site étant différent entre les années, une variabilité inter-annuelle est introduite. Ces multiples campagnes de récupération des effectifs induisent également une perte de temps par les allers et venues entre les sites de prospection et l'Ineris.

TABLEAU 2.4 – Liste des espèces introduites dans nos systèmes, qui ont été utilisées dans d'autres études en mésocosme.

Espèces	Référence
Gammarus pulex	Roussel (2005); van den Brink et Ter Braak (1999)
Asellus aquaticus	Caquet *et al.* (2007); Roussel (2005); van den Brink et Ter Braak (1999)
Radix peregra	Roussel (2005); van den Brink et Ter Braak (1999)
Potamopyrgus antipodarum	van den Brink et Ter Braak (1999)
Planorbis carinatu	Belanger *et al.* (1995)
Glossiphonia complanata	Caquet *et al.* (2001); Roussel (2005)
Erpobdella octoculat	Roussel (2005); van den Brink et Ter Braak (1999)
Dugesia	Caquet *et al.* (2007)
Sympetrum sp.	Caquet *et al.* (2007)
Baetis	Belanger *et al.* (1995); Caquet *et al.* (2007, 2001)
Chironomini & Endopterygota (Nymphes)	Caquet *et al.* (2007, 2001); Roussel (2005)
Orthocladiinae	Caquet *et al.* (2007, 2001); Roussel (2005)
Limnephilidae	Caquet *et al.* (2007)

Une voie d'amélioration possible, qui n'a pas pu être mise en œuvre durant cette thèse, serait de réussir à maintenir les macro-invertébrés dans des bacs, entre la récupération des populations de poissons de l'expérience *N-1* et l'aménagement des canaux pour l'expérience *N*. Ces populations seraient récupérées au début du mois d'octobre et les invertébrés seraient ré-introduits au mois de novembre suivant. Il faudrait donc les maintenir 1 mois $\frac{1}{2}$ afin d'avoir une base d'individus conséquente, qui serait complétée éventuellement par des prélèvements de terrain pour composer toutes les communautés nécessaires, en maintenant une variabilité génétique. Le fait d'avoir moins d'individus à récupérer sur le terrain permettrait peut être d'aller sur un site unique, et donc de diminuer la difficulté de gestion des communautés selon leur site d'origine. Cependant, une telle organisation nécessite la présence de personnel pour veiller au bon maintien des communautés dans les bacs, pendant leur stabulation.

L'ordre des espèces dans le tableau 2.5 (page 65) est important car il précise l'ordre dans lequel les espèces sont introduites. Il est établi de façon à ce que les "proies" aient un temps d'installation suffisant avant l'introduction des "prédateurs" potentiels.

TABLEAU 2.5 – Origine et quantité d'introduction des invertébrés dans chaque canal.

Espèce	Classe	Origine	Quantité
Herbivores - Détritivores			
Gammarus pulex	Crustacé	Cressonière de Bazincourt	80 g (environ 340 individus)
rotifères, cladocères et copépodes	Zooplancton	Bassins noirs de l'INERIS	1 filtrat de 36 L sur un tamis de 50 μ m
Asellus aquaticus	Crustacé	Breuil le Vert	200 individus (environ 3.7 g)
Hydrobia sp.	Gastéropodes	Gournay sur Aronde	200 individus (environ 1 g)
Planorbis planorbis	Gastéropodes	Canaux témoins de l'expérience N - 1	17 individus (environ 1 g)
Radix peregra	Gastéropodes	Canaux témoins de l'expérience N - 1	50 individus (environ 24 g)
Prédateurs			
Sangsues non identifiées		Canaux témoins de l'expérience N - 1	10 individus (environ 1 g)
Glossiphonia complanata		Canaux témoins de l'expérience N - 1	10 individus (environ 1 g)
Erpobdella		Canaux témoins de l'expérience N - 1	10 individus (environ 1 g)
Notonectidae		Breuil le Vert	8 individus (environ 0,65 g)

Les communautés introduites sont simples mais l'aléa naturel et le temps participeront à la complexification des communautés. Les espèces et quantités d'invertébrés introduites dans les communautés initiales ainsi que leur origine sont référencées dans le tableau 2.5.

2.3.1.6 Durée de colonisation des canaux

La variabilité des mésocosmes est fortement influencée par l'état de maturité des mésocosmes (Caquet et Lagadic, 2005). Il s'agit donc d'un point important, qui conditionne le bon déroulement de l'expérience par la suite. Le temps de colonisation des rivières artificielles peut varier de 10 jours à 1 an (Caquet *et al.*, 2001). Mais elle dépend essentiellement de la taille de l'installation (Caquet *et al.*, 2001; Heimbach *et al.*, 1994). Allant dans le même sens, Belanger (1997) a analysé 276 publications et recensé 152 mésocosmes dans la littérature. Il a obtenu une relation log linéaire entre le temps de colonisation et la taille du système expérimental. Selon cette relation, il faudrait, à titre de comparaison, 140 jours de colonisation pour notre système. Dans le cas de nos expériences, le temps de colonisation est d'environ 80 jours (de mi-décembre à la première semaine de mars). Ce temps est défini par nos objectifs car les expériences sont ciblées pour suivre la dynamique de population de l'épinoche. Les dates sont donc dépendantes de la période de reproduction de cette espèce, comprise entre début mars et fin septembre dans nos conditions (chapitre 5 page 168 pour plus de détails). Il est primordial que les alevins puissent être exposés à une potentielle contamination dès leur naissance. Les fondateurs doivent donc être introduits début mars (pour le début de la reproduction) et récupérés lorsque plus aucun œuf ne peut éclore (début octobre). A l'issue de la récupération des populations, il faut enlever les sédiments avant un nouvel aménagement. Le choix a été fait d'optimiser et d'adapter les dates pour le suivi de la dynamique de population d'épinoche tous les ans, même si cela s'effectue au détriment de la phase de colonisation.

2.3.1.7 Les épinoches

Les épinoches constituant les populations au début de l'expérience sont appelées "*fondateurs*".

a- Critères de définition des populations fondatrices

Les poissons fondateurs sélectionnés ont la même histoire de vie (origine, densité, conditions d'élevage, nourrissage...) et des tailles standards homogènes. Au début de l'expérience, 10 mâles et 15 femelles sont introduits dans chaque canal.

b- Sélection des fondateurs

⇒ Sélection de la taille

La première étape consiste en la sélection des poissons dont la taille est comprise entre les bornes souhaitées. Pour définir ces bornes de tailles, le stock de poissons conservés dans l'élevage est échantillonné afin de définir la gamme de taille susceptible d'offrir 120 mâles et 180 femelles (en ajoutant 10 % de marge afin de pallier à une éventuelle mortalité des individus sélectionnés). Les poissons dont la taille est comprise dans la gamme de taille recherchée sont conservés.

⇒ Sexage des poissons

Les poissons sont sexés selon la méthode de discrimination de la morphologie céphalique détaillée dans la publication de de Kermoysan *et al.* (2013b) et dans l'annexe E (page 293). La méthode permet de discriminer trois groupes : les mâles, les femelles et les indéterminés.

⇒ L'identification des poissons

Lorsque tous les individus sont sélectionnés, une à deux semaines avant l'introduction, les poissons sont marqués individuellement à l'aide de tag alphanumérique et ils sont répartis aléatoirement entre les 12 populations.

Lorsque tous les poissons sont marqués, ils sont stabulés dans une eau ayant une température proche de celle des canaux. Les poissons sont gardés dans ces conditions pendant

au moins une semaine afin de suivre la mortalité éventuelle des poissons liée à leur manipulation. Afin de parer cette mortalité, un lot de poissons supplémentaires avait subit le même traitement (sexage et identification). Lors de la mort d'un poisson issu des 12 populations, un poisson issu du "surplus" est introduit à sa place.

⇒ Date d'introduction

La date d'introduction des poissons est définie selon leur période de reproduction afin qu'elle n'ait pas déjà commencé avant le début de l'expérience et que les poissons puissent s'acclimater à leurs nouvelles conditions de vie avant cette période. Le chapitre dédié au cycle de vie de l'épinoche à trois épines montre que la période de reproduction sur le site de l'INERIS débute habituellement aux alentours du 10 mars (Chapitre 3.2.3.1, page 105). Par conséquent, les poissons sont introduits, en général, la première semaine du mois de mars.

2.3.2 Variables suivies

2.3.2.1 Environnement de l'épinoche

Afin d'avoir un suivi de la qualité globale de la qualité du milieu, trois paramètres physiques sont suivis : la température, le pH et la conductivité. De plus, la teneur en oxygène dissous est mesurée.

a- La physico-chimie

⇒ La température

La température est enregistrée pendant toute la durée de l'expérience, avec un pas de temps de 10 minutes grâce à des sondes thermiques (HOBO0257, Prosensor, Amanvilliers, France). En raison de contraintes matérielles (nombre de sondes disponibles), 4 canaux sur les 12 sont suivis (des expériences préalables ont montré qu'il n'y avait pas de différences entre les canaux). Dans chacun des quatre canaux suivis pour la température, une première sonde est placée à 5 m de l'arrivée d'eau, en surface et une seconde sonde est placée à 15 m de l'arrivée d'eau, en profondeur.

⇒ Le pH, la teneur en oxygène dissous et la conductivité

Le pH, la teneur en oxygène dissous et la conductivité sont mesurés dans tous les canaux avec un appareil Multi 3430 SET F, n°2FD47F, à l'heure du zénith (13h en hiver et 14h en été) à 10 m de l'arrivée d'eau en surface. Les variations entre les mesures sont donc des variations saisonnières. L'heure de la mesure est importante à respecter car les valeurs des paramètres évoluent au cours de la journée.

b- <u>Suivi de la structure de l'habitat</u>

⇒ Les macrophytes

L'indicateur du suivi des producteurs primaires est le recouvrement des espèces de macrophytes présentes dans les canaux ainsi que leur diversité.

La méthode d'estimation du recouvrement des macrophytes est basée sur la méthode de Braun-Blanquet (1921). Tous les 15 jours, le volume occupé par chaque espèce est estimé en définissant des indices de surface occupée exprimée en pourcentage de recouvrement sur 1 m^2. Cet indice est multiplié par la somme de la hauteur de recouvrement en-dessous de la surface de l'eau (He) et au-dessus de la surface de l'eau (Ha). Pour connaitre le volume par mésocosme, les volumes de chaque section sont sommés (Eq. 2 - 4)

$$V = \Sigma_{x=1}^{20} C_x \times (He_x + Ha_x) \qquad \text{(Eq. 2 - 4)}$$

Dans l'Eq. 2 - 4, V est le score représentant le volume de d'une espèce de macrophyte dans le canal (m^3), C_x est l'indice de recouvrement (en m^2) de l'espèce de macropyhte entre x et $x + 1$ m, He_x est la hauteur (en m) dans l'eau occupé par l'espèce de macrophyte entre x et $x + 1$ m et Ha_x est la hauteur (en m) hors de l'eau occupé par l'espèce de macrophyte entre x et $x + 1$ m.

⇒ Le périphyton

Le périphyton est estimé à partir de la biomasse qui se développe sur les parois des canaux

(45.9 m^2). La biomasse est estimée en immergeant 10 lames de microscope (76 × 26 mm) à mi-hauteur le long des parois, tous les mètres, entre 5 et 9 mètres (côté algeco) et entre 14 et 18 m (côté arbre). Après quatre semaines, les lames sont relevées puis grattées. Le péryphyton récupéré est filtré sur du papier Whatman, préalablement pesé, avec une porosité de 50 μm. Le poids sec sans cendre est ensuite déterminé (soit la masse restante après 24 h à 105 ˚C - la masse restante après 1,5 h à 500 ˚C).

c- Suivi des proies et des prédateurs

⇒ Le zooplancton

Le but de ce suivi est d'estimer l'abondance des trois principaux groupes taxonomiques de la communauté de zooplancton (rotifères, cladocères et copépodes). Afin de répondre à cet objectif, les prélèvements ont lieu tous les 15 jours, selon un plan d'échantillonnage précis (Fig. 2.20).

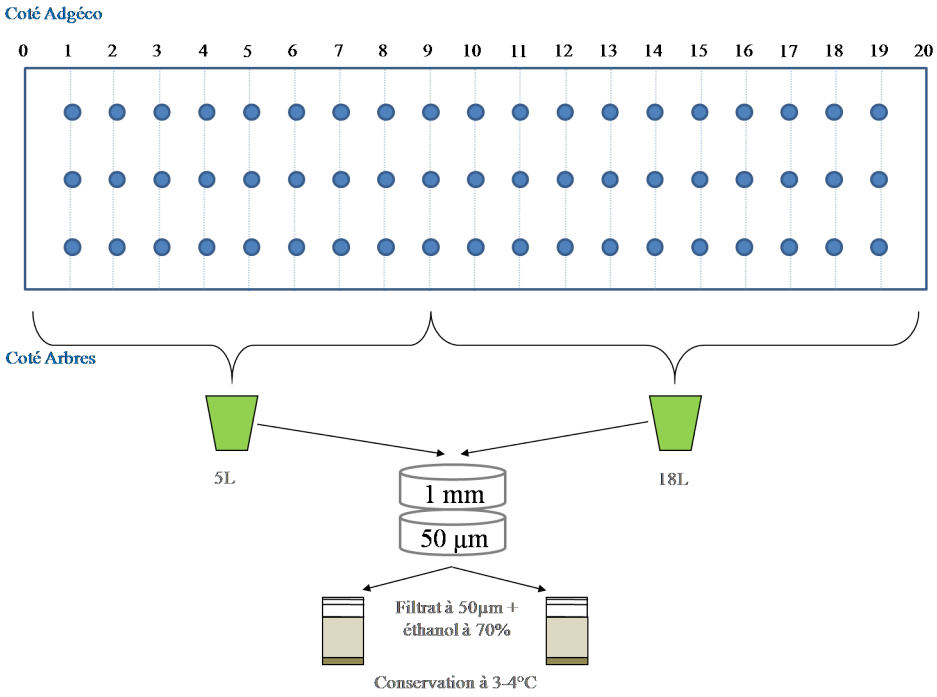

FIGURE 2.20 – Schéma de prélèvement du zooplancton dans les canaux

L'abondance des trois groupes taxonomique est déterminée *via* un sous-échantillonnage. Pour chaque échantillon, des sous-échantillons de 2 mL sont prélevés et passés au travers

d'un montage de tamis de taille de maille 200 et 50 μm. Les refus de chaque tamis sont ensuite récupérés dans des flacons. Pour chaque flacon, l'abondance des rotifères, cladocères, copépodes et *nauplii* de copépodes est ensuite déterminée à l'aide d'une roue de Ward sous loupe binoculaire. La composition spécifique des rotifères et des cladocères est déterminée pour un seul des sous-échantillons. De 4 à 8 sous-échantillons sont prélevés, en fonction de la densité des populations. Cela permet d'obtenir une précision quant à l'abondance de l'ordre de 10%. Au bout de 4 sous-échantillons, le nombre d'individus dénombrés par famille doit être supérieur à 79. En effet, à partir de l'identification complète des 50 ml de quatre échantillons (le 1 amont, 1 aval, 12 amont et 12 aval échantillonnés le 26 mars 2010), l'erreur est inférieure à 10% lorsque le nombre d'individus par sous-échantillon est d'au moins 79.

⇒ Les macro-invertébrés

L'abondance et la diversité de la communauté de macro-invertébrés epi et endobenthiques sont estimées grâce à la technique des substrats artificiels en amont et en aval. Pour ce faire, des pièges (tubes, tuiles) sont immergés le long de chaque canal (Fig. 2.21). Les pièges en tubes sont composés de 7 tubes de 20 cm de long et 2 cm de diamètre attachés entre eux. Les tuiles mesurent 11 cm de long, 16 cm de large et 1.5 cm d'épaisseur. En plus, les parois des canaux sont grattées à 4 endroits (1 et 13 m coté algeco, 7 et 19 m coté arbre).

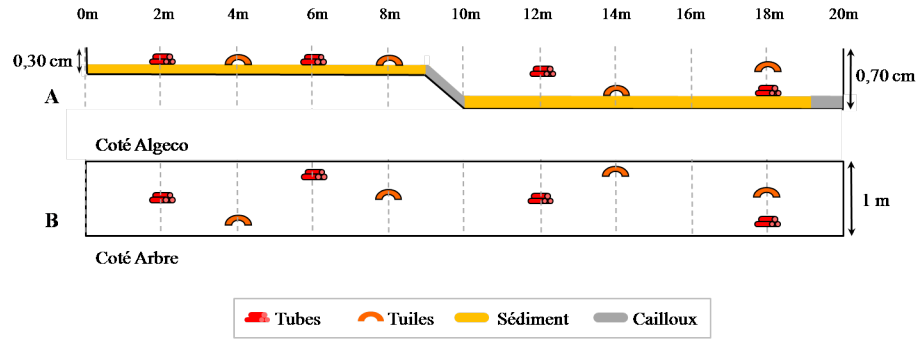

FIGURE 2.21 – Emplacement des pièges des macro-invertébrés. A : Répartition dans la hauteur ; B : Répartition dans la largeur.

Après quatre semaines, les pièges sont relevés en respectant leurs positionnements (amont ou aval). Chaque groupe de pièges est ensuite lavé et le contenu est filtré à tra-

vers un tamis de 500 μm de vide de maille. Les organismes sont directement identifiés et dénombrés par classe de taille puis ils sont réintroduits dans les canaux. Les parois sont grattées le même jour. Le contenu de l'épuisette est placé dans une coupelle et la détermination est faite directement dans la coupelle en distinguant toujours l'amont de l'aval.

2.3.2.2 Suivi de la dynamique de population de *Gasterosteus aculeatus*

a- Observation de la dévalaison

Quotidiennement, des juvéniles sortent des canaux avec le trop-plein. Afin d'éviter leur perte, des bacs de récupération ont été placés. Les juvéniles récupérés dans ces bacs sont dénombrés puis ré-introduits dans le canal.

b- Observation hebdomadaire semi-quantitative (suivi visuel)

Lors de l'observation hebdomadaire semi-quantitative, les populations d'épinoches de chaque canal sont suivies (visuellement). Ce suivi est réalisé pendant toute la durée de l'expérience. Tous les canaux sont parcourus de chaque coté pendant 5 minutes. La présence ou l'absence d'individus est notée selon l'emplacement (amont ou aval) et selon les classes d'abondance (+ : 1 à 20 ; ++ : 20 à 40 ; +++ : 40 à 60,..) pour chaque stade (alevins, juvéniles [10 - 15[mm, juvéniles [15 - 20[mm, juvéniles [20 - 25[mm, mâles et femelles). Enfin, les nids observés sont notés, ainsi que leur emplacement. Les suivis sont effectués tous les 7 $\pm$ 1 jour à l'heure du zénith pour assurer une meilleure visibilité.

c- Estimation de l'effectif par échantillonnage de la population

La méthode retenue est la méthode de capture, marquage, recapture (CMR). Tous les 21 jours, 3 canaux sont échantillonnés pendant 20 minutes. Les trois canaux échantillonnés sont sélectionnés aléatoirement (et exclu du prochain tirage jusqu'à ce que tous les canaux

aient été échantillonné). L'effort de pêche doit être réparti de façon la plus aléatoire possible le long des canaux toutes les mètres sont échantillonnés. La pêche ne doit pas se cantonner aux zones sans végétaux (7 - 19 m).

Une fois les poissons pêchés à l'épuisette, ils sont photographiés pour être dénombrés puis ils sont marqués par balnéation. A l'issu du marquage, ils sont relâchés dans leurs canaux respectifs.

Le lendemain, les canaux échantillonnés la veille sont ré-échantillonnés. Les individus pêchés sont séparés en deux groupes selon qu'ils sont marqués ou non. Chaque sous-groupe est pris en photo pour être dénombré. Les individus sont ensuite relâchés dans leur canal d'origine. Après avoir obtenu le nombre de poissons capturés lors de la première et la seconde session de pêche ainsi que le nombre d'individus colorés recapturés, nous utilisons la fonction mrClosed (Ogle, 2013) du package FSA (Ogle, 2011) du logiciel R (R Development Core Team, 2012) pour obtenir les estimations d'effectif. La méthode de calcul de l'abondance des poissons est estimée à partir des méthodes de Bailey (1952) et de Seber (1982) selon l'équation Eq. 2 - 5.

$$\begin{cases} N_B = \frac{M\times(n+1)}{R+1} \\ SD_B = \frac{R^2\times(n+1)\times(n-M)}{(M+1)^2\times(M+2)} \\ IC = \frac{M\times n}{R+X\times\sqrt{\frac{n\times M}{N_B}\times(1-\frac{M}{N_B})}} \end{cases} \quad \text{(Eq. 2 - 5)}$$

Dans l'Eq. 2 - 5, N_B est le nombre total estimé d'individu dans la population, SD est l'écart type estimé de l'effectif de la population et IC est son intervalle de confiance.

M est le nombre d'individus capturés lors de la première pêche. n est le nombre d'individus recapturés lors de la seconde pêche et R est le nombre de poissons colorés parmi les recapturés. X est la valeur de la statistique à $\frac{a}{2}$ et $100 - \frac{a}{2}$. Cette valeur est calculée à partir d'une loi binomiale si $\frac{R}{n}$ est inférieur à 0,1 ; à partir d'une loi normale si R est supérieur à 50 ; à partir d'une loi de poisson si R est inférieur à 50 et $\frac{R}{n}$ est supérieur à 0,1.

d- Suivi de la distribution de taille de la population

Les tailles des poissons d'un échantillon de la population sont mesurées sur 50 individus pour estimer la distribution de taille de la population. Afin de limiter l'impact anthropique des suivis sur les populations mesurent des poissons pêchés, les poissons sont mesurés à partir des photos de CMR.

2.3.3 Variables finales mesurées

L'expérience se termine lorsque la période de reproduction est terminée. Le chapitre dédié au cycle de vie de l'épinoche à trois épines montre que la période de reproduction sur le site de l'INERIS se termine habituellement fin septembre (Chapitre 3, page 95). Par conséquent, afin de prendre une marge de sécurité, nous récupérons les poissons lors de l'une des deux premières semaines d'octobre.

2.3.3.1 Récupération des populations d'épinoches

a- La partie amont

Afin de pouvoir récupérer tous les poissons, il est nécessaire d'enlever toutes les macrophytes présents afin d'avoir un sédiment nu et faciliter à la fois le travail de préparation des canaux, mais également la récupération des poissons. Pour ce faire, les parties immergées des macrophytes sont coupées. Puis, les algues et les racines sont enlevées des canaux avec précaution afin de s'assurer qu'aucun poisson ne soit coincé. Les algues sont placées dans des bacs d'eau de 350 L pour être vérifiée à nouveau à la fin de la récupération des poissons. Les jardinières introduites ainsi que les pierres doivent également être ôtées et contrôlées.

Lorsque les algues sont enlevées, l'arrivée d'eau est coupée et le canal peut commencer à être vidé par l'ouverture de la vanne de vidange du canal (Fig. 2.22). Une personne doit en permanence se tenir à proximité des tamis de récupération des poissons. Ils sont placés dans des bacs de 350 L alimentés en eau en continu. L'alimentation en continu des bacs de stockage des poissons est primordiale pour assurer la survie des individus lors de la

récupération des poissons, car beaucoup de sédiment se retrouve en suspension dans les bacs. Le courant d'eau continu permet de conserver une bonne oxygénation des bacs de stabulations.



FIGURE 2.22 – Système de vidange des canaux.
A : Vanne ; B : Déversoir ; C : Goulotte d'évacuation ; D : Tamis de récupération des poissons.

Lorsque la partie amont est vidée à moitié (il reste environ 15 cm d'eau), il faut créer une rigole centrale, à l'aide d'un râteau en faisant des mouvements d'aller - retour dans le sens de la largeur. Il faut mettre le sédiment sur le coté en le poussant, mais sans jamais le soulever et surtout sans le retourner car cela risquerait de bloquer des poissons dessous. Une fois que la rigole principale est faite, d'autres rigoles transverses sont faites avec la tranche de la main. L'eau peut ainsi s'évacuer par la rigole principale (Fig. 2.23 A). Il ne doit pas y avoir de petites mares afin que toutes les épinoches puissent dévaler.
Cette étape met énormément de sédiment en suspension. Il est donc compliqué de savoir si toutes les épinoches ont dévalé. Deux méthodes permettent de pallier à cet inconvénient : (i) l'arrivée d'eau est ouverte pour introduire de l'eau claire et permettre les observations ; (ii) la création de barrage de rétention d'eau à partir de pierre et de sédiment permet de faire remonter le niveau de l'eau (Fig. 2.23 B). Lors de la destruction du barrage, les poissons sont emportés par le courant.
Ensuite, l'arrivée d'eau est laissée ouverte pour nettoyer l'amont, et éviter la remise en suspension des sédiments. Après s'être assuré qu'il ne reste plus aucun poisson, cette étape est considérée comme terminée.



FIGURE 2.23 – Illustration de la rigole centrale (A) et du barrage de rétention d'eau (B).

b- La partie aval

Comme pour la partie amont, les macrophytes et les jardinières se trouvant dans la partie aval doivent être enlevées.

Lorsque les algues sont enlevées, une rigole principale est créée (Fig. 2.24).

Cette étape est celle qui fait sortir le plus de poissons sur le tamis. Les personnes chargées de la surveillance du tamis doivent être vigilantes et avoir un second tamis de substitution lorsque les poissons sont en nombre trop important ou que le sédiment colmate le tamis. En même temps, les poissons restant dans la partie aval peuvent être récupérés. Pour ce faire, la méthode la plus efficace et la moins nocive pour les poissons est l'aspiration. L'aspirateur à eau permet de récupérer des poissons de toutes les tailles (juvéniles et fondateurs) sans les blesser à la sortie. Lorsque l'aspirateur est quasiment plein, son contenu est vidé sur un tamis.



FIGURE 2.24 – Illustration de la rigole centrale.

c- Contrôle de la récupération de tous les poissons

Les canaux sont remis en eau à la fin de la récupération des épinoches dans la partie aval. Le débit en entrée doit être fort, pour rapidement submerger les sédiments. Ils sont laissés en l'état au minimum une nuit. Puis ils seront vidés en ouvrant la vanne de sortie, et en y plaçant un tamis. En général seuls un ou deux poissons sont ainsi récupérés par canal.

Enfin, les bacs de macrophytes sont contrôlés intégralement afin d'être certain qu'il ne reste plus de poisson dans les algues. La vérification des macrophytes est très importante car des poissons de toutes tailles (juvéniles de quelques millimètres à adultes fondateurs de plus de 50 mm) ont été retrouvé lors des vidanges (environ 10 poissons par canal sont retrouvés).

Le nettoyage complet des canaux est ensuite réalisé par une entreprise extérieure, avant leur ré-aménagement.

2.3.3.2 Acquisition des données

Les poissons sont stabulés au moins 12 heures avant de commencer à être traités. Durant ce temps d'attente, ils sont placés dans de l'eau claire pour diminuer le stress. Le schéma général d'acquisition des données est proposé Figure 2.25.

Les épinoches ayant une taille inférieure à 25 mm sont gardées vivantes pour permettre d'avoir des populations fondatrices l'année suivante et pour fournir des individus pour d'autres expériences. Elles sont mesurées avec du papier millimétré et pesées. Les épinoches ayant une taille supérieure à 25 mm sont euthanasiés puis sont conservées dans du formol à 4 % avant d'être sexées par dissection. Les poissons de moins de 25 mm morts et les poissons conservés dans le formol sont mesurés au pied à coulisse.

2.3.4 Chronologie et moyens humains

Afin de mieux se rendre compte de la succession des étapes, la figure 2.26 les présente sur l'axe du temps. Une des étapes les plus exigeantes en coût humain et attention particulière à porter est la récupération des populations en fin d'expérience. Afin de parvenir à récupérer les populations de deux canaux en une journée, il faut un minimum de 4 personnes (Fig. 2.27). Enfin, lors de l'acquisition des données, il faut en moyenne, deux jours à deux personnes pour acquérir les données d'une population.

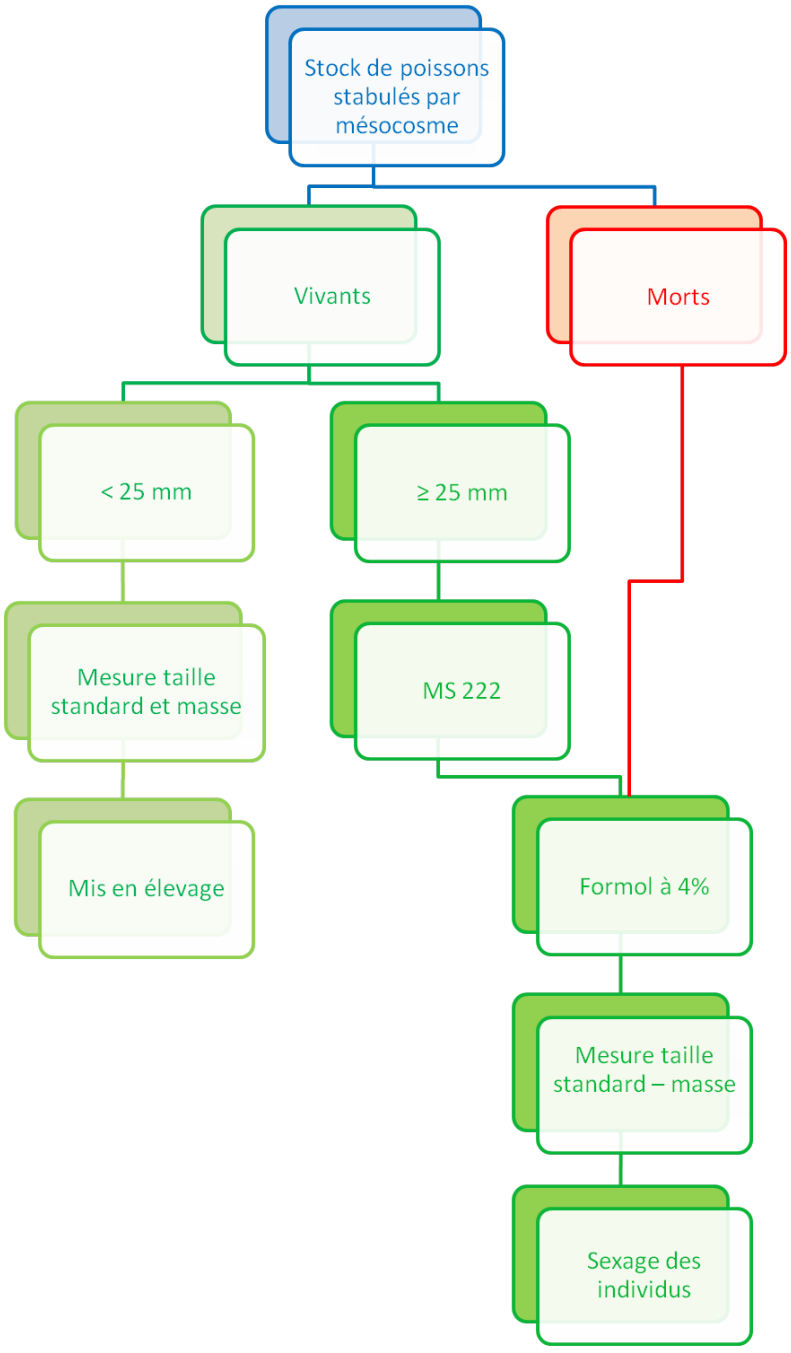

FIGURE 2.25 – Les différentes étapes du tri des poissons pour l'acquisition des données.
: la stabulation des poissons.
: le traitement des poissons morts.
: le traitement des poissons vivants.

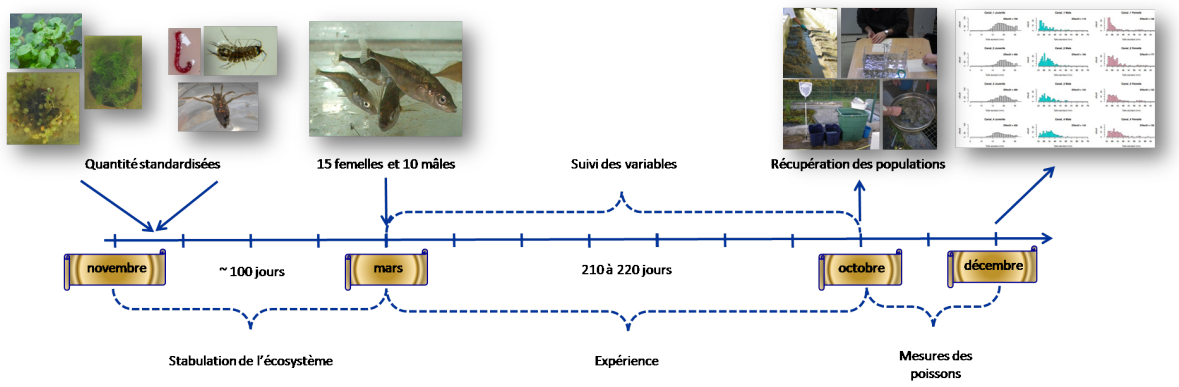

FIGURE 2.26 – Résumé des grandes étapes d'une expérience en mésocosme.

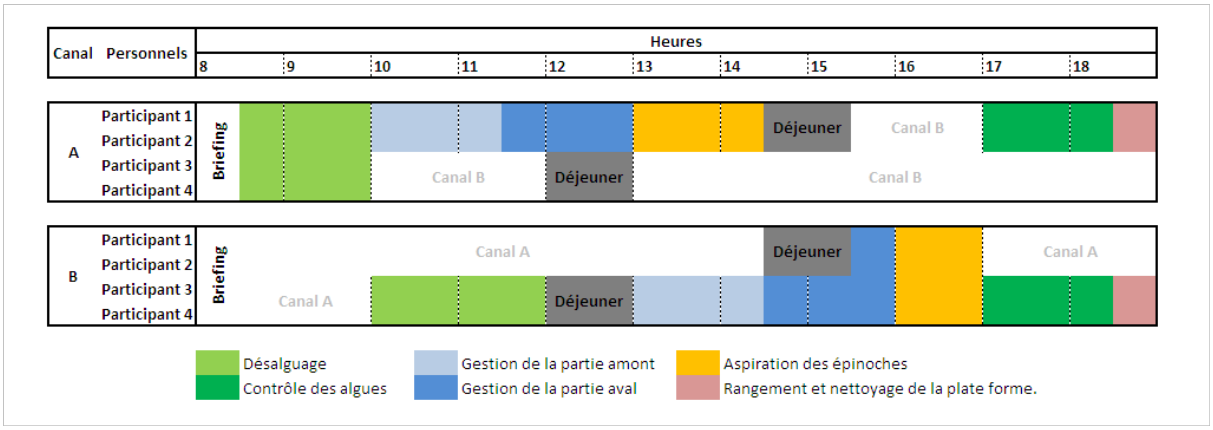

FIGURE 2.27 – Planning et gestion du personnel pour récupérer les populations de deux canaux au cours d'une journée à 4 personnes.

2.4 Calculs et analyses statistiques

2.4.1 Calculs des degrés jours

Les degrés jours sont une unité de temps qui intègre la température du milieu, excédant un seuil de température minimale (ST_{min}), à partir duquel des phénomènes biologiques ont lieu (*e.g.* la reproduction). Lorsque la température au temps t (T_t) dépasse un seuil de température maximale (ST_{max}), les calculs peuvent être différents selon les hypothèses posées (Fig. 2.28). Partons du cas simple dans lequel la température au temps t est comprise entre le seuil de température minimale et maximale. D'après Bonhomme (2000), les degrés jours s'accumulent sur une période allant de d_1 à d_2 (Eq. 2 - 6a). Pour aller plus loin dans la réflexion, considérons que la température au temps t (T_t) puisse être supérieure au seuil de température maximale (ST_{max}) de l'épinoche. Il y a deux possibilités :
(i) le stress thermique provoqué est négligeable, par conséquent, les degrés jours supérieurs au seuil de température maximale ne sont pas considérés (méthode horizontale ; Eq. 2 - 6b, Fig. 2.28 A).
(ii) le stress thermique n'est pas négligeable impliquant soit un arrêt de l'accumulation des degrés jours (méthode verticale ; Eq. 2 - 6c et Eq. 2 - 6d, Fig. 2.28 B), soit une régression des degrés jours égale à la différence entre la température et le seuil de température maximale (méthode intermédiaire ; Eq. 2 - 6e, Fig. 2.28 C).

$$DJ = \sum_{t\,=\,d_1}^{d_2} (T_t - ST_{min}) \qquad \text{(Eq. 2 - 6a)}$$

$$DJ = \sum_{t\,=\,d_1}^{d_2} (min(T_t - ST_{min}; ST_{max} - T_t)) \qquad \text{(Eq. 2 - 6b)}$$

$$si\ T_t \geqslant ST_{max} : DJ = 0 \qquad \text{(Eq. 2 - 6c)}$$

$$si\ T_t < ST_{max} : DJ = T_t - ST_{min} \qquad \text{(Eq. 2 - 6d)}$$

$$DJ = \sum_{t\,=\,d_1}^{d_2} (min(T_t - ST_{min}; 2 \times STmax - ST_{min} - T_t)) \qquad \text{(Eq. 2 - 6e)}$$

Dans les équations ci-dessus, DJ sont les degrés jours cumulés pour le pas de temps considéré, T_t est la température moyenne au temps considéré, ST_{min} est le seuil de température minimale et ST_{max} est le seuil de température maximale.

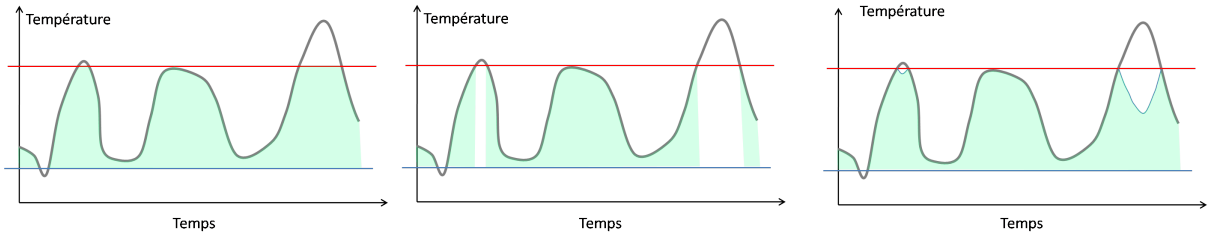

FIGURE 2.28 – Méthode de calcul des degrés jours.
A : Méthode dite "*Horizontale*" ; B : Méthode dite "*Verticale*" ; C : Méthode dite "*Intermédiaire*".
— : Seuil de température maximale ; — : Seuil de température minimale ; — : Profil de température ; ■ : degrés jours cumulés.

2.4.2 Calcul de la nourriture disponible

Lors des expériences, des relevés sont effectués pour suivre l'abondance des proies de l'épinoche (zooplancton, macro-invertébrés). Ces abondances sont converties en biomasse pour estimer la quantité de nourriture disponible dans les canaux au cours du temps pour les épinoches. Cette quantité de nourriture disponible est calculée en fonction de la taille du poisson qui la consomme. Pour une même biomasse totale, une partie plus faible sera disponible pour les petits poissons par rapport aux gros, car leur bouche ne sera pas suffisamment grande (Nettleship, 2011) pour consommer l'intégralité des proies disponibles (dépend de la taille des proies).

Les observations d'abondances des macro-invertébrés réalisées sont converties en biomasse fraîche selon l'équation générale Eq. 2 - 7a (Baumgartner et Rothhaupt, 2003; Benke *et al.*, 1999; Leuven *et al.*, 1985; Meyer, 1989; Poepperl, 1998; Towers *et al.*, 1994). Dans le cas où les paramètres obtenus sont définis pour l'équation de la biomasse sèche, une division de cette valeur par γ, coefficient de conversion de la biomasse sèche en biomasse humide, est effectuée (Eq. 2 - 7b).

$$M_h = \alpha_H \times L^{\beta_H} \qquad \text{(Eq. 2 - 7a)}$$

$$M_h = \frac{\alpha_S \times L^{\beta_S}}{\gamma} \qquad \text{(Eq. 2 - 7b)}$$

Dans les équations ci-dessus, M et L sont respectivement la biomasse humide et la

taille du macro-invertébré considéré, α et β sont les coefficients de conversion entre la biomasse humide et et la taille de l'individu. S signifie sec, H signifie humide.

Dans la littérature, de nombreux paramètres sont définis pour la relation de la biomasse sèche, mais peu pour la biomasse humide (Tableau 2.6). Les valeurs retenues apparaissent en gras dans le tableau 2.6. Les valeurs issues des canaux sont privilégiées (données obtenues par une unité collaboratrice) car elles correspondent aux communautés présentent. Certains taxons n'apparaissent pas dans le tableau 2.6 car aucune information n'a été trouvée en ce qui les concerne. Cependant elles ont été observées dans les canaux. D'autres espèces ont certaines valeurs référencées dans le tableau, mais pas toutes. Pour ces espèces (aucune ou quelques valeurs), le texte ci-dessous présente les choix effectués :

- Stylaria et Lumbriculus sont des genres de vers oligochètes de la classe des Clitellata. Ces espèces font partie de deux ordres différents, respectivement Haplotaxida et Lumbriculida. La classe des Clitellata regroupe également les achètes, dont les sangsues *G. complananta* et *E. octoculata* pour lesquelles les valeurs des paramètres reliant la masse humide à la taille de l'individu ont été déterminées dans les canaux. Ces deux espèces n'étant pas du même ordre phylogénétique (respectivement Rhynchobdellida et Arhynchobdellida), nous choisissons de prendre la valeur moyenne des valeurs de conversion proposées. D'où $\alpha = 0{,}1223$ et $\beta = 2{,}251$.
- Anisus est un gastéropode de la famille des Planorbidae, tout comme *P. carinatuss.* De plus, ils ont des tailles proches. Par conséquent, les mêmes valeurs de conversion sont utilisées. D'où $\alpha = 0{,}0655$ et $\beta = 2{,}649$.
- Les Tipulidae sont des insectes de l'ordre des Diptera, tout comme les chironomes, et les Orthocladiinae. Par conséquent, nous considérons les valeurs moyennes des paramètres liant la biomasse sèche à la taille de l'individu, divisé par le paramètre γ. D'où $\alpha = 0{,}002$, $\beta = 2{,}522$ et $\gamma = 0{,}226$.
- Agabus sp. est un insecte de la classe des Coleoptera. Nous considérons les valeurs moyennes liant la biomasse sèche à la taille de l'individu de toutes les espèces d'insectes, divisé par le paramètre γ. D'où $\alpha = 0{,}005$, $\beta = 2{,}696$ et $\gamma = 0{,}226$.
- *P. antipodarum* est un gastéropode de la famille des Hydrobiidae. Deux valeurs pour α et β sont référencées dans le tableau pour convertir la longueur en biomasse sèche. Nous considérons donc la moyenne comme valeur des paramètres. D'où $\alpha = 0{,}1377$

et β = 2,3991. Le coefficient de conversion entre la biomasse sèche en biomasse humide de cette espèce est de 0,409 ± 0,010, (n = 60 Heywood et Edwards 1962). Cette valeur est retenue comme valeur de γ.

- Les Baetis sont des insectes de l'ordre des Ephéméroptères. Sept valeurs de paramètres sont référencées pour convertir la longueur en biomasse sèche. Nous considérons donc la moyenne comme valeur des paramètres. D'où α = 0,0065 et β = 2.684. ne étude montre que l'espèce *Stenonema sp.* (insecte de l'ordre des Ephéméroptères) est composé de 80 % d'eau (n = 155, Cummins *et al.* 1973). Par conséquent, la valeur de γ retenue est 0,20 pour convertir la biomasse sèche en biomasse humide.
- Les Orthocladiinae sont des insectes de la famille des chironominae. Deux valeurs de paramètres sont référencées pour convertir la longueur en biomasse sèche. Nous considérons donc la moyenne comme valeur des paramètres. D'où α = 0,0027 et β = 2,307. Cependant, aucune valeur n'a été trouvée pour convertir la biomasse sèche en biomasse humide. La valeur trouvée pour les chironomes est considérée également pour les Orthocladiinae car ils sont de la même famille, donc la valeur de γ retenue est de 0,226.
- La famille des Limnephilidae fait partie des insectes de l'ordre des trichoptères. Deux valeurs de paramètres sont référencées pour convertir la longueur en biomasse sèche. Nous considérons donc la moyenne comme valeur des paramètres. D'où α = 0,0034 et β = 3,040, Cependant, aucune valeur n'a été trouvée pour convertir la biomasse sèche en biomasse humide. En revanche, une étude montre que trois espèces d'insecte de l'ordre des Trichoptères (*Pycnopsyche lepida*, *P. guttifer* et *P. scabripennis*) sont composées respectivement de 79,19 ± 3,54 (n = 150), 86,60 ± 1,30 (n = 18) et de 81,22 ± 2,37 % d'eau (n = 12, Cummins *et al.* 1973). Par conséquent, la valeur de γ retenue est la moyenne, soit 0,1766.
- Les notonectes sont des insectes de la classe des Hemiptera. *Ischnura sp.* et *Sympetrum sp.* sont des insectes de la classe des Odonates. Ce sont des prédateurs de l'épinoche. Ils ne rentrent pas dans le calcul de la biomasse disponible.

Les tailles des individus sont considérées comme uniformément réparties entre les bornes des gammes de taille observées.

TABLEAU 2.6 – Valeurs des paramètres des équations reliant la biomasse et la longueur des macro-invertébrés. (Eq. 2 - 7a)

Espèces	**Masse sèche**					**Masse humide**					
	α	β	$\mathbf{r^2}$	$\boldsymbol{n}$	Référence	α	β	γ	$\mathbf{r^2}$	$\boldsymbol{n}$	Référence
Gammarus pulex	0,0017	3,0882	0,967	79	Cette étude	**0.0099**	**3.0695**		0,9706	79	Cette étude
								0,261 ± 0,003		21	Wetzel *et al.* (2005)
Asellus aquaticus	0,0048	3,0489	0,9494	35	Cette étude	**0,0208**	**3,1262**		0,9788	35	Cette étude
								0,203 ± 0,014		14	Leuven *et al.* (1985)
Radix peregra	0,0085	3,19	0,94	9	Baumgartner et Rothhaupt (2003)			0,273 ± 0,019		14	Leuven *et al.* (1985)
	0,0259	2,5037	0,9266	45	Cette étude	**0,1147**	**2,858**	0,11	0,9773	33	Cette étude
Potamopyrgus antipodarum	0,1229	2,4506	0,93	9	Towers *et al.* (1994)						
	0,1526	2,3761	0,9967	45	Poepperl (1998)						
Planorbis carinatus	0,048	1,8524	0,7795	24	Cette étude	**0,0655**	**2,649**		0,953	24	Cette étude
Glossiphonia complanata	0,019	2,2123	0,9885	30	Poepperl (1998)						
	0,0846	2,0192	0,737	24	Cette étude	**0,2144**	**2,2929**	0,18	0,7163	24	Cette étude
Erpobdella octoculata	0,0058	2,2255	0,9776	10	Poepperl (1998)			0,167 ± 0,007		14	Leuven *et al.* (1985)
	0,0198	1,8904	0,6671	33	Cette étude	**0,0303**	**2,2091**	0,18	0,6681	33	Cette étude
Dugesia sp.	0,0089	2,145	0,81	42	Benke *et al.* (1999)	**0,004**	**3,3281**		0,8835	11	Cette étude
	0,0101	2,162	0,69	14	Benke *et al.* (1999)						
	0,026	1,8545	0,617	25	Meyer (1989)						

(Suite du tableau 2.6)

Espèces	**Masse sèche**					**Masse humide**					
	α	β	$\mathbf{r^2}$	$\boldsymbol{n}$	Référence	α	β	γ	$\mathbf{r^2}$	$\boldsymbol{n}$	Référence
Ischnura sp.	0,0015	2,904	0,96	13	Benke *et al.* (1999)						
Sympetrum sp.	0,0151	2,393	0,83	19	Benke *et al.* (1999)						
Baetis	0,0076	2,691	0,99	8	Benke *et al.* (1999)						
	0,0068	2,72	0,96	49	Benke *et al.* (1999)						
	0,0033	3,196	0,81	36	Benke *et al.* (1999)						
	0,0094	2,938	0,87	52	Benke *et al.* (1999)						
	0,0075	2,423	0,94	94	Benke *et al.* (1999)						
	0,007	2,15	0,64	?	Baumgartner et Rothhaupt (2003)						
	0,0038	2,67	0,91	42	Meyer (1989)						
Chironomini & Endopterygota (Nymphes)	**0,0007**	**2,952**	0,93	51	Benke *et al.* (1999)			**0,226 ± 0,011**		14	Leuven *et al.* (1985)
Orthocladiinae	0,002	2,254	0,74	39	Benke *et al.* (1999)						
	0,0034	2,36	0,55	?	Baumgartner et Rothhaupt (2003)						
Limnephilidae	0,0015	3,115	0,87	32	Benke *et al.* (1999)						
	0,0054	2,966	0,928	93	Meyer (1989)						

Dans un second temps, la nourriture est classée selon la taille des proies disponibles pour les épinoches (le bol alimentaire disponible dépend de la taille de leur bouche, Nettleship 2011). A partir des données de Nettleship (2011), il a été possible d'établir une relation entre la taille standard de l'épinoche et les dimensions de sa bouche (Eq. 2 - 8).

$$\begin{cases} Largeur = \alpha_{largeur} \times Ls + \beta_{largeur} \\ Hauteur = \alpha_{hauteur} \times Ls + \beta_{hauteur} \end{cases} \quad \text{(Eq. 2 - 8)}$$

Dans l'Eq. 2 - 8, $\alpha_{largeur} = 0{,}258$ et $\beta_{largeur} = -0{,}571$; $\alpha_{hauteur} = 0{,}0755$ et $\beta_{hauteur} = -0{,}175$. Les longueurs, largeurs et hauteurs sont exprimées en mm.

Ce sont ces valeurs qui définissent les proies que l'épinoche est capable d'ingérer. Ces valeurs sont comparées aux tailles des proies, longueur ou largeur, selon la distance la plus faible permettant de manger la proie (Tableau 2.7). Les tailles retenues sont en gras dans le tableau 2.7.

TABLEAU 2.7 – Valeurs des paramètres des équations reliant la biomasse et la longueur des macro-invertébrés.

Titre des colonnes **Espèces**	**Longueur (mm)**			**Largeur (mm)**		
	Min	**Max**	**Références**	**Min**	**Max**	**Références**
Les données *Gammarus pulex*	2	20	Tachet *et al.* (2000)	**1**	4	Tachet *et al.* (2000)
Asellus aquaticus	2	15	Tachet *et al.* (2000)	**1**	4	Tachet *et al.* (2000)
Radix peregra	1	20	Glöer (2002)	**1**	10	Glöer (2002)
Potamopyrgus antipodarum	1	10	Glöer (2002)	**1**	4	Glöer (2002)
Planorbis carinatus	1	15	Glöer (2002)	**0,96**	3	Cette étude
Glossiphonia complanata	10	30		**1**	10	
Erpobdella octoculat	15	80		**1**	5	
Dugesia	2	20	Tachet *et al.* (2000)	**0,3**		Cette étude
Dugesia					6	Timm (1999)
Ischnura sp.	5	25	Tachet *et al.* (2000)	**1,29**	10	Tachet *et al.* (2000)
Sympetrum sp.	5	25	Tachet *et al.* (2000)	**3**	10	Tachet *et al.* (2000)
Agabus	5	20	Tachet *et al.* (2000)	**3**	10	Tachet *et al.* (2000)
Baetis	1	10	Tachet *et al.* (2000)	**1**	5	Tachet *et al.* (2000)
Chironomini & Endoptérygota (Nymphes)	1	20	Nilsson (1997); Tachet *et al.* (2000)	**0,26**		Cette étude
	1	20	Nilsson (1997); Tachet *et al.* (2000)		2	Nilsson (1997)
Orthocladiinae	1	20	Nilsson (1997); Tachet *et al.* (2000)	**0,26**	2	Cette étude et Nilsson (1997)
Limnephilidae		20	Tachet *et al.* (2000)		5	Tachet *et al.* (2000)
Stylaria lacustris	5,5	18	Timm (1999)			
Stagnicola palustris	1	17,5	Glöer (2002)	**1**	8	Glöer (2002)
(C) : *Constant*						

Ainsi, pour les différentes espèces, les tailles minimales sont retenues de la façon suivante :

- Stylaria et Lumbriculus sont des vers. Ils sont morphologiquement proche des chironomes. Pour ces espèces la largeur est inférieure à la longueur. La largeur minimale retenue est donc celle de la largeur des chironomes, 0,26 mm.
- Anisus est un gastéropode de la même famille que *P. carinatus*. Par conséquent, nous considérons la même morphologie. La taille minimale est la largeur qui mesure 0,96 mm.
- Tipulidae est un insecte de l'ordre des Diptera, tout comme les chironomes, et les Orthocladiinae. Par conséquent, nous considérons que la taille minimale est celle des chironomes, soit 0,26 mm.
- La famille des Limnephilidae fait partie des insectes de l'ordre des trichoptères. Dans la littérature, seule la largeur maximale est référencée. Nous considérons que la largeur minimale est de 1 mm.

Lorsqu'une espèce est observée par classe de taille, telles que *R. peregra*, *G. complanata*, nous considérons que la valeur du ratio de la $\frac{largeur}{longueur}$ est indépendant de la classe de taille. Par conséquent, la largeur pour une classe de taille est dépendante de la classe de taille (Eq. 2 - 9).

$$l_x = \frac{l_{min} \times L_x}{L_{min}} \qquad \text{(Eq. 2 - 9)}$$

Dans l'Eq. 2 - 9, l_{min} est la plus petite largeur pour une gamme de taille [x - y] mm, L_x est la longueur x de la gamme de taille [x - y] mm, l_{min} est la largeur minimale de l'espèce et L_{min} est la longueur minimale de l'espèce.

Par conséquent, une épinoche ayant une taille standard de x mm, a une bouche ayant des dimensions l et h (Eq. 2 - 8). La biomasse de nourriture théoriquement disponible pour cette épinoche est la somme des biomasses humides des espèces ayant une taille inférieure à la dimension de la bouche de l'épinoche.

2.4.3 Les variables biologiques de la population en fin d'expérience en mésocosme

L'ensemble des moyennes des variables biologiques sont comparées pour classer les canaux entre eux. Les valeurs moyennes des variables biologiques définies n'ont de sens que si elles sont scrutées à la lumière de leur variabilité, dont rend compte le coefficient de variation (CV). Les CV permettent donc de décrire l'étalement des distributions des variables biologiques. Les variables biologiques suivies sont référencées dans le tableau 2.8.

L'indice de condition est calculé à partir des coefficients allométriques reliant la taille standard d'un poisson à sa masse (eq. Eq. 2 - 10, Freon 1978).

$$IC = \frac{Mf}{\alpha \times Ls^{\beta}} \qquad \text{(Eq. 2 - 10)}$$

Dans l'Eq. 2 - 10, Mf est la masse fraîche du poisson, Ls est sa taille standard et α et β sont les coefficients allométriques reliant la taille standard d'un poisson à sa masse pour la population étudiée.

TABLEAU 2.8 – Les variables biologiques de la population suivie et relations mathématiques entre elles.

Groupes	**Longueur (Moy ; CV)**	**Nombre**	**Pourcentage**	**IC (Moy ; CV)**
Total		N_{Tot}		
Juvéniles	x	N_{Juv}	$\frac{N_{Juv}}{N_{Tot}} \times 100$	x
Femelles			$\frac{N_{Fem}}{N_{Tot}} \times 100$	x
... F	x	$N_{FemFond}$		x
... NF	x	$N_{FemNonFond}$		
Mâles			100-P_{Juv}-P_{Fem}	x
... F	x	$N_{MalFond}$		x
... NF	x	$N_{MalNonFond}$		
... Matures			P_{Mat}	
... Maturant			100-P_{Mat}-P_{Imm}	
... Immatures			P_{Imm}	

IC : *Indice de condition, équation Eq. 2 - 10*
Moy : *Moyenne*
CV : *Coefficient de variation* = $\frac{variance}{moyenne} \times 100$
F : *Fondateurs*
NF : *Non - fondateurs*

2.4.4 Ajustement de modèles non-linéaires

Les paramètres des équations proposées dans ce manuscrit sont estimés avec le package DEoptim (Price *et al.*, 2006) du logiciel R (R Development Core Team, 2012). L'optimisation se fait par un algorithme d'évolution différentielle.

Les algorithmes de DEotpim essaient de minimiser les écarts en appliquant un algorithme de recherche heuristique, qui est une règle visant à améliorer le processus de recherche. Il fait correspondre à un état s un nombre $h(s)$ qui est une estimation du rapport coût / bénéfice qu'il y a à étendre le chemin courant en passant par s (Chauveau, 2013). Par exemple, dans la figure 2.29, la poursuite de la recherche par s_1 est heuristiquement la meilleure.

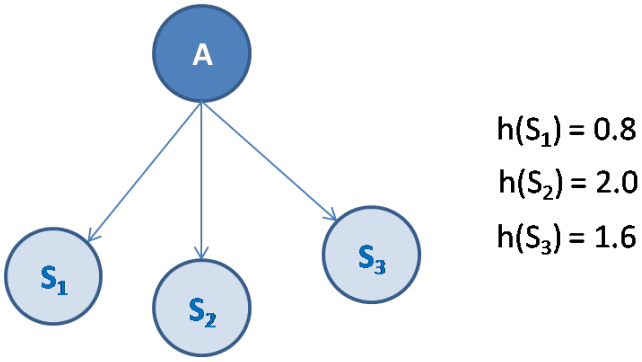

FIGURE 2.29 – Représentation de la fonction heuristique d'après Chauveau (2013).

Dans un premier temps, des calculs sont effectués pour converger vers une valeur de paramètre (10000 itérations au maximum). Puis l'incertitude de la valeur du paramètre est estimée par bootstrap (10000 cycles).

2.4.5 Comparaison des modèles

Les modèles sont comparés en regardant deux critères : le coefficient de corrélation, noté r^2, et le critère d'information d'Akaike, noté AIC, qui est un compromis entre le biais (diminuant avec le nombre de paramètres qui augmente) et la parcimonie (nécessitant de décrire les données avec le plus petit nombre de paramètres possible). L'AIC (Eq. 2 - 11a, est calculé avec la fonction AIC du package stats de R (R Development Core Team, 2012). Comme le nombre d'observations n est petit devant le nombre de paramètres k ($\frac{n}{k} \leq 40$),

l'AIC corrigé est préféré (Eq. 2 - 11b et Hurvich et Tsai 1995).

$$AIC = 2 \times k - 2 \times log(L) \qquad \text{(Eq. 2 - 11a)}$$

$$AICc = AIC + \frac{2 \times k \times (k+1)}{n-k-1} \qquad \text{(Eq. 2 - 11b)}$$

Dans les équations ci-dessus, l'AIC est le critère d'information d'Akaike et $AICc$ est le critère d'information d'Akaike corrigé, n est le nombre de données acquises, k est le nombre de paramètres du modèle et L est la vraisemblance maximisée.

2.4.6 Classification ascendante hiérarchique

Le but de la classification ascendante hiérarchique est de répartir les populations dans des groupes qui sont statistiquement proches. Préalablement à la classification, les variables ont été centrées et réduites. La mesure de la similarité a été faite par le calcul de la distance de Manhattan (Eq. 2 - 12). Cette distance est préférée à la mesure de la distance euclidienne car cette dernière est de loin la plus utilisée, mais elle est également connue pour sa sensibilité aux valeurs extrêmes (Weihs et Szepannek, 2009). Or, en raison de la variabilité inhérente aux mesures des variables biologiques (Sanderson, 2002), il est difficile de juger si une valeur est aberrante ou non. La distance de Manhattan permet de s'affranchir de cette contrainte.

$$d_{(p,\ q)} = \sum_{i=1}^{n} \mid p_i - q_i \mid \qquad \text{(Eq. 2 - 12)}$$

Dans l'Eq. 2 - 12, $d_{(p,\ q)}$ est la distance de Manhattan entre deux points p et q, n est le nombre de variable biologique et p_i et q_i sont les valeurs prises par la variable biologique i par les populations p et q.

Lorsque toutes les distances sont calculées, les populations sont regroupées selon différentes méthodes. La méthode des moyennes est recommandée (Saraçli *et al.*, 2013).
Afin d'être certain de la stabilité de l'arbre de classification, le package pvclust a été utilisé pour réaliser un bootstrap avec remise (1000 tirages). Le package permet de tester deux méthodes de bootstrap différentes : la première est la méthode "normale" qui permet de

faire un bootstrap sur une échelle (dans le cas de cette étude cette échelle est les canaux). La seconde méthode est "multi-échelle" (dans le cas de cette étude les échelles sont les canaux et les variables). La méthode multi-échelle est plus robuste (Shimodaira, 2004; Suzuki et Shimodaira, 2004).

2.4.7 Tests statistiques réalisés

Les tests ont été réalisé avec le logiciel R (versions de 2.15.1 à 3.0.0 R Development Core Team 2012) et les packages nécessaires aux analyses.

Lors des tests paramétriques, les pourcentages et les coefficients de variations ont été transformés selon la fonction *asin* de R, comme proposé par Bouyer (2000). Il s'agit d'une transformation *arcsinus* qui a pour but de normaliser les données (Bouyer, 2000).

Au préalable, nous avons vérifié la normalité (au risque minimum $\alpha = 5$ %) des données à l'aide du test de Shapiro et Wilk (fonction shapiro.test de R, package *stats*). Puis, nous avons vérifié l'homoscédasticité (l'homogénéité des variances) des données à l'aide du test de Fligner et Killeen (fonction fligner.test de R, package *stats*).

Une fois ces hypothèses vérifiées, nous avons testé l'effet d'un ou plusieurs facteurs sur une variable par une analyse de la variance (ANOVA, fonction aov de R, package *stats*) ou l'effet d'un facteur sur une variable sous l'influence d'une co-variable (ANCOVA). Les tests sont réalisées sur des populations indépendantes. Dans le cas de mesures répétées (comme pour la croissance) le test utilisé est celui du RM-ANOVA (repeated measure).

Pour répondre à cette question, il faut réaliser un test post-hoc. Nous avons choisi le test de Dunnett qui compare chaque condition testée aux populations témoins. Nous avons choisi le test de DUNNETT car il est moins dépendant de la forme de la dose-réponse alors que d'autres tests (comme celui de WILLIAMS) sous-entendent une monotonie de la réponse.

Lorsque des régressions ont été proposées, la significativité des paramètres a été testée lors de l'utilisation de la fonction *lm* de R.

CHAPITRE

3

ESTIMATION DES VALEURS DES TRAITS D'HISTOIRE DE VIE DE L'ÉPINOCHE À TROIS ÉPINES À VERNEUIL - EN - HALATTE

3.1 Introduction

Les valeurs des paramètres du cycle de vie de *G. aculeatus* (*e.g.* période de reproduction, taille maximale, taux de croissance, taille de maturité des femelles, diamètre des œufs...) doivent être précisés dans notre site d'étude (les mésocosmes de Verneuil - en - Halatte), afin de mieux interpréter les observations en mésocosmes, en particulier en cas de pression de contamination. La littérature scientifique offre une base de calibration, qui demande une validation sur notre site. En outre, certaines données dans la littérature présentent une variabilité parfois importante (*cf.* chapitre 1, page 6).

Ainsi, l'un des objectifs de cette partie a été de décrire au mieux les stades de développement depuis l'œuf jusqu'aux individus capable de se reproduire. Nous verrons que des tailles remarquables ont pu être définies à des étapes clés du cycle de vie de l'épinoche (à l'éclosion, lors de la résorption du sac vitellin, pour produire un œuf...).

Il est difficile d'appréhender expérimentalement la survie, en particulier dans la composante prédation. Ce paramètre n'est pas abordé dans ce chapitre. Il devra être déduit ultérieurement du suivi de la dynamique des populations d'épinoches en mésocosmes.

Nous avons cherché à bien caractériser la croissance et la reproduction. La croissance est un processus essentiel à comprendre pour décrire les phénomènes qui ont lieu à l'échelle de la population. S'agissant de la reproduction dans le cas des épinoches, elle est complexe et nécessite d'augmenter nos connaissances. La première question abordée concernait la période de reproduction des épinoches à Verneuil - en - Halatte, définie par les expériences de Georges (2010). Puis, dans l'intention de caractériser la reproduction, les questions se sont portées sur la fécondité. Pour les femelles, la fécondité est définie dans ce manuscrit comme le nombre d'œufs par ponte, mais également sur les cycles au cours d'une période de reproduction. Pour les mâles, la fécondité ne peut être précisément définie (pas de possibilité de suivre le nombre d'alevin éclos). Par conséquent, nous avons suivi le paramètre d'attractivité du mâle, défini comme le nombre d'œufs collecté par le mâle dans son nid. L'intervalle inter-parturition, défini comme la période entre deux pontes, a été caractérisé

en fonction de la température *via* la notion de degrés jours (Chapitre 2.4.1, page 81). Ce chapitre présentera les estimations suivantes : les seuils de températures pour calculer les intervalles entre deux pontes des femelles, le nombre d'ovocytes secondaires produits par ponte en fonction de la taille des femelles, le nombre d'ovocytes secondaires collectés par un mâle en fonction de la taille des femelles présentes.

3.2 Matériel et Méthode

Les épinoches sont issues de l'élevage de l'Ineris. L'eau provient du réseau d'eau potable, préalablement déchlorée et passée à la lumière UV.

3.2.1 Niveau de satiété de l'épinoche à Verneuil - en - Halatte

Le premier objectif est de définir la quantité maximale de nourriture que les épinoches peuvent consommer. Le second objectif est de définir une relation du niveau de satiété selon la température pour permettre de mieux comprendre comment se déroule la croissance des épinoches.

3.2.1.1 Effet de la masse de l'individu

Les poissons ont été nourris en excès avec des chironomes congelés pendant une semaine. Les poissons étaient conservés dans des bacs de 350 L en extérieur, impliquant une température fluctuante au cours de la journée (température moyenne de 12,7 ˚C). Au bout de trois jours, les poissons étaient disséqués. Les points de contrôle et de mesure étaient : la taille, la masse et le sexe de l'individu ainsi qu'une pesée de l'estomac plein et vide pour estimer la masse qu'une épinoche puisse ingérer.
Les résultats attendus étaient que la consommation de nourriture augmente avec la masse de l'individu, jusqu'à atteindre un plateau.

3.2.1.2 Effet de la température

Les individus ont été placés dans des aquariums dans lesquels la température de l'eau était contrôlée et mesurée en continu (4 conditions de température : 9,6 ˚C, 12,7 ˚C, 15 ˚C et 22 ˚C. Les poissons étaient nourris pendant cinq jours, avec des chironomes congelés, puis ils étaient mis à la diète pendant deux jours, enfin, la nourriture était remis en excès le troisième jour. Ce protocole permet que tous les poissons aient les mêmes conditions de nourriture juste avant l'expérience.
Au bout d'une heure, des poissons étaient disséqués et leur consommation alimentaire estimée par mesure de la masse de l'estomac. Une seconde expérience, qui reprend le même principe, a permis d'estimer la quantité de nourriture ingérée quotidiennement en

récupérant le reste de nourriture présent au fond de l'aquarium. Ainsi nous avions accès à la consommation journalière des épinoches par soustraction de la quantité donnée et de celle récupérée au bout de 24 heures.
Les résultats attendus étaient que la consommation augmente avec la température jusqu'à la température optimale, puis la consommation diminue lorsque la température augmente.

3.2.2 La croissance

Les modèles classiquement utilisés pour estimer la croissance des poissons sont les modèles de von Bertalanffy (Bal *et al.*, 2011; Beaudouin *et al.*, 2008; Essington *et al.*, 2001; Gamito, 1998; Hernandez-Llamas et Ratkowsky, 2004; Katsanevakis, 2006), logistiques (Gamito, 1998; Hernandez-Llamas et Ratkowsky, 2004; Katsanevakis, 2006), de Gompertz (Gamito, 1998; Hernandez-Llamas et Ratkowsky, 2004; Katsanevakis, 2006) ou de Richards (Hernandez-Llamas et Ratkowsky, 2004; Katsanevakis, 2006). Les trois premiers modèles ont en commun d'avoir trois paramètres. En revanche, le modèle de Richards a quatre paramètres. Le modèle de von Bertalanffy (1938) est utilisé par de nombreux biologistes, car les hypothèses de bases prennent en compte les notions métaboliques d'assimilation (Essington *et al.*, 2001; Gamito, 1998). Cependant, Gamito (1998) remarque que selon les conditions environnementales, les courbes de croissance des poissons divergent des modèles idéaux conçus. Le modèle de von Bertalanffy, préconisé dans le cas de l'étude de la croissance sur le long terme des poissons, est déconseillé pour décrire la croissance de la première année de vie du poisson à l'inverse du modèle de Gompertz (Gamito, 1998).
La comparaison des modèles cités (et d'un modèle de von Bertalanffy généralisé) sur un poisson téléostéen (*Sebastes aleutianus*) a montré, sur la base du coefficient de corrélation et du critère d'information d'Akaike corrigé, que les modèles de Richards et de von Bertalanffy étaient les meilleurs (Katsanevakis, 2006). Le modèle de Gompertz se classe avant-dernier.
D'après Katsanevakis (2006), le modèle de von Bertalanffy permet une meilleure estimation de la taille maximale du poisson que les autres modèles (valeur de la moyenne et diminution de l'incertitude de l'estimation).
Les différents modèles font intervenir les paramètres suivant : le taux de croissance initial,

γ, et la taille maximale de l'individu, L_∞.

3.2.2.1 Le taux de croissance initial

Le taux de croissance est estimé en s'intéressant à la croissance des juvéniles car leur taille est petite devant la taille maximale ($\frac{L}{L_\infty}$ est proche de 0), d'où le taux de croissance observé proche de la valeur prise par γ. Cette croissance des juvéniles est influencée par la température de l'eau (Bal *et al.*, 2011; Beaudouin *et al.*, 2008; Lefébure *et al.*, 2011), par la densité de juvéniles (Bal *et al.*, 2011; Beaudouin *et al.*, 2008; Ylikarjula *et al.*, 1999) et également par la quantité de nourriture (Allen et Wootton, 1982; Wootton, 1984).
Un modèle mathématique simple du taux de croissance (noté γ) est proposé (Eq. 3 - 1). Il dépend de deux paramètres : la température moyenne de l'eau et la quantité de nourriture. Ces deux facteurs sont considérés comme indépendants et multiplicatifs. Ces deux fonctions peuvent prendre des valeurs comprises entre 0 et 1. Ce modèle s'inspire du travail de Bal *et al.* (2011) qui avait proposé une équation générale du même type, en faisant intervenir des fonctions pour calculer le taux de croissance.

$$\gamma = f(T) \times f(N) \times \gamma_{max} \qquad \text{(Eq. 3 - 1)}$$

Dans l'Eq. 3 - 1, γ est le taux de croissance, *f(T)* est la fonction faisant intervenir la température, *f(N)* est la fonction faisant intervenir la nourriture et γ_{max} est le taux de croissance maximal, atteint lorsque *f(T)* et *f(N)* sont égaux à 1.

Les juvéniles ont été synchronisés (Chapitre 2.2.6, page 54) et regroupés en lots de 20 alevins (CV de la taille = 10%, n = 20, différence minimale détectable avec un test student de 18,2% entre les moyennes).

La quantité de nourriture donnée aux alevins s'exprime selon leur masse fraîche. Or, en raison des difficultés de pesée d'un alevin, une relation taille - masse des individus a été établie (Eq. 3 - 2, $r^2 = 0{,}89$, $n = 18$).

$$Masse = \alpha \times Taille^{\beta} \qquad \text{(Eq. 3 - 2)}$$

Dans l'Eq. 3 - 2, $\alpha = 0{,}0173 \pm 0{,}0265$; $\beta = 2{,}82 \pm 0{,}308$; La masse est exprimée en mg et la taille en mm.

a- Expérience 1 : Expériences préalables

Les juvéniles sont issus d'œufs obtenus lors d'une expérience au cours de laquelle des nids ont été suivis en enclos (*Cf.* chapitre 3.2.3.3, page 108).

⇒ Effet du type de nourriture :

Des expériences portant sur le type d'aliment proposé aux alevins ont été réalisées en amont. Pendant les 150 premières heures post-éclosion, 3 lots de 20 alevins ont été suivis. Chaque lot recevait quotidiennement 20 % de la masse fraîche des alevins en nourriture. Pour chaque lot, un aliment différent était proposé. Ces aliments étaient des nauplii d'*Artemia* (protocole de production : chapitre 2.2.3 page 43) ou des aliments secs (Sera-Micron) avec des particules de 100 et 200 μm de diamètre.

⇒ Effet de la fréquence de nourrissage :

L'autre expérience portait sur la fréquence de nourrissage des alevins. Pendant 7 jours, des alevins ont été nourris avec des nauplii d'*Artemia* soit à raison d'une prise quotidienne de 20 % de leur masse, soit à raison de deux rations quotidiennes de 10 % de leur masse (soit 20% également). Des fréquences plus importantes de nourrissage n'ont pas été testées pour des raisons de contraintes matérielles et pratiques (éclosion des nauplii d'*Artemia*, conditions identiques en semaine et en week end).

b- Expérience 2 : Expression de la croissance des alevins selon le niveau de nourriture.

Les juvéniles sont issus d'œufs obtenus lors d'une expérience où des nids ont été suivis en enclos (*Cf.* chapitre 3.2.3.3, page 108).

Lors de la première expérience, la croissance des individus a été suivie en aquarium pendant les 192 premières heures post-éclosion.

Ne sachant pas précisément à quel moment la bouche des alevins s'ouvre ni quand les réserves vitellines étaient toutes utilisées, nous avons choisi de mettre de la nourriture à disposition des épinoches dès leur stade alevins (bouche fermée et sac vitellin présent). Cette précaution permettait que les poissons puissent manger dès que leur anatomie était adaptée pour. De plus, cet ajout de nourriture dans le milieu n'a pas d'impact négatif pour les poissons.

Chaque lot recevait, quotidiennement, deux doses de 5, 10, 20 et 40 % de leur masse en nauplii d'*Artemia* (soit respectivement 10, 20, 40 et 80 % de leur masse par jour). L'eau des aquariums était renouvelée en continu (1 L / h) et la température était enregistrée toutes les 10 minutes. À 0, 48, 96 et 192 heures post éclosion, des photos des alevins étaient prises pour estimer leur taille standard.

c- Expérience 3 : Expression de la croissance des juvéniles selon le niveau de nourriture et la température.

La croissance des juvéniles a été suivie entre 48 et 198 heures post-éclosion. Les juvéniles sont issus de fécondation *in vitro* dont le protocole est détaillé par Santos *et al.* (2013). Les géniteurs proviennent du même pool de poissons conservé dans des conditions optimales d'élevage. Les juvéniles ont été synchronisés selon la méthode présentée au Chapitre 2.2.6 (page 54). Lorsque le nombre d'alevins souhaité pour constituer un lot était atteint, les individus étaient maintenus à une température constante de 15 °C jusqu'à la résorption complète du sac vitellin (24 °C.J), marquant le début de l'expérience.

Les juvéniles ont été installés dans des aquariums de 15 L alimentés par de l'eau régulée à la bonne température par un bac de stabulation de 50 L équipé d'un régulateur de température et d'une lampe UV. La température de l'eau dans les aquariums a été enregistrée toute les 10 minutes pendant les expériences à l'aide d'une sonde de température (HOBO0257, Prosensor, Amanvilliers, France). Afin de limiter le stress des poissons, une plaque opaque était placée devant les aquariums. La taille standard des poissons a été

mesurée sous ImageJ (Rasband, 2012) à partir d'une photographie.
Les juvéniles ont été nourris avec des nauplii d'*Artemia* (protocole de production : chapitre 2.2.3 page 43).
Les températures testées étaient comprises entre 7.2 et 22.2 ˚C (10 températures différentes). Les niveaux de nourriture testés étaient 5, 10, 20, 40, 60 et 80 % de leur masse quotidienne répartis en deux prises journalières.

d- Traitement des données

Avec les données acquises, et après une analyse statistique des effets, nous avons proposé une relation entre la croissance et la température (niveau de nourriture constant) et entre la croissance et la nourriture (température constante) [1].

⇒ La prise en compte de la température (*f(T)*)
Plusieurs équations sont proposées dans la littérature pour relier la température et le taux de croissance. Le modèle de Bal *et al.* (2011) et celui de Lefébure *et al.* (2011) considèrent trois températures remarquables : deux températures extrêmes (seuils de températures minimale et maximale) et une température optimale. En deçà du seuil de température minimale (STc_{min}) et au delà du seuil de température maximale (STc_{max}), le taux de croissance est nul. A la température optimale (Tc_{opt}), le taux de croissance est maximal. Un autre modèle, celui de Muller-Feuga (1990), comprend également trois paramètres dont le seuil de température maximale. Les deux autres paramètres sont des coefficients. Ce dernier modèle (Eq. 3 - 3) a été utilisé car lors des expériences, les températures basses (< 7 ˚C) n'ont pas été testées. Par conséquent il semble difficile d'obtenir une bonne estimation du seuil de température minimale (STc_{min}) dans les modèles de Bal *et al.* (2011) et de Lefébure *et al.* (2011).
Le modèle de Muller-Feuga (1990) fournit le ratio du taux de croissance pour une température donnée et du taux de croissance pour une température optimale (pour laquelle le taux de croissance est maximal).

1. La relation entre les deux facteurs n'a pas pu être testée en raison d'un nombre de données insuffisantes.

$$f(T) = \frac{e^{-\alpha(STc_{max}-T_t)} - e^{-\beta(STc_{max}-T_t)}}{e^{-\alpha(STc_{max}-Tc_{opt})} - e^{-\beta(STc_{max}-Tc_{opt})}} \quad \text{(Eq. 3 - 3)}$$

Dans l'Eq. 3 - 3, α et β sont des coefficients, T_t est la température au temps t, Tc_{opt} est la température optimale de croissance et STc_{max} est le seuil de température maximale.

Les paramètres (Eq. 3 - 3) ont été calibrés selon la méthodologie décrite chapitre 2.4.4 (page 92). La seule différence concerne le nombre de boucles du bootstrap (10000 dans ce cas).

⇒ La prise en compte de la nourriture (*f(N)*)

La nourriture est définie comme un rapport entre la quantité disponible pour l'individu considéré et ses besoins alimentaires journaliers. C'est donc le rapport entre la quantité de nourriture donnée et le niveau d'alimentation *ad-libitum* (Eq. 3 - 4). Dans le cas d'une nourriture en excès, le ratio ne peut dépasser la valeur de 1. L'équation du niveau d'alimentation *ad-libitum* est donc :

$$f(N) = min(\frac{N}{N_{max}}, 1) \quad \text{(Eq. 3 - 4)}$$

Dans l'Eq. 3 - 4, N est la quantité de nourriture quotidienne (exprimée en pourcentage de la masse de l'individu) et N_{max} (Eq. 3 - 9, page 112) la ration dont l'individu a besoin pour couvrir l'ensemble de ses besoins alimentaires (exprimée en pourcentage de la masse de l'individu).

3.2.2.2 La taille maximale

Lors de son stage de master réalisé à l'INERIS, Georges (2010) a réalisé une étude en extérieur, portant sur la taille maximale des épinoches. Pour ce faire, 30 poissons avaient été placés dans des bacs de 350 L et nourris *ad-libitum*. Les 30 poissons avaient une taille standard de 55 mm au début de l'expérience. Les poissons ont été mesurés tous les 10 jours pendant 60 jours.

3.2.2.3 Estimation de tailles remarquables

a- A l'éclosion

Lors des expériences, 119 alevins ont été mesurés moins de 1 h post-éclosion. Ils proviennent de 7 lots différents utilisés pour des expériences. Afin d'assurer une qualité d'eau optimale, l'eau a été renouvelée deux fois par jour. Un système d'aération était assuré en permanence.

b- A la résorption du sac vitellin

Lors des expériences, 941 juvéniles ayant résorbé leur sac vitellin ont été mesurés. Les mesures sont issues de 48 lots différents. Chacune de ces expériences d'estimation de la croissance débutaient par la mesure des alevins lors de la résorption du sac vitellin.

3.2.3 La reproduction

3.2.3.1 Période de reproduction

La période de reproduction a été étudiée par Georges (2010) dans les mésocosmes à Verneuil - en - Halatte. Les résultats montrent que la période de reproduction débute à une photopériode comprise entre 11h25 et 11h36 (soit autour du 12 mars) et s'achève lorsque la photopériode est inférieure à 11h30 de jour (soit autour du 4 octobre).

3.2.3.2 La reproduction des femelles

a- L'intervalle inter-parturition

Cette expérience vise à caractériser le temps entre deux pontes successives. Ce temps est appelé *intervalle inter parturition* (Wootton, 1976; Wootton et Fletcher, 2009).

Le suivi d'un intervalle débute juste après que la femelle ait été forcée à pondre (Chapitre 2.2.5.2 page 51). Les femelles sont placées individuellement dans des nasses ($0,25 \times 0,25 \times 0,25$ m) elles mêmes placées dans un bac ($2 \times 1 \times 0,25$ m) placé en extérieur ayant un renouvellement d'eau de 60 L/h.
Quotidiennement, une femelle est pêchée *via* une épuisette attachée à un cristallisoir afin de ne pas la sortir de l'eau. Une fois la femelle pêchée, le volume d'eau dans le cristallisoir est ajusté pour qu'il y ait une hauteur d'eau de 1,5 cm. Le cristallisoir est déposé sur du papier millimétré pour y être photographié. Les photos sont prises le matin avant que les femelles soient nourries afin qu'elles n'aient pas le ventre gonflé par la consommation de chironomes. La longueur et la largeur la plus importante de la femelle (Fig. 3.1) sont mesurées sous ImageJ (Rasband, 2012).

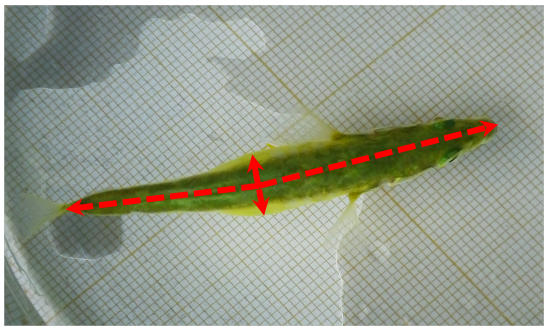

FIGURE 3.1 – Mesures effectuées sur les femelles pour suivre l'intervalle interparturition.

Pour chaque couple de mesure, le ratio $\frac{largeur}{longueur}$ a été calculé. Ce ratio permet de savoir si la femelle a pondu. En effet, lors de la maturation des œufs, la femelle grossit puis lors de la ponte, la perte de masse due à l'expulsion des œufs peut représenter 15 à 25% de la masse de la femelle (Wootton, 1976), entraînant une modification du ratio. L'effet loupe généré par l'eau influe sur la mesure de la longueur et de la largeur, mais peu sur le ratio (~1%) [2].

Cette expérience a donc pour but de définir (i) le seuil de température minimale (STr_{min}). Ce seuil correspond à la température minimale pour laquelle il y a un début de

2. Défini par comparaison entre mesure directe et dans l'eau

maturation des ovocytes chez la femelle. (ii) Le seuil de température maximale (STr_{max}) et (iii) le nombre de degrés jours pour réaliser un cycle. Les trois modèles de calcul des degrés jours (Chapitre 2.4.1, page 81) ont été ajustés pour estimer ces valeurs (chapitre 2.4.4, page 92).

Les suivis ont été réalisés du 11 avril au 1er août 2012. Cette période a été divisée en trois phases. Une phase s'arrêtait lorsque toutes les femelles de la série avaient réalisé au minimum trois cycles de reproduction ou qu'aucune évolution du ratio n'était observée pendant au moins 10 jours (à 16˚C). Au total, 33 cycles exploitables ont été enregistrés au cours de la saison de reproduction 2012. Les femelles ont été nourries *ad-libitum* (quantité de nourriture correspondant aux besoins de l'individu). La température a été enregistrée toute les 10 minutes pendant les expériences à l'aide d'une sonde de température (HOBO0257, Prosensor, Amanvilliers, France). Pour une même femelle, trois photos ont été analysées à chaque fois.

b- La fécondité

Cette expérience vise à déterminer la relation entre la taille standard des femelles, leur niveau d'alimentation et les caractéristiques des pontes (nombre d'ovocytes matures, taille et masse de ces derniers). Les ovocytes secondaires sont obtenus par ponte forcée (Chapitre 2.2.5.2 page 51).

Les variables mesurés sont : le nombre d'œufs dans la ponte, le diamètre des œufs pondus (estimé sur 30 œufs de la ponte), la masse sèche de la ponte (24h à 105 ˚C) et la masse sèche d'un œuf moyen de la ponte.

En 2011, 17 femelles nourries *ad-libitum* sans excès de nourriture ont été strippées. En 2012, deux traitements ont été testés : des femelles nourries *ad-libitum* sans excès de nourriture (20 femelles) et des femelles à 50% de cette dose de nourriture (11 femelles).

Un modèle a été proposé pour relier la fécondité des femelles à leur taille (pour les femelles nourries *ad-libitum*) :

$$NbOeufs = \alpha \times Ls + \beta \qquad \text{(Eq. 3 - 5)}$$

Dans l'Eq. 3 - 5, *Nb Œufs* est le nombre d'œufs pondus au cours d'un cycle par une femelle i, α est la pente, Ls est la taille standard de la femelle i et β est l'ordonnée à l'origine.

Puis la longueur à la maturité des ces femelles qui est la taille standard pour laquelle la femelle produit un seul œuf lors du cycle (Eq. 3 - 6) a été estimée.

$$Ls_{Mat} = \frac{1 - \beta}{\alpha} \qquad \text{(Eq. 3 - 6)}$$

Dans l'Eq. 3 - 6, Ls_{Mat} est la taille standard à laquelle la femelle i produit 1 œuf unique lors de son cycle (*Nb Œufs* = 1), α est la pente, Ls est la taille standard de la femelle i, et β est l'ordonnée à l'origine.

3.2.3.3 La reproduction des mâles

L'attractivité des mâles (nombre d'œufs collectés) est étudié dans cette expérience en fonction de la taille du mâle et de la fécondité potentielle des femelles présente dans l'enclos.

Lorsque les mâles ont pris leurs colorations nuptiales, ils sont introduits dans des nasses (0,50 × 0,50 × 0,25 m) elles mêmes placées dans un bac ($2 \times 1 \times 0,25$ m) placé en extérieur ayant un renouvellement d'eau de 60 L / h. Les nasses contenaient une poignée de sédiment, des végétaux, 5 cm de ficelle de chanvre décortiquée ainsi qu'un tube PVC (L = 15 cm, $\emptyset$ = 7 cm).

Le mâle est introduit avec une à 10 femelles synchrones (Chapitre 2.2.5, page 51). Au bout de 7 jours, le nid (Fig. 3.2) est relevé et les œufs sont dénombrés. Le nid est prélevé

en le faisant glisser sur une feuille plastifiée rigide. Celui-ci est ensuite ouvert depuis son centre et étalé. Quand le nid est relevé, les tailles standard du mâle et des femelles sont mesurées.

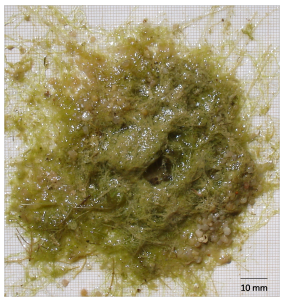

FIGURE 3.2 – Photographie d'un nid d'épinoche hors de l'eau.

Au total, 21 nids contenant des œufs ont été suivis (6 en 2011 et 15 en 2012). Chaque nid a été construit pour un mâle en présence de 1 à 10 femelles. Lors de l'analyse des résultats, les œufs collectés ont été estimés selon le nombre de femelles présentes, selon la taille standard du mâle, ainsi que l'attractivité potentielle. Elle est estimée par la taille standard totale des femelles présentes définie comme la somme des tailles standard des femelles ôtées de la taille à la maturité (Eq. 3 - 7). Enfin, une estimation du nombre moyen d'œufs déposés par une femelle fut effectuée en divisant le nombre d'œufs collectés par le nombre de femelle présentes.

$$Ls_{totale\ \ femelle} = \sum_{i=1}^{n}(Ls_i - (Ls_{Mat} \times (n-1)) \qquad \text{(Eq. 3 - 7)}$$

Dans l'Eq. 3 - 7, $Ls_{totale\ \ femelle}$ est l'attractivité potentielle, n est le nombre de femelle présentes, Ls_i est la taille standard de la femelle i et Ls_{Mat} est la taille à la maturité estimée dans l'étude de la fécondité des femelle, *ici 30,28 mm* (Eq. 3 - 6). Le facteur *n-1* permet de retrancher toute les tailles avant la maturité sauf une, pour la femelle et ainsi estimer la fécondité potentielle comme s'il n'y avait qu'une femelle en présence du mâle.

Trois modèles sont proposés. Les points communs de ces modèles de régression sont qu'ils intègrent l'effet de la taille du mâle et qu'ils sont composés de trois paramètres. Le premier paramètre α rend compte de l'effet du mâle. Le second paramètre β rend compte

du paramètre lié à la femelle et le troisième paramètre γ est l'ordonnée à l'origine. Les paramètres liés à la femelle sont respectivement le nombre de femelles présentes (Eq. 3 - 8a), la somme des tailles des femelles présentes (Eq. 3 - 8b) et la fécondité potentielle (Eq. 3 - 8c). Les modèles sont comparés selon les deux critères (r^2 et AIC) décris chapitre 2.4.5 (page 92).

$$NbOeufs = \alpha \times Ls_{\text{mâle}} + \beta \times Nb_{femelles} + \gamma \quad \text{(Eq. 3 - 8a)}$$

$$NbOeufs = \alpha \times Ls_{\text{mâle}} + \beta \times Ls_{femelles} + \gamma \quad \text{(Eq. 3 - 8b)}$$

$$NbOeufs = \alpha \times Ls_{\text{mâle}} + \beta \times Ls_{totale\ femelles} + \gamma \quad \text{(Eq. 3 - 8c)}$$

Dans les équations ci-dessus, $NbOeufs$ est le nombre d'œufs total collectés par le mâle, $Ls_{\text{mâle}}$ est la taille standard du mâle, $Nb_{femelles}$ est le nombre de femelles présentes, $Ls_{femelles}$ est la somme des tailles des femelles présentes et $Ls_{totale\ femelles}$ est l'attractivité potentielle (Eq. 3 - 7).

3.3 Résultats

3.3.1 Niveau de satiété de l'épinoche

3.3.1.1 Effet de la masse de l'individu

La quantité de nourriture ingérée ne dépend pas de l'interaction entre le sexe et la masse de l'individu (ANCOVA ; ddl résiduel = 41 ; $p = 0{,}166$). Les pentes sont identiques. La masse de nourriture consommée augmente avec la taille (Fig. 3.3, ANCOVA ; ddl résiduel = 43 ; $p < 0{,}001$) mais ne dépend pas de son sexe (ANCOVA ; ddl résiduel = 43 ; $p = 0{,}564$). En raison d'un manque de poissons ayant une masse supérieure à 2700 mg, il est très difficile d'analyser les données selon un type de modèle en particulier (plateau atteint ou non).

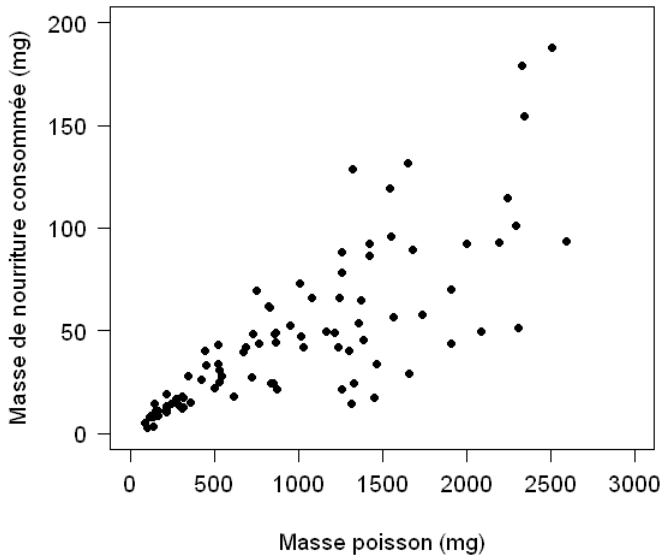

FIGURE 3.3 – Masse de nourriture (mg) consommée par les épinoches en fonction de leur masse fraiche (mg).

3.3.1.2 Effet de la température

La température a un effet sur la quantité de nourriture retrouvée dans l'estomac au bout d'une heure (ANOVA ; ddl résiduel = 87 ; $p < 0{,}001$). La ration alimentaire consommée une heure après nourrissage sur des individus privés de nourriture pendant 48 heures augmente significativement entre 9,6 ˚C et 12,7 ˚C puis reste statistiquement

stable jusqu'à 22 ˚C (Fig. 3.4 A ; Tableau 3.1). Cependant, la consommation alimentaire est limitée par la capacité (le volume) de l'estomac. Par conséquent, pour des températures trop élevées, la consommation reste constante. En revanche, la digestion peut être plus rapide car la vitesse des processus physiologiques est accélérée.

Les rations consommées n'étant pas différentes au delà de 12,7 ˚C, nous considérons que la ration maximale qu'une épinoche peut consommer en une heure est égale à la moyenne des observations réalisées pour les trois températures les plus élevées (Fig. 3.4 A), soit 5,63 ± 1,81 % (moy ± sd, n = 76).

TABLEAU 3.1 – Résultats du test post hoc de Tuckey

	9,6 ˚C	12,7 ˚C	15 ˚C	22 ˚C
9,6 ˚C	-	***	***	**
12,7 ˚C	***	-	NS	NS
15 ˚C	***	NS	-	NS
22 ˚C	**	NS	NS	-

Pour l'expérience sur un jour, chaque point est la consommation par poisson sur la masse moyenne des poissons. Les données de l'expérience montrent une augmentation de la ration de nourriture consommée quotidiennement jusqu'à 22 ˚C. Un modèle sigmoïde est proposé pour estimer la consommation journalière en fonction de la température (Eq. 3 - 9, Fig. 3.4 B., $r^2 = 0{,}722$).

$$N_{Max} = \frac{Q_{Max}}{1 + e^{-\alpha \times T + \beta \times ST_{Min}}} \qquad \text{(Eq. 3 - 9)}$$

Dans l'Eq. 3 - 9, T est la température de l'eau (˚C), $Q_{Max} = 38{,}8$ %, est la ration maximale ingérable en une journée, $ST_{Min} = 4{,}56$ ˚C, $\alpha = 0{,}248$ et $\beta = 0{,}719$.

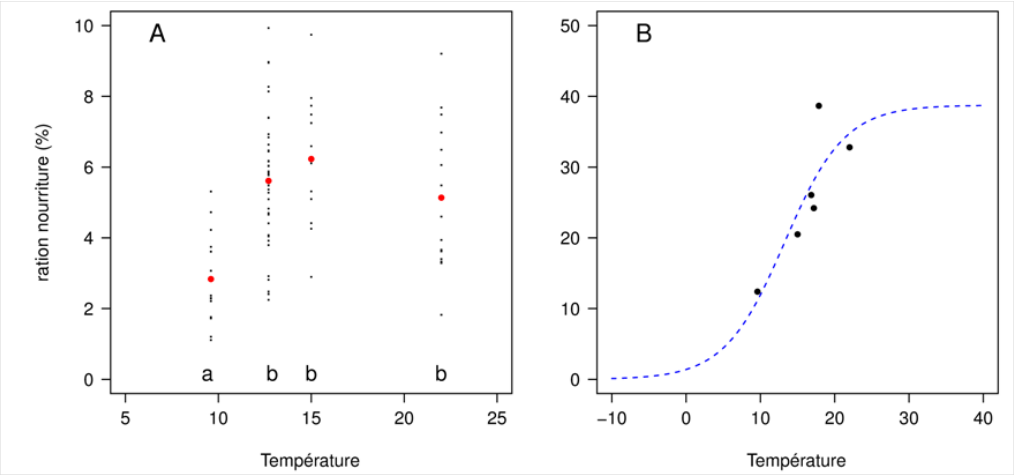

FIGURE 3.4 – Masse de nourriture consommée (exprimée en pourcentage de la masse de l'individu), après 48 heures de diète par une épinoche en fonction de la température et du temps (A : au bout d'une heure, B : au bout de 24 heures)
• : Données observées (sur la partie B, les points représentent la moyenne de 10 poissons ayant une taille standard supérieure à 30 mm) ; • : Moyennes par température ; — : Simulations du modèle proposé (B : Eq. 3 - 9).
Les lettres en minuscule expriment des différences significatives entre les conditions (TUCKEY, Tableau 3.1)

3.3.2 Croissance de l'épinoche

3.3.2.1 La croissance des juvéniles

a- Expérience 1 : Expériences préliminaires

⇒ Effet du type de nourriture

En raison de mesures qui n'étaient pas complètement répétable (photos inexploitables), seul un échantillonnage des groupe était effectué à chaque pas de temps (Tableau 3.2). Le modèle d'erreur de l'analyse RM-ANOVA est alors très complexe à écrire. C'est pourquoi, une ANOVA a été utilisée pour traiter ces données. Cependant, il faut noter que l'analyse est biaisée car l'erreur liée au temps n'est pas prise en compte.

Les types de nourritures proposés n'affectent pas significativement la croissance des alevins et des juvéniles (ANOVA ; ddl résiduel = 538 ; $p = 0{,}539$, Fig. 3.5 A).

TABLEAU 3.2 – Nombre de données par groupe

Temps (h)	**1,5**	**8,5**	**24,5**	**33**	**50**	**58**	**74**	**98**	**122**	**146**
100 μm	10	20	22	21	21	13	11	19	18	15
200 μm	16	20	20	22	22	12	10	20	17	18
Nauplii d'Artémia sp.	18	20	22	22	22	17	17	21	20	15

⇒ Effet de la fréquence

En raison de mesures qui n'étaient pas complètement répétable (photos inexploitables), seul un échantillonnage des groupe était effectué à chaque pas de temps (Tableau 3.3). Le modèle d'erreur de l'analyse RM-ANOVA est alors très complexe à écrire. C'est pourquoi, une ANOVA a été utilisée pour traiter ces données. Cependant, il faut noter que l'analyse est biaisée car l'erreur liée au temps n'est pas prise en compte.

TABLEAU 3.3 – Nombre de données par groupe

Temps (jours)	**0**	**2**	**7**
1 fois par jour	12	14	14
2 fois par jour	12	12	15

Sur l'ensemble de l'expérience, la fréquence de l'apport de la nourriture n'a pas d'effet sur la croissance (ANOVA ; ddl résiduel = 77 ; p = 0,162, Fig. 3.5 B). Cependant elle a un effet significatif sur la croissance des juvéniles au bout de 7 jours (ANOVA ; ddl résiduel = 27 ; $p < 0{,}05$, Fig. 3.5 B). Les juvéniles ayant été nourris deux fois par jour sont significativement plus grands que ceux nourris une seule fois par jour.

b- <u>Expérience 2</u> : Expression de la croissance selon le niveau de nourriture

Les résultats de l'expérience sont présentés figure 3.6.

Pour les mêmes raisons que celles exposées précédemment, les données ne permettent pas

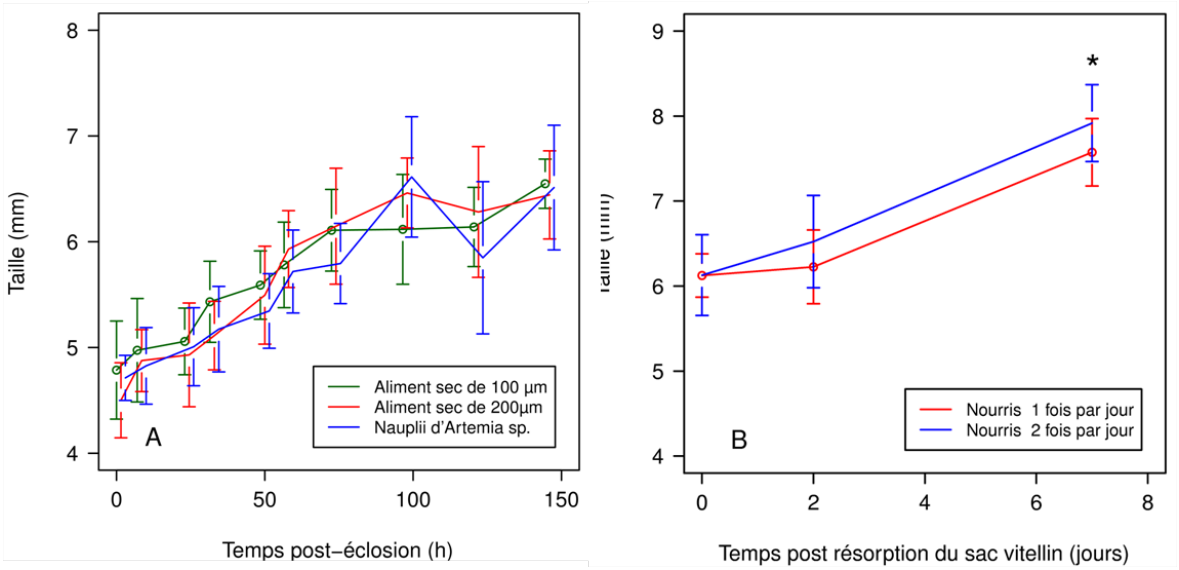

FIGURE 3.5 – Résultats des expériences préalables au suivi de croissance.
A : Croissance des juvéniles en fonction du type d'alimentation.
B : Croissance des juvéniles en fonction de la fréquence d'alimentation.
Différence significative (ANOVA) : * : $p < 0{,}05$.

de réaliser une analyse par RM-ANOVA (Tableau 3.4). Par conséquent, une ANOVA est proposée.

TABLEAU 3.4 – Nombre de données par groupe

Temps (h)	**0**	**48**	**95,5**	**191**
10	18	16	14	16
20	19	17	14	18
40	19	19	13	18
80	19	17	9	15

Sur l'ensemble de l'expérience, la quantité de nourriture, le temps et l'interaction des deux facteurs ont un effet significatif sur la taille standard des épinoches (ANOVA ; ddl résiduel = 257 ; $p < 0{,}001$).

Au début de l'expérience, il n'y a pas de différence entre les tailles des individus (Tableau 3.5). Après 48 h d'expérience, la nourriture n'a pas d'effet sur la taille entre les conditions (Tableau 3.5) mais a un effet dès 96 h (Tableau 3.5). La température de l'eau

était de 16,01 ± 0,57 [14,36 - 17,87]°C (moy ± sd [min - max] ; Fig. 3.6 B).

TABLEAU 3.5 – Effets des niveaux de nourriture au cours du temps (ANOVA)

Temps	**ddl résiduel**	**p**	
0	71	0,953	
48	65	0,919	
96	46	$5{,}22 \times 10^{-8}$	***
191	63	$6{,}89 \times 10^{-13}$	***

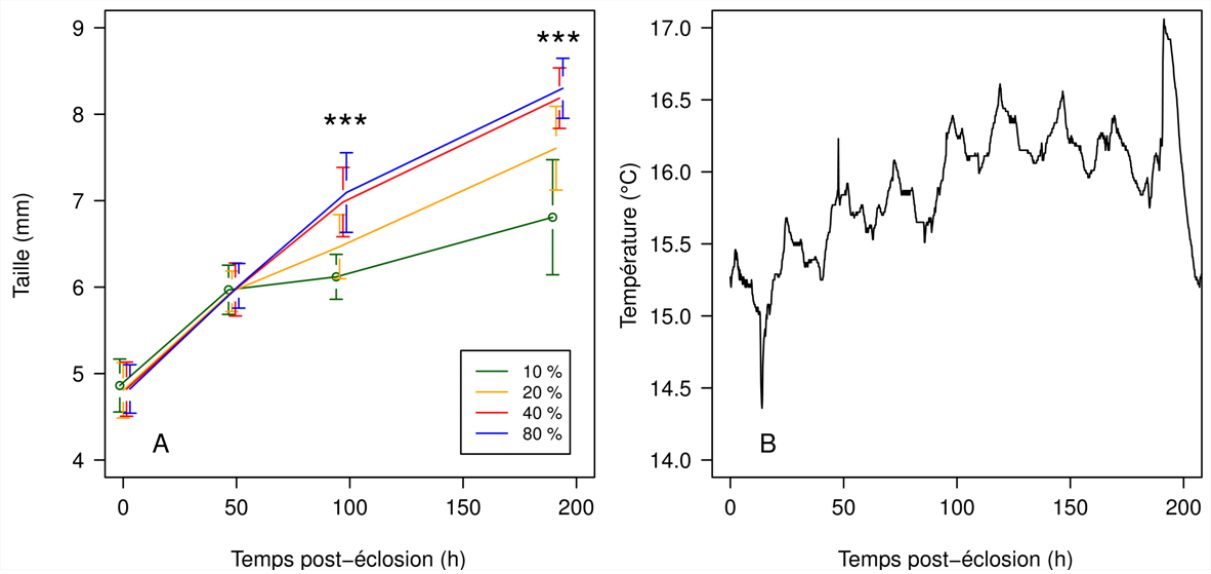

FIGURE 3.6 – A : Évolution de la taille standard des juvéniles en fonction de la concentration d'*artémia* au cours du temps (moy ± SD) ;
B : Température enregistrée pendant l'expérience.
Différence significative (ANOVA) : *** : $p < 0{,}001$.

Lors de cette expérience, les alevins ont grandi en moyenne de 1,95 mm, 2,80 mm, 3,37 mm et 3,48 mm, respectivement pour 10, 20, 40 et 80 % de nourriture par jour. Jusqu'à 48 h, les alevins ont grandi de la même façon indépendamment de la condition de nourriture disponible (environ 1,15 mm). Cette période correspond au temps nécessaire à la résorption du sac vitellin (observations sous loupe binoculaire réalisées en parallèle).

c- Expérience 3 : Expression de la croissance selon le niveau de nourriture et la température

Les résultats de l'expérience sont présentés figure 3.7.
Les tailles standard initiales des juvéniles ne sont pas significativement différentes entre elles (ANOVA ; 5 classes de température ; ddl résiduel = 797 ; $p = 0{,}427$).
Les conditions "niveau de nourriture - température" sont listées dans le tableau 3.6. L'interaction entre la température et la quantité de nourriture n'a pas d'effet sur la taille finale des épinoches (ANOVA ; 5 classes de température ; ddl résiduel = 746 ; $p = 0{,}957$). En revanche, indépendamment l'un de l'autre, la température et la quantité de nourriture ont un effet significatif sur la taille standard des épinoches à la fin de l'expérience (ANOVA ; 5 classes de température ; ddl résiduel = 750 ; $p < 0{,}001$).

TABLEAU 3.6 – Les conditions de "nourriture *vs* températures" testées.

Niveaux de nourriture (% de la masse par jour	**Température moyenne de l'eau**	**Écart type de la température de l'eau**
5 & 60	7,18	0,20
5 à 80	8,12	1,24
10 à 40	8,59	0,10
5 à 60	9,81	0,06
80	12,59	0,20
5 à 80	13,56	0,06
5 à 60	15,17	0,72
80	18,02	2,43
5 à 80	19,73	0,26
5 à 80	22,16	0,22

La croissance minimale observée est de 0,09 mm/j, pour les juvéniles nourris quotidiennement avec 5% de leur masse en *artémia* dans un environnement dans lequel l'eau était à 8,1 ± 1,2 ˚C. A l'opposé, la croissance maximale observée est de 0,35 mm/j, pour les juvéniles nourris quotidiennement avec 80% de leur masse en *artémia* dans un envi-

ronnement dans lequel l'eau était à 19,7 ± 0,3 ˚C.

Le niveau de nourriture a un effet significatif sur la croissance dans différentes conditions thermiques. La réciproque se vérifie également : pour tous les niveaux de nourriture, la température a un effet significatif sur les taux de croissance journalier (Les conditions n'ont pas d'effet sur les tailles initiales mais la température et la quantité de nourriture à des effets sur les tailles finales des épinoches). De plus, quel que soit le niveau de nourriture administré, la croissance des individus augmente avec la température moyenne de l'eau pour atteindre un plateau aux environs de 15 ˚C (Fig. 3.7 A). Une diminution du taux de croissance est observable lorsque la température est de 22,16 ˚C. Cependant, la croissance augmente avec le niveau de nourriture (Fig. 3.7 B).

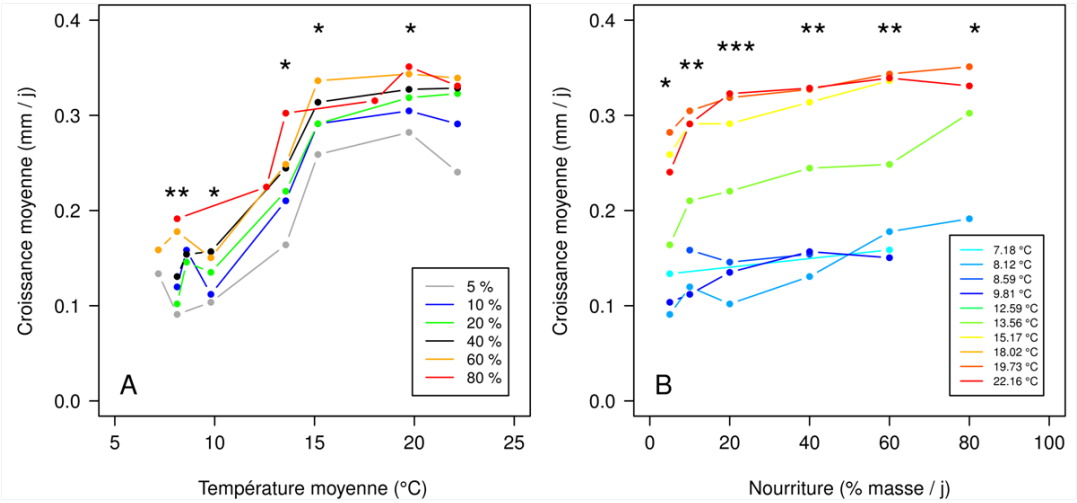

FIGURE 3.7 – Croissance des juvéniles...
A : ...selon la température moyenne de l'eau pour différents niveaux de nourriture.
B : ...selon le niveau de nourriture pour les différentes températures de l'eau.
Différences significatives (ANOVA) : * : $p < 0{,}05$; ** : $p < 0{,}005$; *** : $p < 0{,}001$;

3.3.2.2 Modélisation des effets de la température sur la croissance

Les valeurs estimées des paramètres de l'équation prenant en compte la température (Eq. 3 - 3, page 104) sont référencés dans le tableau 3.7. Le modèle de Muller-Feuga (1990) est correctement ajusté ($r^2 = 0{,}832$) avec nos données (Fig. 3.8) en considérant les valeurs moyennes des paramètres.

TABLEAU 3.7 – Estimation des paramètres (10000 cycles) de l'Eq. 3 - 3 (page 104).

Paramètres	**Moyenne**	**Écart type**	**IC minimal 95%**	**IC maximal 95%**
α	0,112	$6{,}23 \times 10^{-3}$	0,099	0,124
β	0,29	$2{,}18 \times 10^{-2}$	0,250	0,335
ST_{max}	25,4	0,627	24,4	26,8

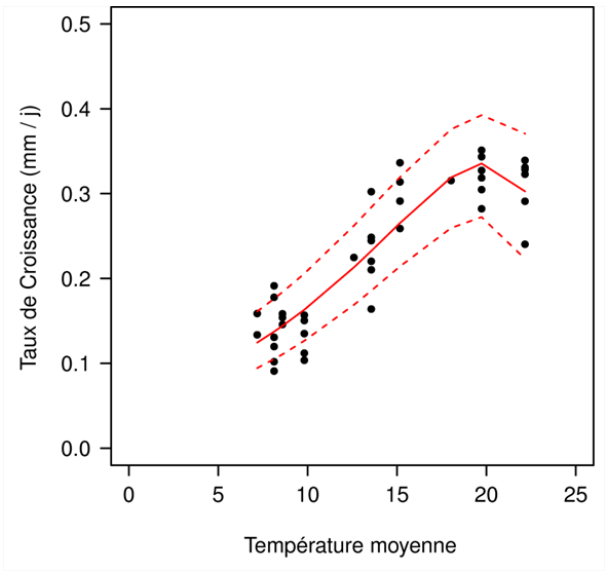

FIGURE 3.8 – Ajustement du modèle Muller-Feuga (1990) sur les données de croissance observées en fonction de la température ($r^2 = 0{,}832$).
• : Données observées. — : Moyennes des simulations du modèle de Muller-Feuga (1990) ; - - : Intervalle de confiance à 95% des simulations du modèle de Muller-Feuga (1990)

Le taux de croissance augmente avec la température jusqu'à une température qui est la température optimale de croissance. Au delà de cette valeur de température, le taux de croissance diminue (Fig. 3.8). Cette valeur de température est égale à 20,1 ± 0,684 [18,8 - 21,4] °C ($\overline{m}$ ± SD [IC 95%$_{Min}$ - IC 95%$_{Max}$].

3.3.2.3 Estimations de tailles remarquables

A la fin de l'expérience de Georges (2010), les poissons montraient une croissance nulle (tailles standard non significativement différentes entre plusieurs dates) malgré des conditions environnementales (température et nourriture) favorables. Les tailles maximales des mâles à Verneuil - en - Halatte, étaient de 55,27 ± 2,04 [52,49 - 59,64] mm et pour les femelles, la taille maximale était de 61,05 ± 2,40 [57,18 - 66,37] mm.
La forme de l'épinoche semble être un facteur influençant la taille maximale de l'épinoche femelles (ANOVA ; ddl residuels = 48 ; p < 0,01, 3.9 p. 120) tout comme l'habitat (ANOVA ; ddl residuels = 53 ; p < 0.05). En revanche, la latitude (ANOVA ; 5 classes de latitudes ; ddl residuels = 49 ; p = 0,595) n'impacte la taille maximale de l'épinoche (3.9 p. 120).

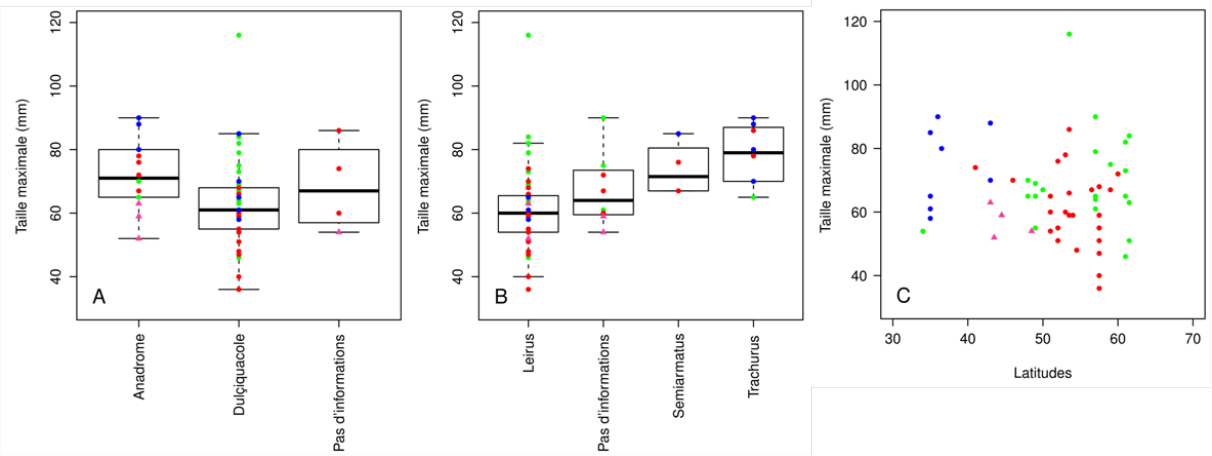

FIGURE 3.9 – Analyse de la taille maximale des femelles selon leurs habitats (A), leurs formes (B) et la latitude (C). Les données proviennent de l'Annexe 6,1 de Bell et Foster (1994).
● : Europe (dont ▲ : France) ● : Amérique du Nord ● : Asie

Les tailles remarquables sont estimées comme étant la moyenne ± écart type des différents échantillons et borné par l'intervalle de confiance à 95% (tableau 3.8).

TABLEAU 3.8 – Tailles remarquables du cycle de vie de l'épinoche à l'INERIS.

Taille standard... (en mm)	**Moyenne**	**Écart type**	**IC minimal 95%**	**IC maximal 95%**	***n***
... lors de l'éclosion	4,78	0,34	4,11	5,66	119
... lors de la résorption du sac vitellin	5,72	0,26	4,71	6,53	941
... maximale des mâles	55,27	2,03	52,49	59,64	11
... maximale des femelles	61,05	2,40	57,18	66,37	19

3.3.3 Reproduction de l'épinoche

3.3.3.1 La reproduction des femelles

a- L'intervalle inter-parturition

La température a un effet très significatif sur la durée de l'intervalle inter parturition (ANOVA ; 4 classes de température ; ddl residuel = 29 ; $p < 0{,}001$).
Les trois séries du suivi présentent des scénarii de températures différents (Fig. 3.10). La première série du suivi est plus froide (12,58 ± 1,09 ° C [$10,20 - 16.01$], $\overline{m}$ ± SD [*min* - *max*]) que les deux autres séries (respectivement, 16.58 ± 0,84 [15,01 - 18,96] ° C et 17,25 ± 0,65 [15,80 - 21,01] ° C pour la deuxième et la troisième série). La seconde et la troisième série se différencient par les températures maximales atteintes, respectivement 18,96 °C et 21,01 °C pour la seconde et la troisième série.

Les nombres de cycles suivis pendant l'expérience sont présentés dans le tableau 3.9. Les femelles mettent entre 4 et 11 jours selon la température pour produire des œufs.

Aucun modèle ne se distingue d'un autre pour mieux estimer le seuil de température minimale et la somme de degrés jours nécessaire à une femelle entre deux pontes (Fig. 3.11). La raison est qu'aucun des trois modèles proposés ne convergent. L'analyse des résidus ne suit pas une loi normale. Selon la méthode de calcul employée, les estimations des paramètres sont équivalentes pour les deux paramètres (Tableau 3.10). Le seuil

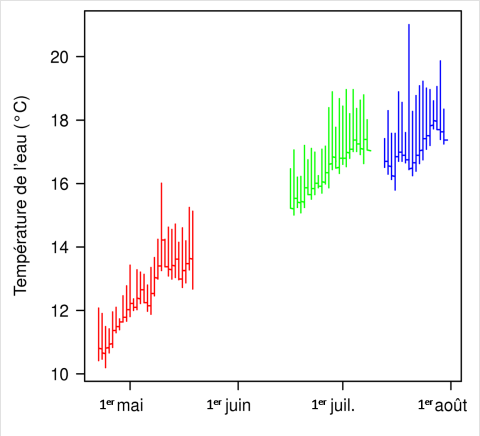

FIGURE 3.10 – Scénarii de température pour les suivis de l'intervalle inter parturition. — : Série 1 ; — : Série 2 ; — : Série 3.

TABLEAU 3.9 – Les cycles suivis.

Série	**Date de début**	**Date de fin**	**Nombre de femelles**	**Nombre de cycles total sur la période**
1	22 avril 2012	19 mai 2012	3	8
2	16 juin 2012	8 juillet 2012	5	13
3	13 juillet 2012	30 juillet 2012	4	12

de température minimale (STr_{min}) est estimé à 6,5 ± 0,3 ˚C. Le seuil de température maximale (STr_{max}) a été fixé à 21 ˚C, température au-dessus de laquelle le stade final de la maturation des follicules d'une femelle est inhibé d'après Wootton (1984). L'intervalle inter parturition des femelles nourries *ad-libitum* durerait 44,9 ± 2,1 ˚C.j.

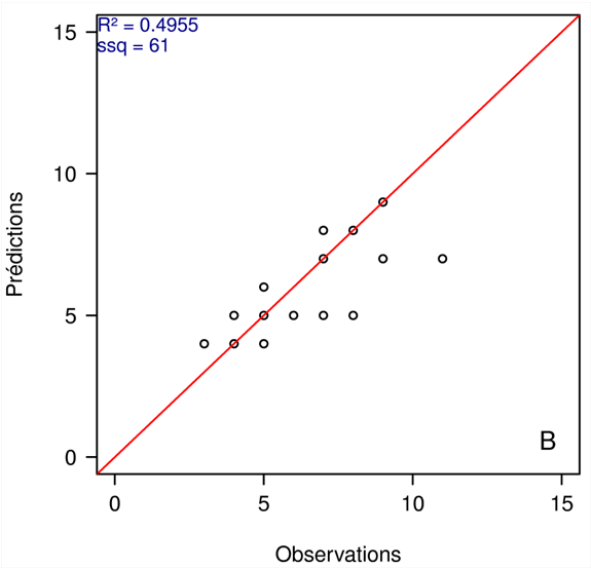

FIGURE 3.11 – Exemple de prédiction des jours nécessaire à l'intervalle inter parturition en fonction des observations réalisées. Les valeurs des paramètres utilisées sont celles issue de la convergence vers une valeur après 1000 itérations.
— : Droite 1 : 1

b- La fécondité

Au minimum, 32 et 46 œufs ont été pondus au cours d'un cycle de reproduction et au maximum 129 et 245 œufs (respectivement pour des femelles nourries à 50 et 100 % de la valeur dite *ad-libitum*). L'interaction de la taille de la femelle et de la nourriture n'a pas d'effet significatif pour expliquer le nombre d'œufs pondus (ANCOVA ; ddl residuel = 60, $p = 0{,}603$). Par conséquent, pour les deux niveaux de nourriture, la pente est la même. Il y a un effet de la taille de la femelle sur le nombre d'œufs pondus (ANCOVA ; ddl residuel = 61, $p < 0{,}001$) et il y a un effet de la quantité de nourriture (ANCOVA ; ddl residuel = 61, $p < 0{,}001$).

TABLEAU 3.10 – Estimation des paramètres par la méthode de bootstrap (1000 cycles).

Méthode de calcul	**Moyenne**	**Écart type**	**Intervalle de confiance minimal 95%**	**Intervalle de confiance maximal 95%**
Seuil de température minimale (ST_{min})				
Horizontale	5,88	0,295	5,30	6,55
Verticale	6,36	0,345	5,70	7,26
Intermédiaire	5,95	0,319	5,32	6,63
Degrés jours cumulés				
Horizontale	48,1	1,79	44,6	52,0
Verticale	45,5	2,12	41,9	50,6
Intermédiaire	47,9	1,98	44,5	52,0

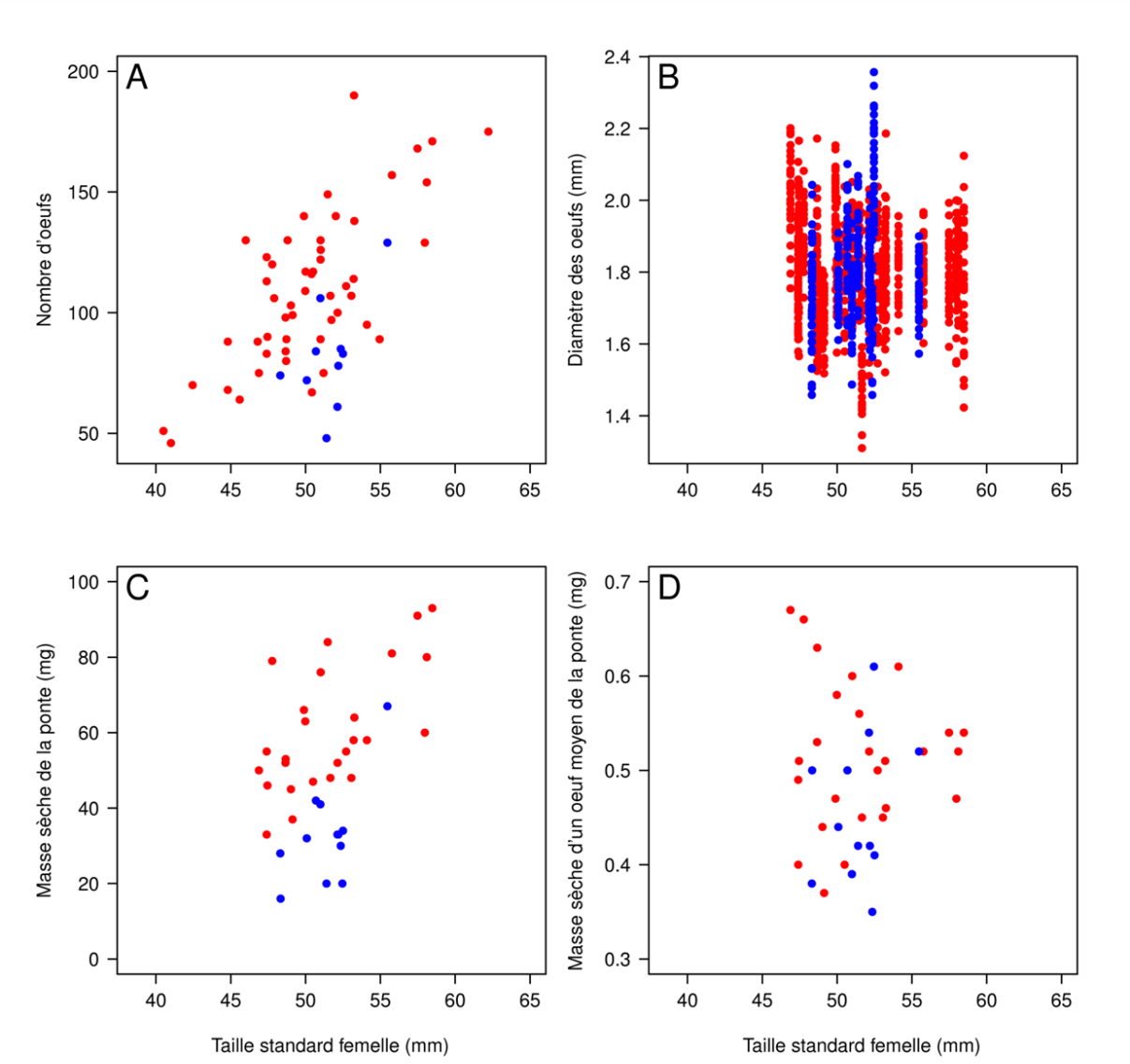

FIGURE 3.12 – Variables biologiques de la ponte exprimée en fonction de la longueur standard de la femelle traitée et de la ration de nourriture donnée.
A : Nombre d'œufs récupérés par la méthode de "stripping" (Les femelles mesurant moins de 45 mm et plus de 60 mm, sont des données issues de stages réalisés pendant la thèse. Ces données ne sont disponibles que pour le nombre d'œufs pondus) ; B : Diamètre (mm) des œufs de la ponte ; C : Masse sèche de la ponte (mg) ; D : Masse sèche d'un œuf moyen de la ponte (mg).
— : 100% *ad-libitum* ; — : 50% *ad-libitum*.

Le diamètre moyen ($\pm$ *SD* ; [*min* - *max*]) d'un œuf pondu est 1.80 $\pm$ 0,14 mm ([1,31 à 2,36] mm ; $n = 1140$). La distribution des diamètres mesurés est présentée figure 3.12 B. Le diamètre des œufs pondus dépend de l'interaction de la taille de la femelle et de la quantité de nourriture disponible pour la femelle (ANCOVA ; ddl residuel = 1136, $p < 0.05$). En revanche, indépendamment l'un de l'autre, le diamètre des œufs ne dépend ni de la taille de la femelle (ANCOVA ; ddl residuel = 1137, $p = 0{,}108$), ni de la quantité de nourriture consommée par cette dernière (ANCOVA ; ddl residuel = 1137, $p = 0{,}252$).
Enfin, le diamètre des œufs dépend du nombre d'œufs pondus au cours du cycle (ANOVA ; 8 classes régulières de nombre d'œufs pondus ; ddl residuel = 1072, $p < 0{,}001$).

La ponte pèse 33,0 $\pm$ 13,4 ([16 - 67] mg, $n = 12$) et 60,5 $\pm$ 16,3 ([33 - 91] mg, $n = 26$), respectivement lorsque les femelles sont nourries à 50 et 100% d'*ad-libitum* (Fig. 3.12 C). L'interaction de la taille de la femelle et de la nourriture n'a pas d'effet significatif pour expliquer la masse de la ponte (ANCOVA ; ddl residuel = 34, $p = 0{,}453$). Par conséquent, pour les deux niveaux de nourriture, la pente est la même. Il y a un effet de la taille de la femelle sur la masse de la ponte (ANCOVA ; ddl residuel = 35, $p < 0{,}001$) et il y a un effet de la quantité de nourriture (ANCOVA ; ddl residuel = 35, $p < 0{,}001$).
Enfin, le nombre d'œufs pondus au cours d'un cycle de reproduction a un effet très significatif sur la masse de la ponte (ANOVA ; 8 classes régulières de nombre d'œufs pondus ; ddl residuel = 28, $p < 0{,}001$).

Un œuf moyen de la ponte pèse 0,46 $\pm$ 0,08 ([0,35 - 0,61] mg, $n = 12$) et 0,52 $\pm$ 0,08 ([0,37 - 0,67] mg, $n = 26$), respectivement lorsque les femelles sont nourries à 50 et 100% d'*ad-libitum* (Fig. 3.12 D).
L'interaction de la taille de la femelle et de la nourriture n'a pas d'effet significatif pour expliquer la masse de l'œuf moyen de la ponte (ANCOVA ; ddl residuel = 34, $p = 0{,}398$). Par conséquent, pour les deux niveaux de nourriture, la pente est la même. Il n'y a pas d'effet de la taille de la femelle sur la masse de l'œuf moyen de la ponte (ANCOVA ; ddl residuel = 35, $p = 0{,}901$) mais il y a un effet de la quantité de nourriture (ANCOVA ; ddl residuel = 35, $p < 0{,}05$).
La taille de la ponte n'a pas d'effet sur la masse de l'œuf moyen de cette ponte (ANOVA ;

8 classes régulières de nombre d'œufs pondus ; ddl residuel = 28, $p = 0{,}651$).

La taille à la maturité est influencée par la taille maximale de l'épinoche (données issues de Bell et Foster (1994) et présentée Fig. 3.13, ANOVA ; 8 classes de taille maximale ; ddl residuel = 37, $p < 0{,}01$). La longueur d'une femelle pour produire un œuf est estimée à 30,26 ± 5,01 mm, d'après l'Eq. 3 - 6 (page 108). Le paramètre α est égal 5,37 ± 0,56 et l'ordonnée à l'origine est égale à -160,29 ± 28,72 ($r^2 = 0{,}646$, AICc = 474).

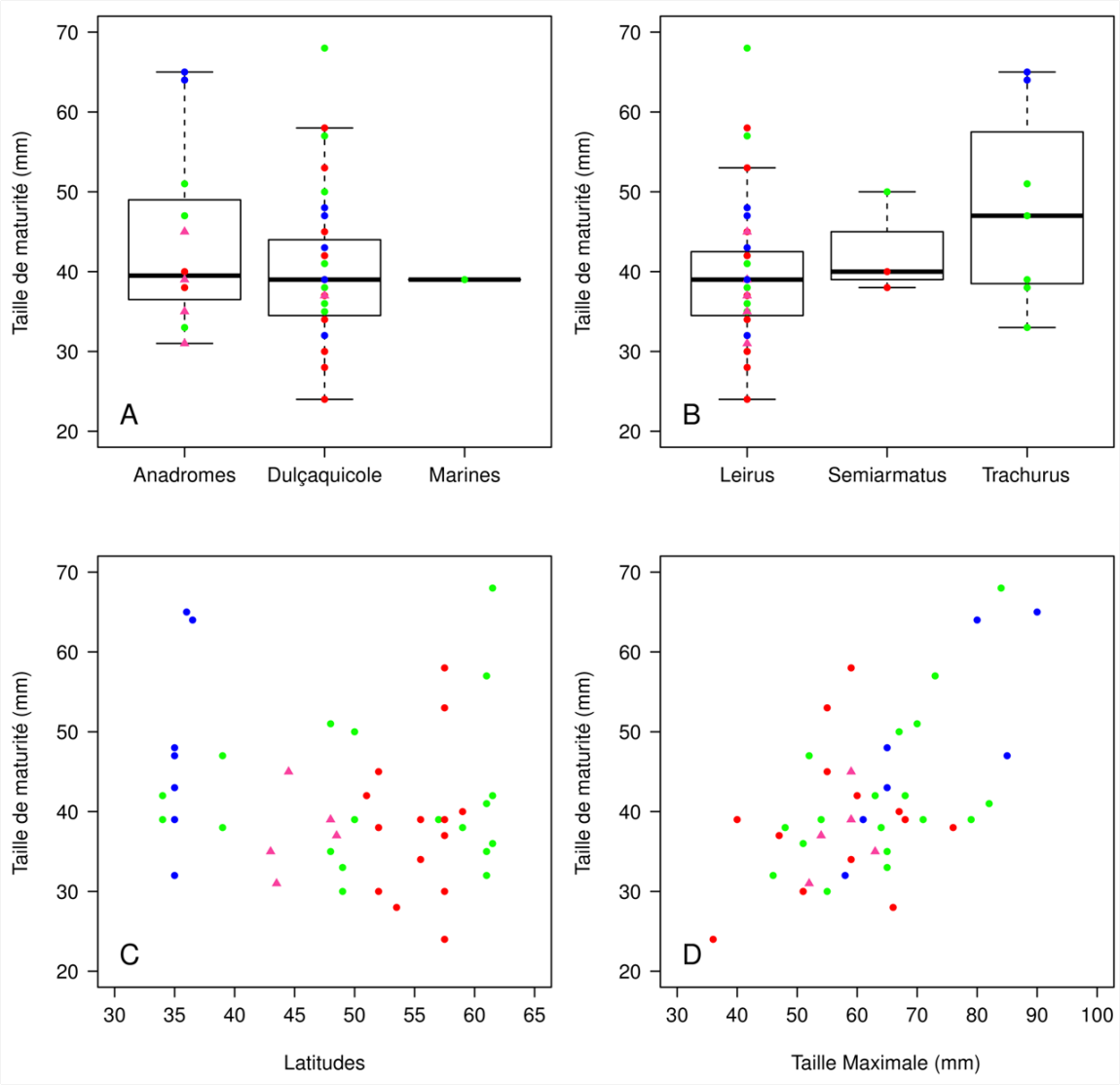

FIGURE 3.13 – Analyse de la taille à la maturité des femelles selon leurs habitats (A), leurs formes (B), la latitude de leur habitat (C) et la taille maximale (D). Les données proviennent de l'Annexe 6,1 de Bell et Foster (1994). ● : Europe (dont ▲ : France) ● : Amérique du Nord ● : Asie

3.3.3.2 La reproduction des mâles

Lors des expériences réalisées, les mâles ont collecté 362 ± 199 [38 - 710] (moy ± sd [min - max]) œufs. Cette variabilité s'explique par différents facteurs. Le nombre d'œufs collectés au bout de 7 jours augmente avec le nombre de femelles présentes dans la nasse avec le mâle (Fig. 3.14 A). Les observations réalisées montrent également que l'attractivité du mâle (nombre d'œufs collectés par le mâle) augmente avec sa taille standard, jusqu'à environ 52 mm (ANOVA ; 3 classes de taille maximales des mâles ; ddl residuel = 14 ; $p < 0{,}005$, Fig. 3.14 B). Au dessus de cette taille, les données ne permettent pas d'établir de relation car le nombre de femelles introduites en présence du mâle était trop faible, conduisant à un faible nombre d'œufs collectés. Il faut d'ailleurs noter que le minimum d'œufs collectés par un mâle au bout de 7 jours a été observé pour un mâle ayant une taille standard de 51,64 mm, qui était en présence de 3 femelles mesurant toutes en moyenne 48 mm. Les deux autres points (255 et 291 œufs collectés) correspondent respectivement à des mâles mesurant 52,83 et 53,10 mm, tous deux en présence de 4 femelles mesurant 48 mm en moyenne. Le nombre d'œufs collectés augmente également avec la taille standard totale des femelles présentes (Eq. 3 - 7, p. 109) mise en présence du mâle (ANOVA ; 3 classes de tailles ; ddl residuel = 13 ; $p < 0{,}05$, Fig. 3.14 C).

Les trois modèles proposés présentent de bonne corrélation entre les prédictions de la régression et les observations (Fig. 3.15). Cependant, le meilleur modèle proposé semble celui prenant en compte la taille standard totale des femelles présentes (Eq. 3 - 7, p. 109) car c'est le modèle présentant le meilleur coefficient de corrélation et la plus faible valeur du critère d'information d'Akaike corrigé (Eq. 3 - 8c, page 110). Les valeurs des paramètres de ce modèle sont données dans le tableau 3.11 (p. 130).

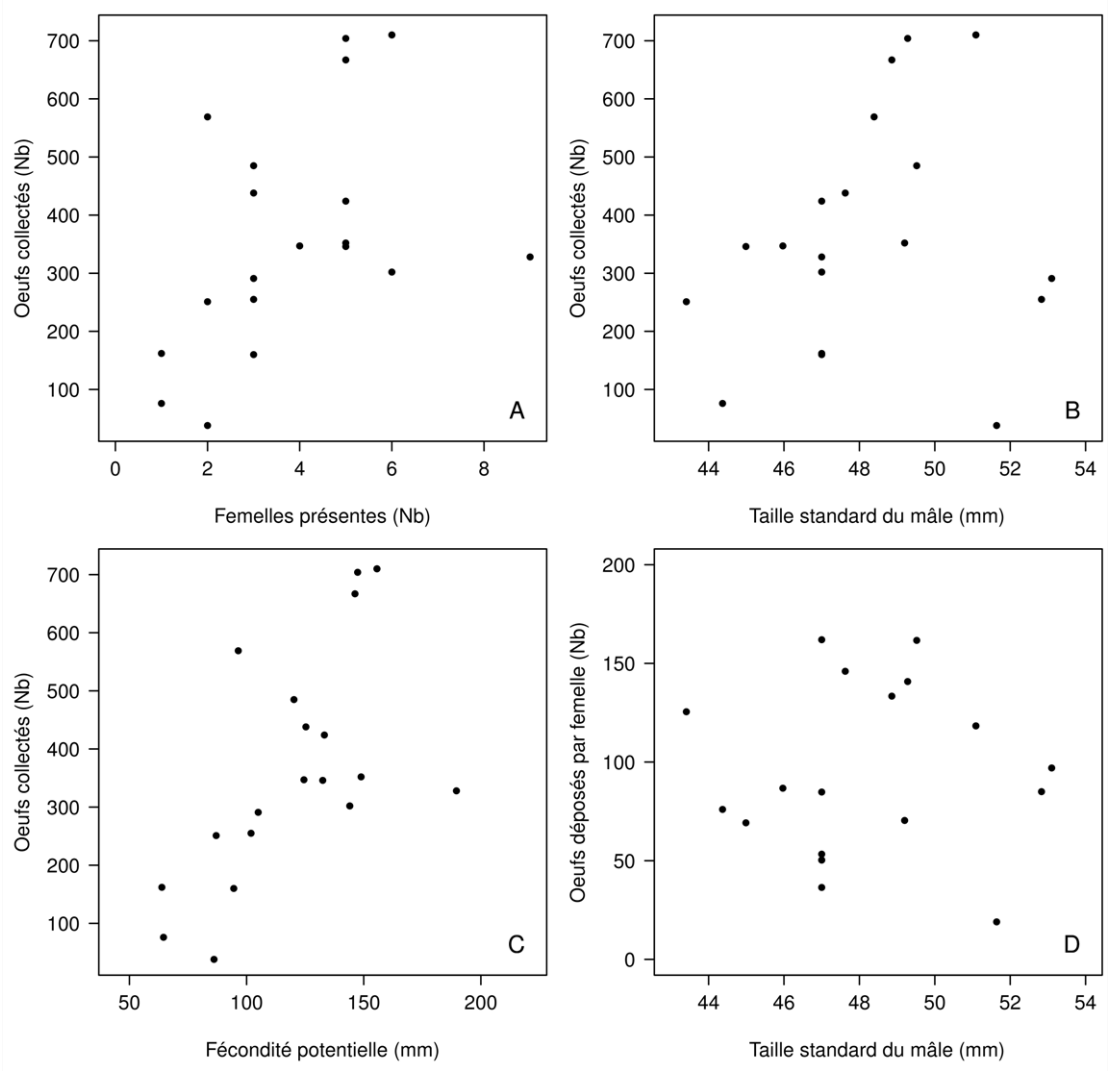

FIGURE 3.14 – Attractivité des mâles exprimée selon le nombre d'œufs collectés dans le nid.
A : Nombre d'œufs collectés en fonction du nombre de femelles présentes ;
B : Nombre d'œufs collectés en fonction de la taille standard du mâle ;
C : Nombre d'œufs collectés en fonction de la fécondité potentielle des femelles présentes (Eq. 3 - 7, p. 109) ;
D : Nombre d'œufs déposés ($\frac{Nombre\ d'oeufs\ collectés}{Nombre\ de\ femelles}$) en fonction de la taille standard du mâle ;

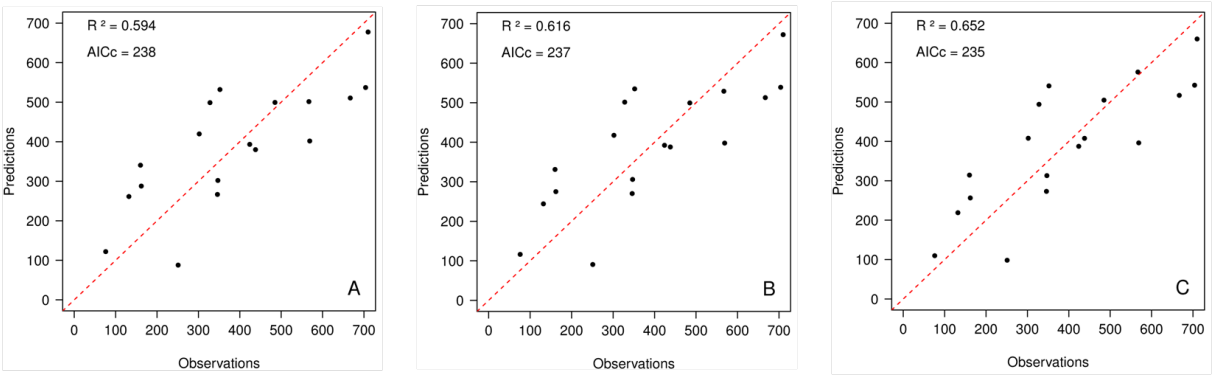

FIGURE 3.15 – Régression linéaire proposées pour simuler l'attractivité des mâles.
A : Nombre d'œufs collectés en fonction du nombre de femelles présentent (Eq. 3 - 8a, page 110) ;
B : Nombre d'œufs collectés en fonction de la taille standard du mâle (Eq. 3 - 8b, page 110) ;
C : Nombre d'œufs collectés en fonction de la taille standard totale des femelles présentes (Eq. 3 - 8c, page 110) ;
- - : Droite 1 : 1

TABLEAU 3.11 – Estimation des paramètres de l'équation Eq. 3 - 8c (p. 110).

Paramètre	**Moyenne**	**Écart type**	**IC minimal**	**IC maximal**	***p***
α	56,255	16,997	20,027	92,484	$5{,}54 \times 10^{-3}$
β	1,89	0,734	0,325	3,455	$4{,}76 \times 10^{-3}$
γ	-2451	782	-4117	-785	$2{,}12 \times 10^{-2}$

IC est l'intervalle de confiance à 95%

3.4 Bilan et discussion

3.4.1 La croissance

Le tableau 5.5 dresse le bilan des équations proposées pour la croissance de l'épinoche et des valeurs des paramètres de ces équations.

TABLEAU 3.12 – Bilan des paramètres propres à la croissance

Paramètres	**Formules**	**Références**	**Valeurs**
Taux de croissance initiale γ	$f(T) \times f(N) \times \gamma_{max}$	Eq. 3 - 1 & Fig. 3.7	$\gamma_{max} = 0,47$ mm/j (alevins) $\gamma_{max} = 0,35$ mm/j (juvéniles)
Effet de la température f(T)	$\frac{e^{-\alpha(STc_{max}-T_t)}-e^{-\beta(STc_{max}-T_t)}}{e^{-\alpha(STc_{max}-Tc_{opt})}-e^{-\beta(STc_{max}-Tc_{opt})}}$	Eq. 3 - 3 & Fig. 3.8	$\alpha = 0,12 \pm 6,23 \times 10^{-3}$ $\beta = 0,29 \pm 2,18 \times 10^{-2}$ $STc_{Max} = 25,4 \pm 0,627$ °C $Tc_{opt} = 20,1 \pm 0,684$ °C
Effet de la Nourriture f(N)	$min(\frac{N}{N_{max}}, 1)$	Eq. 3 - 4	
Ration de nourriture maximale consommable N_{Max}	$\frac{Q_{Max}}{1+e^{-\alpha \times T+\beta \times ST_{Min}}}$	Eq. 3 - 9 & Fig. 3.4 B	$Q_{Max} = 38,8\%$ $STc_{Min} = 4,56$ °C $\alpha = 0,248$ $\beta = 0,719$
Taille standard maximale L_∞		Tableau 3.8	mâles : $L_\infty = 55,27 \pm 2,03$ femelles : $L_\infty = 61,05 \pm 2,40$

3.4.1.1 Le taux de croissance initial

L'étude de la croissance des juvéniles en conditions contrôlées avait pour but d'estimer le taux de croissance initial des épinoches, ainsi que les impacts de la température et de la nourriture sur ce même taux de croissance.

a- Les phases

Lors des expériences réalisées, deux phases distinctes apparaissent. La première débute lorsque l'épinoche sort de son œuf à l'éclosion et se termine 24 °C.J plus tard. Lors de cette étape, la taille n'est influencée ni par la quantité de nourriture (Fig. 3.6, page 116) ni par la température (aucune différence significative entre les tailles des 941 juvéniles provenant de 48 conditions différentes). Ces observations sont en accords avec les attentes car cette phase correspond à la résorption du sac vitellin. En revanche, la température aura un impact sur le temps de développement des alevins (Swarup, 1958), en particulier sur le temps nécessaire pour la résorption du sac vitellin, marquant la fin de cette étape.

La seconde étape débute après la résorption du sac vitellin. La nourriture (quantité et fréquence de nourrissage) et la température ont alors un effet significatif sur le taux de croissance.

b- Impact de la nourriture

Un fractionnement de la ration quotidienne de nourriture est plus profitable à l'épinoche. Lors des expériences, nous avons privilégié les nauplii d'*Artemia* sp. au détriment des aliments sec car l'épinoche est un prédateur visuel, qui va consommer préférentiellement des proies en mouvement (Wootton, 1984).
Les expériences montrent que quelle que soit la température du milieu, le taux de croissance augmente avec la quantité de nourriture disponible. Ceci aura un impact important sur la dynamique de la population pendant la phase des eaux claires (période pendant laquelle les effectifs de la population augmentent fortement et la nourriture disponible baisse fortement), avec pour conséquence un ralentissement du taux de croissance des individus.

La littérature relève des effets de la quantité de nourriture (Allen et Wootton, 1982; Muller-Feuga, 1990; Wootton, 1984), mais pas du type de nourriture (Lefébure *et al.*, 2011), mêmes conclusions que lors de l'expérience 2.

c- Impact de la température

En raison de l'impact de la température sur le taux de croissance, dans une population qui se développe dans des conditions naturelles, le développement des cohortes ne sera pas le même selon la période. Dans le cas ou les alevins sortent du nid en mai (début de la reproduction, la température de l'eau est proche de 10 ˚C à Verneuil - en - Halatte) ou entre juin et juillet (la température de l'eau est proche de 20 ˚C à Verneuil - en - Halatte), les développements seront différents.

Concernant la température, la seconde expérience met en avant un effet de la température moyenne de l'eau. Cependant, nous n'avons pas testé l'impact de la variabilité de la température pendant l'expérience. En outre, les conditions matérielles pour le maintien de la température dans les aquariums avec un renouvellement important ne permettaient pas de faire fluctuer de façon maitrisée la température dans les aquariums.

Afin d'estimer le taux de croissance en fonction de la température, trois valeurs de températures remarquables ont été estimées. La première est la température minimale de croissance (4.6 ˚C) Cette valeur est la température minimale d'ingestion de la nourriture (estimée par l'équation Eq. 3 - 9, page 112). Les deux autres valeurs ont été estimées à partir de l'équation Eq. 3 - 3 (page 104). Il s'agit de la température optimale de croissance (20,1 ± 0,7 ˚C) et de la température maximale de croissance (25,4 ± 0,6 ˚C).
En premier lieu, il convient de noter que la température minimale de croissance pour l'épinoche référencée dans la littérature est plus basse que celle estimée dans cette expérience. En effet, expérimentalement Allen et Wootton (1982) et Wootton (1984) estiment cette température à 3 ˚C. Par estimation mathématique (méthode des moindres carrés non-linéaires), Lefébure *et al.* (2011) estime la température minimale de croissance à 3,56 ± 0,67 ˚C. Une des explications d'une telle différence entre les estimations pourrait être que dans l'expérience 2 réalisée dans cette étude, aucune condition ne correspondait à une température inférieure à 7 ˚C. Cependant, les données de la littérature concernant les valeurs seuil de température minimale de croissance de Allen et Wootton (1982), Lefébure *et al.* (2011) et Wootton (1984) sont proches de la température létale minimale estimée par Barrett *et al.* (2011) entre 1 et 3 ˚C et donc surprenantes.
La température optimale de croissance estimée dans cette expérience est conforme avec la littérature. Elle varie entre 19 ˚C (définie expérimentalement par Allen et Wootton (1982) et Wootton 1984) et 21,7 ± 0,67 ˚C (définie mathématiquement par Lefébure *et al.* 2011).

Au contraire de la température minimale estimée qui était supérieure à la température minimale recensée dans la littérature, la température maximale de croissance estimée (25,4 ± 0,627 ˚C) est inférieure aux valeurs de la littérature. Ces dernières varient entre 29 et 31 ˚C, respectivement pour une estimation expérimentale ou mathématique (Lefébure *et al.*, 2011). Jobling (1981) a établi une relation linéaire entre la température optimale de croissance et la température létale pour 22 espèces de poissons d'eau douce, dont l'épinoche à trois épines ($T_{Let} = 0{,}76 \times T_{Opt} + 13{,}81$, $r^2 = 0{,}866$). Cette équation permet d'estimer la température létale de l'épinoche, dans nos conditions, à 29 ˚C (avec $T_{Opt} = 20{,}1 \pm 0{,}684$ ˚C). Il est donc logique de trouver une valeur de seuil de température maximale (25,4 ± 0,627 ˚C) pour une activité biologique inférieure à la valeur létale estimée (29 ˚C). Cette valeur létale estimée correspond à la borne inférieure des valeurs de seuil de température maximale de croissance estimée par Lefébure *et al.* (2011) et Wootton (1984). Il est donc logique d'estimer une température maximale de croissance inférieure aux valeurs de la littérature car elles sont égales ou supérieures à la valeur létale estimée pour notre population.

La tolérance thermique de l'épinoche varie selon les populations et est reliée à la température ambiante trouvée dans les habitats d'origine du poisson ou de la température à laquelle il a été acclimaté (Lefébure *et al.*, 2011; Walton *et al.*, 2007). Par conséquent, les différences de seuils de température (en particulier minimale et maximale) entre les estimations de cette étude et les valeurs de la littérature peuvent s'expliquer par l'acclimatation des épinoches à des températures différentes de celles auxquelles les épinoches utilisées par Allen et Wootton (1982), par Lefébure *et al.* (2011) et par Wootton (1984) ont été soumises.

d- <u>Taux de croissance initial</u>

Lors des expériences 1 et 2, le taux maximal de croissance a été observé pour la période entre l'éclosion et la résorption complète du sac vitellin. Les alevins grandissant alors de 0,47 mm/j. D'autres auteurs (Mori et Nagoshi 1987, Cowen *et al.*, 1991 *in* Bell et Foster 1994) ont mesuré des croissances de 0,5 mm / j. Cette observation est conforme avec les attentes, car le sac vitellin contient exactement ce qu'il faut pour que l'alevin grandisse

de façon optimale et indépendamment du niveau de nourriture car il a encore la bouche fermée.

3.4.1.2 Les tailles maximales

La valeur de taille maximale des femelles épinoches dans nos conditions est inférieure aux valeurs de la littérature pour les formes *semiarmatus*. Cependant, elle est conforme aux valeurs trouvées dans la littérature par Bell et Foster (1994) en France (52 à 63 mm). Cette différence entre les observations peut provenir du fait que la taille maximale d'une épinoche est dépendante de facteurs génétiques et de l'environnement (Bell et Foster, 1994). Or, les expériences réalisées pour définir la taille maximale ont été effectuées dans des bacs de 350 L (Georges, 2010). Peut être que l'espace était limitant pour le bon développement de l'épinoche, en particulier sa surface au sol ne permettant pas à chaque individu d'avoir son espace sans être en compétition avec un autre individu. Cette remarque est également valable pour les mâles. De plus, ces derniers en période de reproduction sont beaucoup plus territoriaux et la compétition est très forte entre les mâles. Cependant, les mâles et les femelles fondateurs des mésocosmes ont des tailles finales comprises dans l'intervalle de confiance à 95%. Il est fort probable que les mâles et les femelles dans les mésocosmes ont atteint une taille limite à la fin de l'expérience (120 jours de croissance dans de très bonnes conditions).

3.4.2 La reproduction

Le tableau 3.13 dresse le bilan des équations proposées pour la reproduction de l'épinoche et des valeurs des paramètres de ces équations.

3.4.2.1 La période de reproduction

Les coordonnées géographiques de Verneuil - en - Halatte sont : 49,2833 °N - 2,5167 °E (système géodésique WGS84). Par conséquent, la période de reproduction de l'épinoche débute plus tôt à Verneuil - en - Halatte (entre le 8 et le 11 mars) que dans les latitudes un peu plus au Nord (50 °N) dans lesquelles la période de reproduction commence vers

TABLEAU 3.13 – Bilan des paramètres propres à la reproduction

Paramètres	**Formules**	**Références**	**Valeurs**
Durée de l'IIP (*horizontale*)	$\sum_{t=d_1}^{d_2}(min(T_t - STr_{min}; STr_{max} - T_t))$	Eq. 2 - 6b & Fig. 2.28 A	$STr_{min} = 5{,}88 \pm 0{,}295$ °C $STr_{max} = 21$ °C Durée = 48,1 ± 1,79 °C.J
Durée de l'IIP (*vericale*)	si $T_t \geqslant STr_{max}$: $DJ = 0$ si $T_t < STr_{max}$: $DJ = T_t - STr_{min}$	Eq. 2 - 6c & Fig. 2.28 B	$STr_{min} = 6{,}36 \pm 0{,}345$ °C $STr_{max} = 21$ °C Durée = 45,5 ± 2,12 °C.J
Durée de l'IIP (*intermédiaire*)	$\sum_{t=d_1}^{d_2}(min(T_t - STr_{min}; 2 \times STr_{max} - STr_{min} - T_t))$	Eq. 2 - 6e & Fig. 2.28 C	$STr_{min} = 5{,}95 \pm 0{,}319$ °C $STr_{max} = 21$ °C Durée = 47,9 ± 1,98 °C.J
Nombre d'œufs par cycle et par femelle $NbOeufs$	$\alpha \times Ls + \beta$	Eq. 3 - 5 & Fig. 3.12 A	$\alpha = 5.37 \pm 0,56$ $\beta = -160,29 \pm 28,72$
Nombre d'œufs par mâle $NbOeufs$	$\alpha \times Ls_{mâle} + \beta \times Ls_{totale\ femelles} + \gamma$	Eq. 3 - 8c & Fig. 3.15 A	$\alpha = 56,255 \pm 16,997$ $\beta = 1,89 \pm 0,734$ $\gamma = -2451 \pm 782$
Taille standard totales des femelles $Ls_{totale\ femelles}$	$\sum_{i=1}^{n}(Ls_i - (Ls_{Mat} \times (n-1))$	Eq. 3 - 7	$Ls_{Mat} = 30,26 \pm 5,01$

fin mars (Baker, 1994; Wootton, 1984). Elle se termine également un peu plus tôt (fin septembre à l'INERIS, octobre selon Baker 1994).

3.4.2.2 La taille à la maturité

L'ajustement du modèle de fécondité des femelles (Eq. 3 - 5) a permis d'estimer la taille à la maturité des femelles nourries *ad-libitum* à 30,26 ± 5.01 mm (Eq. 3 - 6). Cette valeur est dans la queue inférieure de la distribution des valeurs recensées en France (▲ Fig. 3.13). La taille à la maturité dans la littérature est très variable (Fig. 3.13) et le minimum rencontré est de 25 mm en Ecosse.

L'effet de la taille maximale sur la taille à la maturité a été observé par Bell et Foster (1994) (Fig. 3.13, page 127) et par Froese et Binohlan (2000). Ces derniers expriment la longueur à la maturité en fonction de la longueur standard maximale des poissons, dont l'épinoche (équation Eq. 3 - 10). Selon les valeurs de longueurs maximales estimées (Tableau 3.8), la taille à la maturité des femelles dans nos conditions serait de 43,70 ± 1,62 mm. Cette estimation est conforme avec la valeur observée lors des expériences réalisées par Georges (2010), dans lesquelles la première différence statistique de la taille standard est observée entre les sexes à 43 mm. Cette observation pourrait correspondre à la taille de maturité, comme le suggère Mori et Nagoshi (1987).

$$\begin{cases} \text{Mâles} & log(L_{Mat}) = 0,8915 \times log(L_\infty) - 0,1032 \quad r^2 = 0,865, n = 115 \\ \text{Femelles} & log(L_{Mat}) = 0,9469 \times log(L_\infty) - 0,1162 \quad r^2 = 0,905, n = 167 \end{cases} \quad \text{(Eq. 3 - 10)}$$

Dans l'Eq. 3 - 10, L_{Mat} est la taille à la maturité et L_∞ la taille maximale. La taille à la maturité est également influencée par la quantité de nourriture (Wootton, 1973b, 1976), cependant pour analyser les données dans ce sens, il faudrait augmenter le nombre de points acquis avec des femelles nourries à 50% d'*ad-libitum*. Cela n'a pas été possible

pendant la thèse en raison d'un manque de femelles prêtent à pondre et nourries à 50% d'*ad-libitum* pendant les expériences.

Enfin pour les mâles, Wootton (1976) mentionne une valeur de 40 mm comme taille standard pour qu'un mâle soit mature, alors que selon Mori et Nagoshi (1987), les mâles et les femelles sont matures approximativement à la même taille.

3.4.2.3 La reproduction des femelles

a- L'intervalle inter-parturition

L'intervalle inter-parturition (IIP) serait dépendant de la nourriture (Bell et Foster, 1994; Poizat *et al.*, 1999; Wootton, 1973b, 1976). Cependant, pour des raisons matérielles, il n'a pas été possible de tester l'impact de la nourriture sur la durée de l'intervalle inter-parturition. Le deuxième facteur influençant l'IIP est la température (Borg et Van Veen, 1982; Boulé et Fitzgerald, 1989; Whoriskey et FitzGerald, 1985; Wootton, 1984).

Les expériences ont montré que les femelles mettent entre 4 et 11 jours selon la température pour produire des œufs. Ces observations sont conformes avec les valeurs recensées dans la littérature (Tableau 3.14). Cependant la période nécessaire à la production des œufs que nous avons observée peut être plus courte car si aucun mâle n'est présent, une femelle à la capacité de conserver quelques heures ses œufs matures dans sa cavité ovarienne avant de les expulser (Wootton, 1984). Lors des conditions expérimentales, aucun mâle n'était présent dans les nasses. Par conséquent, l'intervalle que nous avons observé est l'intervalle maximum. Parmi les trois méthodes de calcul de l'intervalle inter parturition, aucune ne se semble meilleure car la température enregistrée se situe toujours entre les seuils de température.

La mauvaise adéquation entre les prédictions et les observations peut s'expliquer par le fait que les températures étaient enregistrées toutes les 10 minutes alors que les observations des femelles ne survenaient que quotidiennement. Par conséquent, les intervalles inter parturitions observés sont fiables à plus ou moins une journée. Ce décalage d'un jour correspond souvent à l'écart entre les observations et les prédictions des modèles testés (Fig. 3.11 page 123).

TABLEAU 3.14 – Durée de l'intervalle inter-parturition dans la littérature en fonction de la température, pour des femelles nourries *ad-libitum*.

Temp. (°C)	**Durée IIP (jours)**	**Milieux**	**Remarques**	**Références**
6 (F)	17,8 ± 8,5 *impossible*	Laboratoire	-	Boulé et Fitzgerald (1989)
6 (c)	16,3 ± 8,7 *impossible*	Laboratoire	-	Boulé et Fitzgerald (1989)
20 (F)	11,5 ± 5,7 *3.3*	Laboratoire	-	Boulé et Fitzgerald (1989)
20 (C)	8,2 ± 3,7 *3.3*	Laboratoire	-	Boulé et Fitzgerald (1989)
10 - 20	5,0 ± 1,8 *3.3 à 12.8*	Milieu naturel, salinité 25 ppt	Mai 1985	Bolduc et FitzGerald (1989)
15 - 25	5,9 ± 2,9 *3.1 à 5.2*	Milieu naturel, salinité 25 ppt	Juin 1985	Bolduc et FitzGerald (1989)
10 - 20	10,7 ± 4,2 *3.3 à 12.8*	Milieu naturel, salinité 25 ppt	Juin 1986	Bolduc et FitzGerald (1989)
18 - 21	10,5 ± 5,1 *3.1 à 3.9*	Laboratoire	Sex ratio 1 : 1	Bolduc et FitzGerald (1989)
18 - 21	10,7 ± 4,8 *3.1 à 3.9*	Laboratoire	Sex ratio 2 : 1	Bolduc et FitzGerald (1989)
18 - 21	9,3 ± 5,3 *3.1 à 3.9*	Laboratoire	Sex ratio 1 : 2	Bolduc et FitzGerald (1989)
12 & 17,5	2,2 - 7,8 *4.1 & 8.2*	Milieu naturel	-	Brown-Peterson et Heins (2009)

(F) : Fluctuant

(C) : Constant

La durée de l'IIP en italique correspond à l'estimation avec les expériences réalisées,

La durée en script correspond aux observations.

b- La fécondité

Le nombre d'œufs augmente avec la quantité de nourriture (Wootton, 1973b) et avec la taille standard (Bell et Foster, 1994; Kume, 2011; Kynard, 1978; Wootton, 1973b, 1976). Nous pouvons observer une forte variabilité du nombre d'œufs pondus par cycle de reproduction. Cette variabilité n'est pas inhérente à nos données. Elle est également observée par d'autres auteurs dans la littérature (Kraak et Bakker, 1998; Mori, 1987a; Wootton, 1976). Ainsi, les observations que nous avons réalisées se situent dans le nuage de points des observations des autres auteurs (Fig. 3.16).

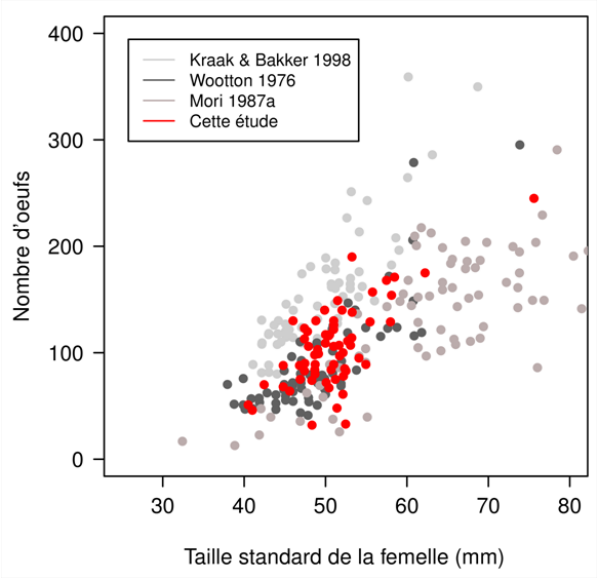

FIGURE 3.16 – Comparaison des données acquises (condition de nourriture *ad-libitum*) avec la bibliographie (Kraak et Bakker, 1998; Mori, 1987a; Wootton, 1976).

Dans la littérature, le diamètre des œufs pondus est très variable (Bell et Foster, 1994; Mori, 1987a; Poizat *et al.*, 2002; Wootton, 1976). Les auteurs observent des œufs mesurant en moyenne 1,45 ± 0,11 mm ([1,0 - 1,9] mm). C'est-à-dire que les diamètres observés dans nos conditions sont dans la fourchette haute des observations de la littérature.
Cependant, ces différences de diamètres ne sont ni corrélés avec la latitude en Europe (Bell et Foster, 1994) ni avec la taille de la femelle (Bell et Foster, 1994; Mori, 1987a; Wootton, 1973a,b, 1976), ni avec le niveau de nourriture (Poizat *et al.*, 1999; Wootton, 1973b). Il

s'agit donc vraisemblablement d'une caractéristique liée à la population.

La masse sèche d'un œuf moyen de la ponte dans cette expérience (0,46 à 0,52) est 1,5 à 1,7 fois plus importante que celle observée par Wootton (1973b) alors que les protocoles de séchage sont les mêmes (24h à 105 °C). Dans nos résultats, nous mettons en avant un effet de la nourriture sur la masse d'un œuf moyen issu d'une ponte. Cette observation, partagée par Georges (2010) n'est pas partagée par Wootton (1973b). Ce résultat peut s'expliquer par le fait qu'un apport de nourriture plus important pour les femelles leur permettent d'offrir plus de réserves lipidiques à leurs œufs et donc les rendre plus lourds que des œufs issues de femelles ayant des carences alimentaires.

3.4.2.4 La reproduction des mâles

Un mâle peut recevoir des œufs de plusieurs femelles dans son nid (Bell et Foster, 1994; Östlund Nilsson *et al.*, 2007). Ce nombre peut aller jusqu'à 30 (Kraak *et al.*, 1999b). Cependant, les observations en milieu naturel montrent que le comportement reproducteur diminue en fonction du nombre de fertilisations effectuées, et qu'il est quasiment nul après 5 pontes ou 4 ou 5 jours après la première ponte (van Iersel, 1953; Wootton, 1976).

Le nombre d'œufs collectés est très variable dans la littérature. En moyenne, un mâle peut collecter entre 627 (Poulin et Fitzgerald, 1989) et 2638 (Mori, 1987a) œufs par nid (observations terrains). Le maximum observé sur le terrain atteint 4052 œufs collectés (Mori, 1987a). Dans nos conditions, les mâles ont collectés au maximum 710 œufs.
La littérature affirme que le nombre d'œufs collectés ne dépend pas de l'âge des poissons (Dufresne *et al.*, 1990) ni par la température (Kraak *et al.*, 1999a). En revanche, le nombre d'œufs collectés est dépendant de la longueur standard du mâle (Kraak *et al.*, 1999a) ainsi que de la date de la première ponte (Kraak *et al.*, 1999a; Sargent *et al.*, 1995) et de la capacité limite d'accueil du mâle (Kraak *et al.*, 1999a). Enfin, si deux femelles arrivent en même temps, le mâle privilégie la femelle la plus grosse (car elle est susceptible de déposer plus d'œufs) sinon le mâle attire la première venue (Bell et Foster, 1994; Ishikawa et Mori, 2000; Wootton, 1984).
La taille totale des femelles définie pour le calcul du nombre d'œufs prend en compte cette

notion de l'effet de la taille de la femelle. Mais elle s'affranchit de l'ordre et du temps de collecte, car les nids sont construits dans des endroits clos ou la prédation hétéro-spécifique et la compétition entre les mâles est nulle. Par conséquent, un mâle courtisera toutes les femelles qu'il pourra pour atteindre sa capacité parentale limite. Cependant, la limite de notre modèle proposé est qu'il est linéaire et n'est pas borné. Ceci signifie que mathématiquement, un mâle peut collecter un nombre négatif d'œufs (*e.g.* : un mâle de 20 mm courtisant une femelle de 40 mm collectera -1250 œufs. De plus, la taille des femelles n'est pas limitée. Un mâle peut capter autant d'œufs qu'une femelle (ou qu'une somme de femelle) lui apporte. Ce nombre d'œufs est proportionnel à la taille de la (ou des) femelle(s). Enfin, ce modèle est valable dans le cas ou il n'y a pas de compétition pour l'espace et pour les femelles. Or, une femelle peut pondre dans plusieurs nids afin d'augmenter la survie de sa progéniture, selon les dispositions du mâle (Bell et Foster, 1994; Kraak *et al.*, 1999b; Östlund Nilsson *et al.*, 2007).

3.5 Conclusions

Ce premier chapitre permet de définir le cycle de vie de l'épinoche dans les conditions de Verneuil - en - Halatte. En particulier, ce chapitre défini des tailles importantes pour l'épinoche et s'intéresse à deux processus que sont la croissance et la reproduction, tant pour les mâles, que pour les femelles. Ces deux processus sont étudiés en fonction de différent facteurs (température, nourriture, taille standard des individus, etc.) qui, dans les chapitres suivant, pourront permettre d'expliquer ce qui se passe au niveau de la population dans les conditions expérimentales proposées.

CHAPITRE 4

MISE AU POINT DES EXPÉRIENCES EN MÉSOCOSME

4.1 Introduction

Un protocole standardisé d'expérience en mésocosme a été proposé (chapitre 2.3, page 57). Dans cette partie, nous expliciterons le cheminement qui, de retours d'expériences en points bibliographiques nous a permis d'éclairer les choix effectués pour parvenir à ce protocole, en justifiant ou en réfutant les procédures précédentes. Nous proposerons parfois de nouvelles pistes pour aller plus loin dans la standardisation.

Ce chapitre suit la chronologie de l'expérience. Dans la première partie, une attention particulière sera portée aux populations d'épinoches fondatrices (nombre, sex ratio...). La suite chronologique nous amènera à justifier et expliquer les méthodes employées pour suivre la phase expérimentale (environnement, communautés...). Enfin, la méthodologie mise en place à la fin des expériences pour récupérer toutes les populations sera abordée avant d'achever ce chapitre par une comparaison entre les années.

4.2 Les fondateurs

Avant le début de cette thèse, *"70 épinoches adultes mesurant 35 ± 6.6 mm (IC 95% [22 - 47] mm) étaient introduit aléatoirement dans les canaux"* (Roussel, 2005). Ces conditions ont été révisées.

4.2.1 Sexage des fondateurs

Un travail important a été conduit afin de définir avec certitude le sexe des épinoches. Dans un premier temps, les épinoches ont été sexées en les décalant artificiellement par des modifications de la température et de la photopériode qui permettent de développer les caractères sexuels secondaires (Östlund Nilsson *et al.*, 2007). Pour ce faire, une photopériode de 14 / 8 h (jour / nuit) et une eau à 18 °C ont permis de maintenir les poissons jusqu'à ce qu'un nombre de poissons suffisant ait été sexé (ventre rond pour les femelles, yeux bleu et gorge rouge pour les mâles). Les poissons ont été introduits dans les mésocosmes le jour ou la photopériode était favorable à la reproduction.
L'inconvénient d'une telle méthode est qu'elle augmente le stress des épinoches avant leur introduction dans les mésocosmes. De plus, l'identification n'est pas toujours fiable. Ainsi, 4% d'erreurs ont été constatés entre les sexes prédits et les sexes réels. En effet, le sexe a été observé par dissection à la fin de l'expérience sur les individus fondateurs, identifiés grâce à leur tag.
A partir de 2011, la méthode de sexage utilisée a été celle développée dans le cadre de cette thèse (*Cf.* Article 1, Annexe E page 293). Avec la méthode de sexage par analyse de la morphologie céphalique, aucune erreur n'a été observée lors de la récupération des individus en fin d'expériences.

4.2.2 Stades de maturité des fondateurs

Les poissons introduits sont matures afin d'assurer une reproduction pendant toute la période de reproduction. Dans le cas où le choix se serait porté sur l'introduction de juvéniles (moins de 25 mm), les expériences auraient ciblé la croissance des individus au niveau d'organisation de la population, sans prendre en compte la survie et la reproduction (sauf éventuellement à la fin de l'expérience en prenant des individus de plus de 20 mm

au début). En prenant des fondateurs matures, tous ces paramètres sont pris en compte : la croissance des alevins jusqu'aux individus adultes et matures (les épinoches issues de la première reproduction peuvent mesurer plus de 40 mm à la fin de l'expérience, chapitre 5), la survie de tous les stades de développement (depuis l'œuf jusqu'aux fondateurs taggués) et la reproduction, présente et visible par l'estimation des effectifs.

4.2.3 Effectifs introduits

Le nombre de mâle introduits a été définit pour que tous les mâles puissent construire un nid. Nous avons considéré qu'il fallait une superficie de 2 m^2 par mâle pour établir son territoire (le minimum est de 0,1 à 0,2 m^2 et le maximum est de 1,5 m^2 pour établir un nid d'après van den Assem, 1967; Wootton, 1985). Ainsi, 10 mâles sont introduits dans les canaux au début des expériences. Le but de ce nombre est de maximiser le nombre de mâles dans les canaux pour maximiser le nombre d'individus dans la population par une reproduction optimisée en terme de possibilité d'effectif. Cependant, une marge de sécurité a été définie pour limiter la compétition entre les mâles pour le territoire. De plus, le fait de ne pas saturer la surface des mésocosmes pour la reproduction permet aux mâles issus de la reproduction de l'année de construire un nid si leur taille le permet. Le nombre de femelles est supérieur au nombre de mâles afin que chaque mâle ayant construit un nid au début de l'expérience puisse récolter des œufs provenant d'une ou plusieurs femelles. Nous avons donc décidé d'introduire 15 femelles. Ce nombre offre un sex-ratio de 60% (en faveur des femelles) qui permet de ne pas être totalement déséquilibré. Un sex-ratio déséquilibré (1 mâle pour 2 femelles) pourrait avoir des répercussions importantes sur la reproduction des mâles (Ward et FitzGerald, 1988) : dans cette étude, seule la moitié des mâles ont construit un nid, contre 100% dans le cas d'un sex-ratio équilibré ou avec plus de mâles que de femelles (en marais salant au Québec).

4.2.4 Tailles standard des fondateurs

La taille initiale des poissons fondateurs est précisément définie et doit être homogène pour les mâles et pour les femelles. Ainsi, les tailles standards des fondateurs d'un même sexe étant proches, leurs stades de développement sexuels seront similaires et la date de

la première reproduction (apparition des premiers alevins) sera synchronisée, facilitant l'analyse de la dynamique de population.

4.2.5 Identification des fondateurs

Les poissons fondateurs sont identifiés par des tags alphanumériques. Des expériences ont été réalisées pour montrer que la pose d'un tag n'influe ni sur la croissance, ni sur la taille des poissons (Georges, 2010).
La société vendant ces tags propose différentes couleurs. En 2010, le choix s'était porté sur le "orange", afin qu'un poisson avec un tag puisse être visuellement identifié facilement et rapidement. Or, la taille du poisson est un facteur visuel plus discriminant qu'une petite plaque de couleur difficilement visible dans les canaux. Lors de la récupération des poissons à la fin de l'expérience, la survie était extrêmement variable d'une population à une autre (20 à 85 % de survie). Selon McKinnon et McPhail (1996), la couleur d'une épinoche (en particulier la présence de rouge sur la gorge) n'augmente pas sa probabilité d'être attaquée. De plus, le tag est placé à un endroit où n'apparaît pas de coloration sexuelle. Donc nous supposons que la couleur n'a pas posé de problème. Cependant, par souci de précaution, nous avons opté pour une couleur verte, proche de la couleur de la peau des épinoches.

4.2.6 Conditionnement des fondateurs avant leur introduction

Lors de la sélection des poissons et de la pose du tag, les poissons subissent un stress important, propice au développement des maladies.
Afin de limiter la mortalité liée aux manipulations des individus (sexage et pose du tag) et à leur introduction dans les canaux, plusieurs conditionnements ont été testés. En 2010, les individus ont été placés dans des aquariums de 10 L en ne séparant pas les sexes (lot de 15 femelles et 10 mâles par aquarium). L'eau des aquariums était renouvelée en continu. La mortalité a été importante car 24 individus sont morts (soit 8% des individus introduits).
En 2011, les poissons ont été répartis dans des aquariums (10 L) montés en série en circuit ouvert. Deux aquariums ont été utilisés pour chaque population, afin de séparer les mâles

(10 individus) des femelles (15 individus). Les aquariums sont alimentés en eau en continu et un bullage est mis en place. Tous les deux jours, les bacs ont été nettoyés (chironomes non mangés et excréments enlevés) et du sel a été ajouté (à la concentration de 3 g/L) pour limiter le développement de maladie. Des plaques opaques et grises ont été placées devant les aquariums afin de limiter le stress des poissons. Sept morts ont été observés (sur 300 poissons introduits, soit 2,3%).
Le protocole mis en place en 2011 était lourd en termes d'organisation. Par conséquent, en 2012, les poissons ont été placés dans des bacs plus grands, dans lesquels étaient installés des nasses de séparation. Les bacs étaient alimentés en continu en eau. Cependant, ces conditions ont affecté la survie des poissons. Pendant cette phase de stabulation, 50 individus sont morts, soit 17% des individus qui devaient être introduits.

Une nouvelle méthode de stabulation a été proposée et testée sur l'expérience 2013. Les poissons, après avoir été sexés et tagués, ont été mis dans des bacs de 350 L d'eau et ils ont été transférés sur la plate-forme dès la fin de la sélection et de la pose des tags des fondateurs. Une dose de sel (3 g/L) a été ajoutée juste avant le transfert des poissons sur la plate forme. Ces conditions leur permettent de s'adapter progressivement à des conditions climatiques plus naturelles (variations de la température, de la photopériode, changement de temps...) et à l'eau des systèmes, comme le conseille l'OCDE (2006). Seuls 2 individus sont morts entre la fin des manipulations et l'introduction dans les canaux.

Le tableau 4.1 résume les différents conditionnements et les mortalités induites.

TABLEAU 4.1 – Les conditionnement des fondateurs selon les années.

2010	**2011**	**2012**	**2013 et après**
Campagne témoins	Campagne témoins	Cas d'étude : BPA	Conseils pour les futures campagnes
Aquariums de 10 L, un aquarium par population (15 femelles et 10 mâles)	Aquariums de 10 L, deux aquariums par population (un pour les femelles, un pour les mâles), ajout de sel (3 g/L)	Deux nasses pour chaque population placée dans de grands bacs (100 L), ajout de sel (3 g/L)	Bacs de 350 L placés sur la plate-forme, une dose de sel (3 g/L) ajouté lors du transfert des poissons
8% de mortalité	2,3% de mortalité	17% de mortalité	$< 1\%$ de mortalité

4.3 Le suivi durant l'expérience

4.3.1 La physico-chimie

La variabilité journalière est très importante dans les mésocosmes. C'est pourquoi, indépendamment de la variable suivie, il y a aura de grandes différences entre deux mesures selon l'heure à laquelle elles sont réalisées. A titre d'illustration, la température de l'eau peut avoir une amplitude journalière de 7°C (Fig. 4.1) en juillet. Il en est de même pour les autres variables physico-chimiques. Pour avoir des mesures comparable dans le temps, les mesures sont prises à l'heure du zénith (midi solaire).

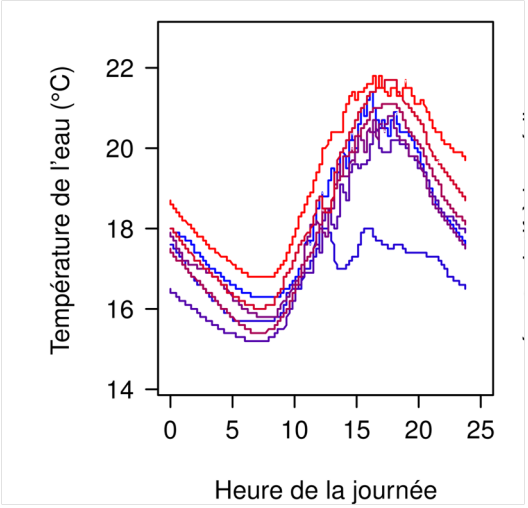

FIGURE 4.1 – Variabilité journalière de la température, pas de temps de 5 minutes, 7 jours de mesures dans les mésocosmes. *Les données du graphique ont été acquises par Georges (2010)*

4.3.2 Le suivi de la structure de l'habitat

Afin de mieux suivre les macrophytes, l'estimation du volume a été améliorée. En 2010, le volume occupé par chaque espèce était estimé en définissant des indices de "surfaces occupées" (4 classes également réparties entre 0 et 100 % d'occupation). De même pour la hauteur (3 classes également réparties entre 0 et 100 % d'occupation). Le volume était estimé tous les 15 jours. Un tel protocole ne donnait pas entière satisfaction quant au niveau de détail et de précision. C'est pourquoi, à partir de 2011, les macrophytes ont été photographiés mètre par mètre afin d'estimer plus précisément la surface occupée par les différentes espèces.

La mesure de la biomasse de périphyton a elle aussi évolué. Plus précisément, des expériences complémentaires (réalisées par S. Joachim) ont porté sur l'influence de l'emplacement, du nombre de pièges et du temps de colonisation. Les résultats montrent qu'il est préférable de continuer à étudier la biomasse à deux endroits le long des parois (en amont et en aval), de placer 10 pièges (lames de microscope) par emplacement et d'immerger les lames durant 4 semaines.

4.3.3 Le suivi des proies et des prédateurs de l'épinoche

A partir de 2011, l'effort d'échantillonnage du zooplancton a été augmenté légèrement en prélevant 5 L d'eau en amont et 18 L en aval au lieu de 4.75 et 15.75 L avant 2011, La détermination s'effectue au niveau de l'embranchement ou de la classe. Ces niveaux sont suffisants par rapport au niveau de détails nécessaire pour l'analyse des données (estimations des ressources alimentaires de l'épinoche, chapitre 2.4.2, page 82).
Cependant, la détermination est longue, fastidieuse et exige un niveau de connaissance poussée. Il faut donc prévoir du temps de personnel spécialisé dédié. Pour les expériences des années 2010 et 2011, il a donc fallu faire appel à un sous-traitant qui a analysé les échantillons conservés dans de l'éthanol en attendant leur identification.

Tout comme pour le périphyton, des expériences complémentaires ont été réalisées sur les estimations des effectifs de macro-invertébrés afin d'étudier l'influence de l'emplacement et du nombre de pièges ainsi que du temps de colonisation de ces derniers. Ces

paramètres ont été déterminés en fonction de l'abondance et de la diversité des échantillons de macro-invertébrés prélevés. Les résultats montrent qu'au bout de quatre semaines de colonisation, une communauté de macro-invertébrés plus abondante et plus diversifiée est présente sur les différents pièges.
L'information qui ressort des ces expériences est également qu'il faut conserver les trois types de pièges : tube, tuiles et parois car les communautés qui s'y développent sont différentes.

4.3.4 L'estimation de l'effectif des populations d'épinoches

4.3.4.1 La dérive des juvéniles

Avant 2010, la dérive des juvéniles n'était pas suivie. En 2010, ce suivi a été quotidien (jusqu'au 9 juin). Lorsque le bilan de l'expérience fut dressée, ce suivi de la dérive des juvéniles est apparu comme important car il renseigne sur la dynamique de population de l'épinoche, en particulier sur les différents pics de reproduction qu'il peut y avoir au cours de la saison, avec un pas de temps fin car il est de 24h. C'est pourquoi, il a été décidé de continuer à suivre la dérive des alevins et des juvéniles quotidiennement au cours des expériences.

Lors de l'établissement du protocole, il a été décidé de réintroduire les alevins et les juvéniles qui ont dérivé. Cette décision n'est pas neutre car elle implique une intervention anthropique, alors qu'un mésocosme doit être un outil "auto-suffisant" (Perceval *et al.*, 2009), donc sans intervention extérieure pour son fonctionnement. Nous avons considéré que le biais introduit par la dérive ajoutait une variabilité supplémentaire entre les canaux, qui était réduite par la ré-introduction.

Afin d'être plus performant et d'être sûr de ne pas avoir de perte d'individus, les nasses en sortie des mésocosmes ont été refaites. Elles sont, depuis 2011, d'une seule pièce et la maille a été travaillée pour limiter le colmatage. Avant, les nasses étaient en deux parties et la maille se colmatait très rapidement.

4.3.4.2 L'estimation des effectifs de la population par suivi visuel

Cette méthode est longue (10 minutes par canal de façon hebdomadaire) mais les résultats qui en découlent sont importants car ils permettent de définir les dates des grandes étapes de la dynamique de la population en complément de la dérive.

Les différents stades observés sont les suivants. Le premier stade est la construction des nids (considéré en 2012 afin d'avoir accès au paramètre "début de la reproduction"). Le second stade est celui de l'apparition des alevins de moins de 10 mm. Ce stade peut être ensuite comparé avec le suivi de la dérive. Ce point est crucial car il définit le moment où les effectifs de la population vont fortement augmenter (plus de 100 juvéniles par mâles). Puis, nous cherchons à observer des classes de tailles de 5 mm ([10 - 15[mm, [15 - 20[mm, $>$ 20 mm). Ces classes de tailles permettent de suivre assez finement les cohortes. Enfin, les fondateurs (lorsqu'ils sont aperçus) sont notés pour nous donner une idée de leur survie. Cependant, nous savons par expérience qu'ils se cachent dans les végétaux et que les estimations de survie ne peuvent pas se baser uniquement sur ces observations.

Les résultats d'un suivi visuel dépendent de l'expérience (au sens de l'ancienneté) et de l'expérimentateur. Il faut que l'œil se forme pour juger de la taille d'un poisson évoluant dans son milieu. Des effets de loupe sont très présents et profondeur-dépendants, ce qui rend difficile l'estimation de la taille d'un poisson pour un œil non-averti. Les estimations seront rendues plus difficiles encore lors d'un temps couvert, qui assombrit les couleurs dans les canaux, atténuant la visibilité des poissons.

4.3.4.3 L'estimation des effectifs de la population par échantillonnage

a- <u>Choix de la méthode</u>

L'échantillonnage des populations permet d'avoir un suivi quantitatif. Il existe plusieurs méthodes d'échantillonnage de populations fermées (sans échange avec d'autres populations de poissons). Parmi ces méthodes, la méthode des captures successives (Laurent et Lamarque, 1975) et la méthode de capture, marquage, recapture (CMR) sont les plus utilisées. La méthode des captures successives à l'avantage d'être peu couteuse en matériel

car il suffit d'effectuer plusieurs captures espacés dans le temps.

La méthode CMR est souvent utilisée pour estimer les effectifs de poissons (Rakowitz *et al.*, 2009) et plus particulièrement l'épinoche à trois épines (Gíslason *et al.*, 1998; Wootton, 2010). Du fait de la grande diversité de designs expérimentaux pour la CMR (recaptures multiples, avec ou sans marquage, suivi individuel des recaptures...) de nombreuses méthodes sont disponibles dans la littérature. Notre choix s'est porté sur une capture marquage avec recapture unique sur une population fermée.

L'hypothèse de base pour valider cette méthode repose sur un effort de pêche équivalent pour toutes les pêches. Cet effort de pêche est défini par le Conseil Européen (2002) dans l'article 3-h comme le produit de la capacité de pêche par l'activité. La capacité de pêche sera non uniforme, sauf si des pièges sont répartis. Pour les deux méthodes, pour éviter la capture des fondateurs, les pièges non sélectifs ne sont pas utilisables. En l'absence de pièges, un effort de pêche constant est difficilement réalisable. La solution retenue a donc été un temps de pêche constant à l'épuisette en excluant les fondateurs. Un effort de pêche variable peut biaiser les résultats obtenues par les deux méthodes, mais entrainerait un biais important pour la méthode des captures successives. De plus, la méthode d'estimation basée sur la CMR permet de capturer beaucoup moins de poissons (potentiellement stressés) et elle est beaucoup moins sensible que la précédente aux différences d'effort de pêche entre les sessions. Ainsi, cette méthode a été appliquée depuis 2010 dans le cas de nos expériences pour estimer l'effectif de la population à un temps t.

b- <u>Déroulement</u>

Lors des trois années d'expérience, seuls trois des 12 canaux ont été échantillonnés à chaque estimation d'effectifs (tous les 21 jours) afin de limiter les perturbations subies par les populations. En effet, le temps entre 2 CMRs successives dans un même canal a été ainsi de 45 jours. Cette méthode a été mise au point pour étudier la dynamique de population témoins avec 12 canaux suivis dans la même condition. Cependant, elle ne semble pas bien adaptée à la mise en évidence d'effet d'un contaminant sur les populations. Ainsi, lors

de l'expérience 2012, la comparaison à différents temps, d'un seul canal par concentration a donné des résultats limités en raison de la forte variabilité intra-traitement enregistrée.

c- Estimation des effectifs et incertitude

L'utilisation de la méthode de CMR pour estimer les effectifs nécessite que les conditions suivantes soient respectées :

- Les individus ont tous la même probabilité de capture ;
- Les individus marqués sont représentatifs de la population totale ;
- Le marquage n'affecte pas le comportement ni la probabilité de capture ;
- Le marquage subsiste entre les deux captures et est reconnu lors de la recapture ;
- Les individus marqués se mélange à la population totale ;
- - Il n'y a pas de mortalité, naissance, émigration, immigration entre les deux épisodes de capture = population fermée.

Le non respect de ces conditions peut entraîner un biais de l'estimation. De même, plusieurs auteurs ont montré l'importance des effectifs capturés et recapturés pour l'incertitude de l'estimation (Robson et Regier 1964, Fig. 4.2).
Ainsi, plus le nombre de poissons capturés et recapturés est important, plus l'incertitude est faible. L'analyse de l'incertitude montre également qu'elle augmente avec le nombre de poissons réels (Fig. 4.2). Afin d'avoir un bon compromis entre l'effort d'échantillonnage et le fait de ne pas trop impacter le milieu, il a été défini que l'effort de pêche devait être de 20 minutes pour pêcher 10 à 15 % de l'effectif de la population.

Un marquage par balnéation au brun de Brismark permet de respecter les hypothèses de la CMR. Cette méthode permet de marquer collectivement un lot important de poissons de toutes tailles (10 à 80 mm) pendant 24 à 48 h. Une série d'expériences a été réalisées par Georges (2010) pour définir la concentration de colorant et le temps de balnéation. Il s'est basé sur les résultats de Boutry (1983) pour établir qu'il fallait marquer les épinoches avec du brun de Brismark à la concentration de 0,05 g/L pendant 40 minutes (test réalisé sur des juvéniles mesurant moins de 10 mm). De plus, par un test à l'aveugle, il a été vérifié que les poissons étaient facilement identifiables.

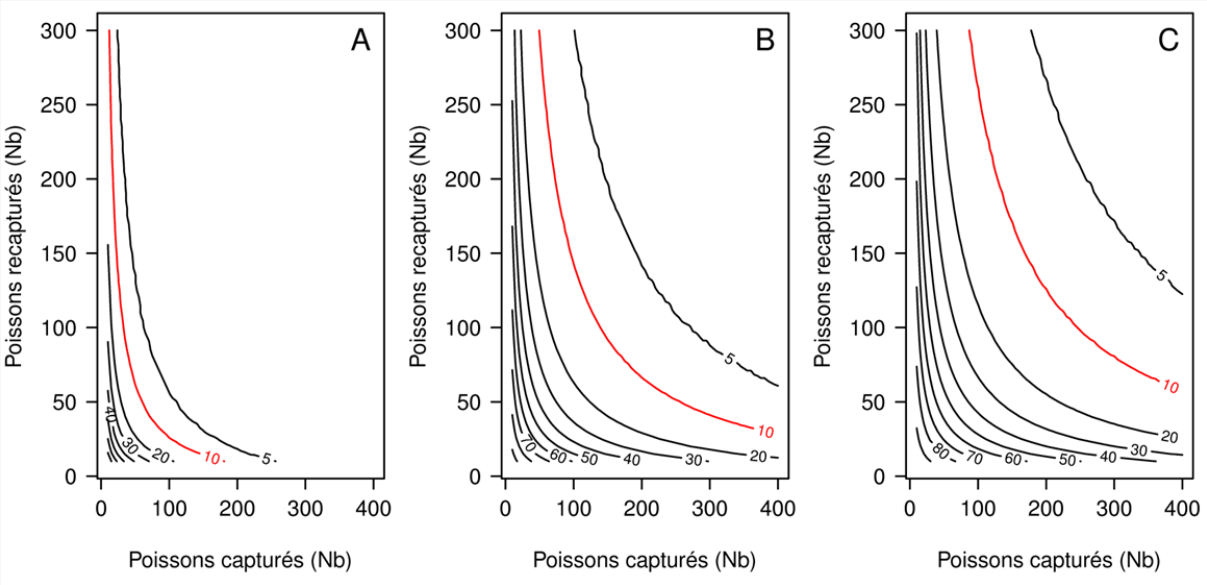

FIGURE 4.2 – Incertitude maximum à 95% de l'estimation de l'effectif en fonction de l'effectif réel (A : 400, B : 1700, C : 3000) et du nombre de poisson capturé et recapturés (Méthode de Bailey, 1952, éq. Eq. 2 - 5, p. 73). La ligne rouge correspond à une incertitude de 10 %.
Pour la simulation, le nombre de poissons capturés testé est une séquence comprise entre 10 et 400 (pas de 5) et le nombre de poissons recapturé est compris entre 10 et 300 (pas de 5). Chaque valeur est combinée pour estimer l'effectif de la population.

Afin de réduire le taux de mortalité accidentelle dû aux manipulations durant la CMR, il faut réduire le stress dû aux différentes captures. Bell *et al.* (2010) ont montré que le stress induit chez le poisson modifie son comportement. Par conséquent, lors de la réalisation des captures il ne faut pêcher qu'une seule fois le poisson, puis ensuite il faut seulement transvaser d'un bac à un autre afin de limiter les sorties de l'eau.

d- Validation des estimations par CMR

Pour vérifier la qualité des estimations obtenues avec les CMR, nous en avons réalisé juste avant la récupération des populations en fin d'expériences. En 2010, trois populations ont été échantillonnées, cinq en 2011 et douze en 2012. Les effectifs estimés lors de ces échantillonnage par CMR ont ensuite été comparés aux effectifs réels obtenus lors de la récupération des populations sept à dix jours après (Fig. 4.3 A.). L'erreur commise ($100 \times \frac{E_{estimé} - E_{réel}}{E_{réel}}$, Fig. 4.3 B.) n'est pas significativement différente entre les années 2010 et 2011 Dunnett, $p = 0{,}4365$), ni entre 2010 et 2012 (Dunnett, $p = 0{,}5334$). En revanche, les erreurs commises en 2011 sont significativement supérieures à celles commises en 2012 (Dunnett, $p = 0{,}0213$).

Les données laissent apparaître que les erreurs commises augmentent avec les effectifs. Nous avons proposé un modèle pour corriger les effectifs estimés par CMR ($N_{estimé}$). Un modèle linéaire semble relier l'effectif réel avec l'erreur commise (4.3 B). Une variabilité résiduelle importante est cependant observées et se traduit par un faible coefficient de détermination entre les erreurs prédites et les erreurs observées ($r^2 = 0{,}4045$, ssq = 2100, Fig. 4.3 B, —). Lorsque l'erreur simulée est ajouté aux effectifs estimés ($N_{corrigé} = N_{estimé} + Erreur \times N_{estimé}$), nous constatons une sous-estimation du nombre total d'individus dans la population Fig. 4.3 C).

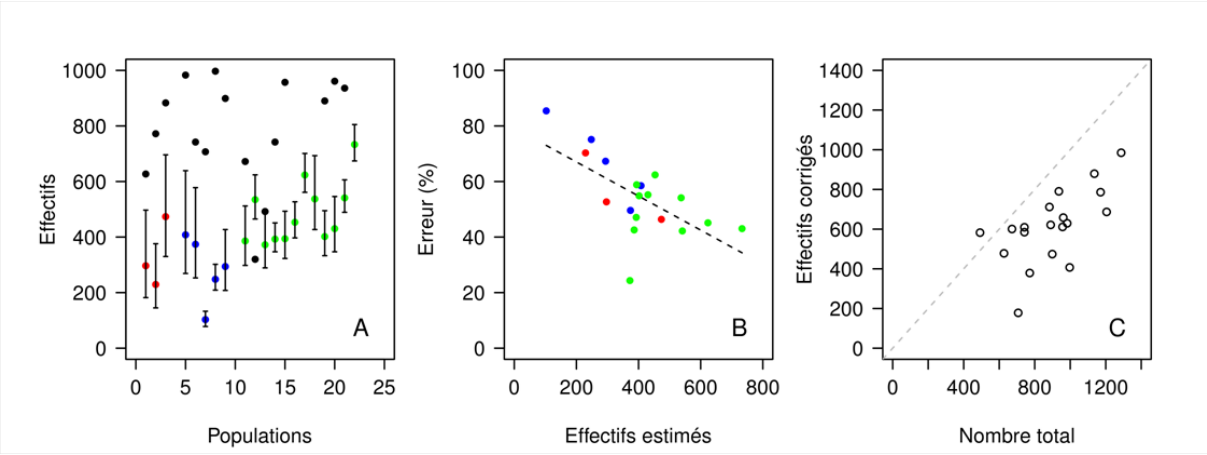

FIGURE 4.3 – Présentation des résultats des dernières CMR comparés au nombre d'individus récupérés à la fin de l'expérience pour les trois années : 2010 (●), 2011 (●) et 2012 (●).
A : (●) Les estimations des effectifs (boite à moustache) sont comparées aux effectifs observés à la fin de l'expérience
B : (- -) Expression des erreurs commises en fonction des effectifs estimés. Modèle linéaire : $-0,0613 \times N_{estimé} + 79.3$
C : (o) Estimations des effectifs corrigés en fonction du total d'effectif observé $N_{corrigé} = N_{estimé} + Erreur \times N_{estimé}$

e- Causes du biais

⇒ Effectifs capturés trop faible

Dans notre cas, les populations sont de l'ordre du millier d'individus. Lors de la réalisation des CMR, nous capturons entre 80 à 400 poissons. Lors de la recapture, nous avons 90 à 415 individus. Ainsi, nous ne capturons pas assez de poissons par rapport aux nombre de poissons recapturés. Nous avons donc une erreur qui varie entre 10 et 50 % par rapport au nombre réel de poissons (Fig. 4.2)

Afin d'essayer de limiter l'erreur commise lors de l'estimation de la population par CMR, il a été proposé d'augmenter l'effort de pêche en augmentant le temps de capture. Pour tester cette hypothèse, lors des dernières CMR en 2012, le temps de pêche a été de 40 minutes dans 4 canaux, au lieu de 20 minutes. Cependant, l'erreur commise n'a pas été significativement modifiée par la durée de l'effort de pêche (ANOVA ; ddl résiduels = 9 ; p = 0,595). L'effort de pêche n'influant pas l'estimation des effectifs nous pouvons donc supposer que le biais observé n'est pas lié à un nombre de poissons capturés trop faible.

⇒ Probabilité de captures différente selon la taille des individus

Un différentiel de probabilité de capture selon la taille est une source d'erreur systématique pour l'estimation de l'effectif des populations. La détection de ce biais peut se faire en comparant les taux de recapture de poissons marqués selon les tailles, dans le cas où le nombre de recapture est suffisant pour minimiser les effets d'erreur d'échantillonnage.

Afin de tester cette hypothèse, les estimations sont réalisées en divisant les populations en classes de taille de 5 mm. Ces essais sont réalisés uniquement pour les populations de 2010 et 2011, En 2012, les photos ne permettent pas d'obtenir l'information individualisée nécessaire (problème de netteté).

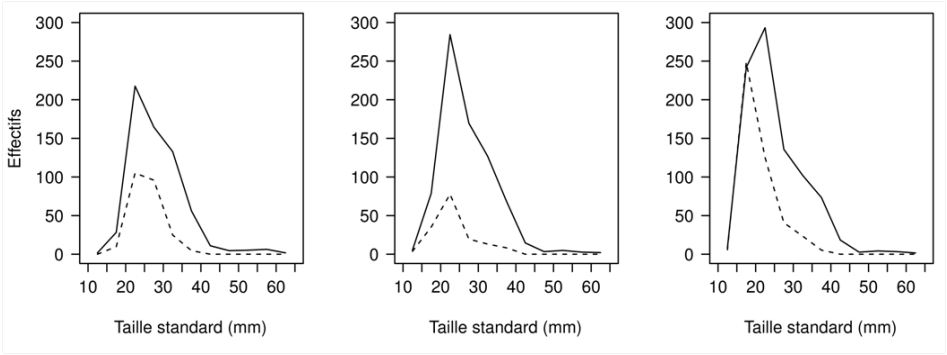

FIGURE 4.4 – Estimation des effectifs par classe de taille de 5 mm pour trois populations en 2010 (Méthode de Bailey).
Populations estimées (- -) et populations réelles (—).

L'effectif des populations est sous estimé dans toutes les populations pour toutes les classes de taille (Fig. 4.4). Seule la classe de taille]15-20] pour une population est estimée avec une faible erreur. Il semble donc que le différentiel de probabilité de capture ne se fasse pas selon la taille des individus mais sur toute la population. Ce point est appuyé par le fait que la répartition par classe de tailles de 5 mm des effectifs capturés est conforme avec la répartition par classe de taille de la population réelle (Fig. 4.5 et Fig. 4.3).

En conclusion, les échantillons représentent bien la répartition des populations (Fig. 4.5), mais l'estimation des effectifs est inférieure aux effectifs réels (Fig. 4.4).

⇒ Une partie de la population n'est pas accessible

Notre dernière hypothèse concerne l'écosystème reconstitué. En effet, le cresson, par la densité de ses racines dans la partie amont des mésocosmes procure une véritable maille de

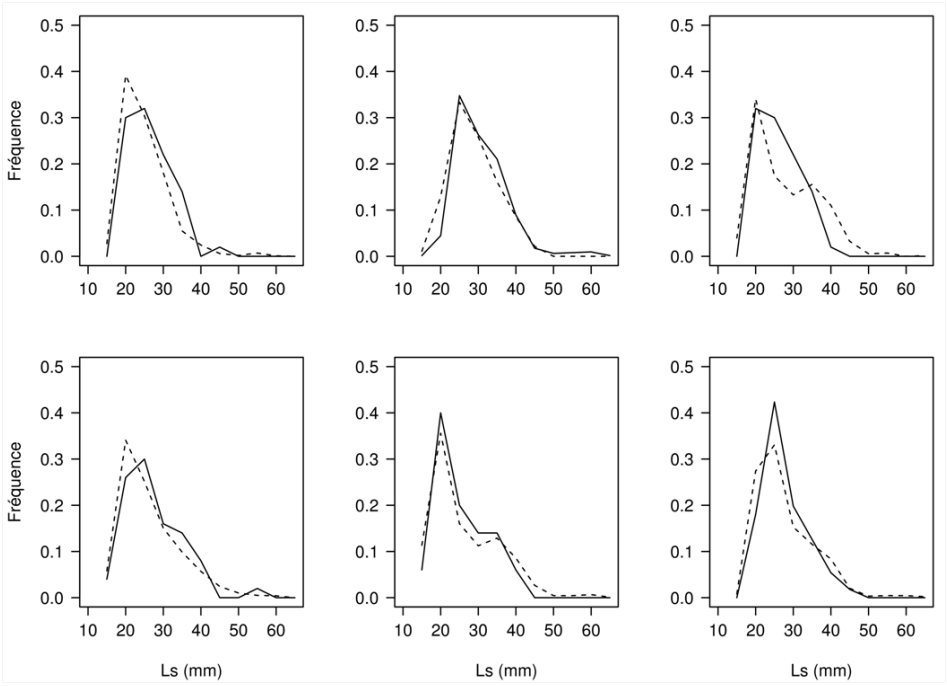

FIGURE 4.5 – Estimation des proportions capturés (- -) et réelles (–) par classe de taille de 5 mm pour trois populations en 2010 et trois population en 2011,

protection, dans lesquelles les poissons peuvent se faufiler, mais qui ne permet pas d'être prospecter à l'aide d'une épuisette. Par conséquent, c'est tout une partie de la population qui n'est pas accessible. Les résultats des estimations présentées Fig. 4.3 C vont dans ce sens. La CMR n'échantillonne qu'une partie de la population.
En s'intéressant plus particulièrement aux années 2010 et 2011, nous avons observé que le biovolume de cresson est relié linéairement à l'erreur d'estimation ($r^2 = 0{,}775$, Fig. 4.6).

Ce coefficient est obtenu en écartant la valeur de la population 7 en 2010, Enfin, cette corrélation ne peut s'appliquer aux biovolumes observés en 2012, car les biovolumes totaux de tous les macrophytes présents dans les canaux sont tous inférieur à 400 L. En conséquence de quoi, cette hypothèse est à relativiser et dépend certainement d'autres conditions influentes (paramètres du milieu, densité des racines, densité de population...).

Une voie d'amélioration serait d'échantillonner la sous-population évoluant dans le cresson afin de savoir quelle est la proportion de la population. Cette estimation pourrait être envisagée lors de la récupération des poissons à la fin de l'expérience, en bloquant la

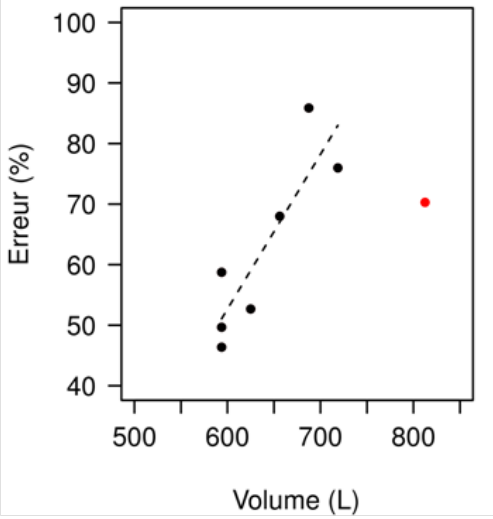

FIGURE 4.6 – Corrélation entre le volume de cresson et l'erreur commise ($r^2 = 0{,}775$).
● : Population 7.

rivière immédiatement en aval du cresson. Nous aurions alors accès à la proportion de la population présente, mais également sa distribution de taille.
Par ailleurs, cette population pourrait être échantillonnée par des pièges, le maillage des racines du cresson empêchant l'accès de cette zone aux poissons fondateurs.

4.3.5 Suivi de la distribution de taille de la population

Il a été mis en évidence que la mesure de 50 poissons pêchés aléatoirement suffit à estimer assez précisément la répartition des effectifs en classes de tailles (Fig. 4.7).

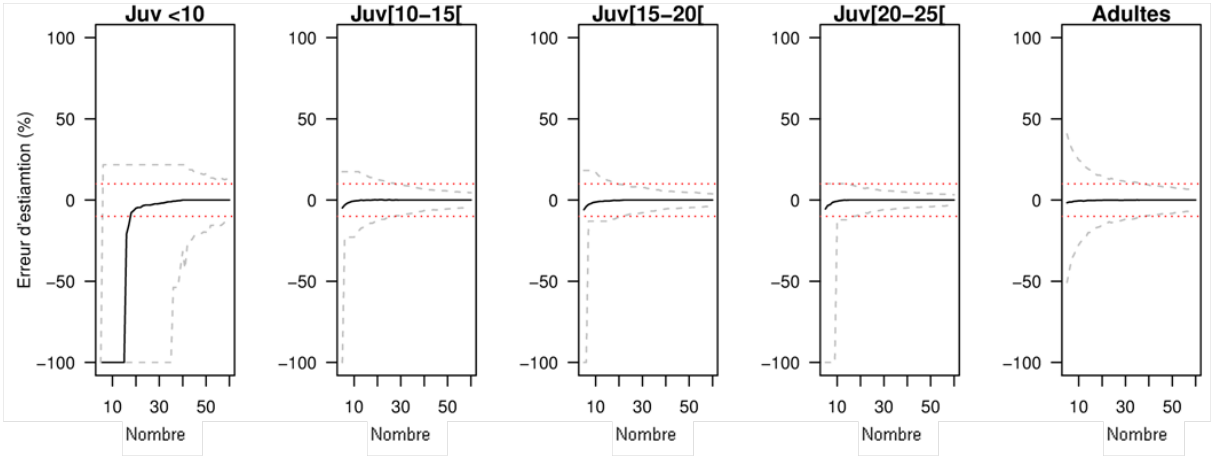

FIGURE 4.7 – Estimation de l'incertitude de la mesure de la taille moyenne par classe de taille.
- - : 10 % d'incertitude autour de la moyenne ; — : Moyenne des mesures ; — : IC 95 %.

4.4 Récupération finale des populations et acquisition des données

Après 215 jours environ, les populations sont récupérées. Comme pour le temps de colonisation, Belanger (1997) a proposée une relation log linéaire entre la taille des systèmes expérimentaux et le temps d'expérience dans la littérature. Cette équation donne un temps d'expérience, à titre de comparaison, de 141 jours pour la dimension de notre système expérimental à l'INERIS. Lors de nos expériences, ce temps fut supérieur afin de prendre en compte toute la période de reproduction de l'épinoche, s'étalant entre mars et octobre dans nos latitudes.

La fin de l'expérience se déroule en deux étapes : la première est la récupération des poissons dans les mésocosmes et la seconde est l'acquisition des données sur les poissons.

4.4.1 La récupération des populations dans les canaux

La récupération des effectifs en fin d'expérience est contrainte par deux facteurs dont on ne peut s'affranchir : le personnel présent et le temps.

Le premier facteur à prendre en compte est le nombre de personne qu'il faut minimiser, car mobiliser une équipe est compliqué et couteux. Nous avons donc décidé de penser le

protocole avec un minimum de 8 personnes.

Le second facteur est le temps, facteur qu'il faut également minimiser pour deux raisons : (i) la difficulté pour constituer une équipe disponible augmente avec la durée pendant laquelle cette équipe doit être mobilisée.

(ii) c'est un facteur important pour la dynamique de populations. Afin de limiter les différences entre les populations liée à l'arrêt des expériences (la croissance continue, la mortalité peut survenir...) nous avons décidé de réduire ce temps à 3 jours ce qui représente moins de 1,5% de différence maximale de la durée d'expérience entre les populations. Avant 2010, les individus étaient récupérés sur une période de plusieurs semaines. Cette période impliquerait un écart de 7.5% (en considérant 15 jours de récupération) par rapport à la durée de nos expériences. En supposant une température de 15 ˚C (réaliste à la fin de l'expérience Fig. 5.1 page 174) et une nourriture de 20% de la masse des individus, le taux de croissance journalier serait de 0,3 mm/j (pour les juvéniles), soit 1 cm en 3 jours et 5 cm en 15 jours (estimation à partir de la Fig. 3.7 page 118).

Ces exigences (3 jours et 8 personnes) nécessitent une organisation rigoureuse des étapes. Ces étapes sont décrites dans le protocole général (chapitre 2.3.3.1, page 74).

Afin de stocker les poissons avant leur tri selon la taille ($<$ ou $\geqslant$ 25mm), il a fallu travailler les conditions de stabulation. En effet, en 2010, les poissons étaient tous de suite transféré à l'étape de mesure et de tri. Cependant, cette étape devait apporter un niveau de stress important qui provoquait une mortalité élevée. Or les poissons mesurant moins de 25 mm constituent les futurs fondateurs de l'année suivante et sont placés dans l'élevage. C'est pourquoi, il a été important de limiter cette mortalité. Pour ce faire, la stabulation a duré 12 heures avant le transfert des poissons à l'étape de tri. Les poissons sont laissés sur la plate-forme des mésocosmes avec un renouvellement d'eau permettant de maintenir les poissons dans des conditions optimales. Cependant, la densité de poisson est importante et des juvéniles sont consommés par des adultes

Afin de quantifier ce cannibalisme, Martz (2011) a disséqué les 30 plus grands individus de chaque populations en 2011, populations qui avaient subit deux traitements : une stabulation de 3h avant le tri (population 1, 2 et 3) et une stabulation de 12h (populations

4 à 11). Son étude (Tableau 4.2) montre que sur l'ensemble des 11 populations, 26 alevins ou juvéniles (<15 mm) ont été consommé, majoritairement par des épinoches ayant une taille standard comprise entre 40 et 60 mm. Seul un alevin a été consommé dans la population 3. L'augmentation du temps de stabulation augmente donc la pression de prédation conspécifique. Cette prédation est négligeable devant le nombre de poissons dans l'ensemble des populations (26 juvéniles sur 10279 individus, soit moins de 0,25%). Cependant, il faudrait inspecter également les poissons < 40 mm qui pourrait eux aussi manger les alevins.

TABLEAU 4.2 – Cannibalisme des alevins lors de la stabulation avant l'étape de tri des poissons.

populations	**Épinoches [30 - 40[mm**	**Épinoches [40 - 50[mm**	**Épinoches [50 - 60[mm**	**Épinoches de >60 mm**	**Total de juvéniles prédatés**
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	1	0	0	1
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	3	0	3
7	0	4	4	0	8
8	0	0	0	0	0
9	0	1	4	0	5
10	0	3	1	0	4
11	0	3	0	2	5

Un autre point à considérer est la variabilité des mesures entre des individus vivants (*i.e.* les épinoches de < 25 mm des années 2010 et 2011 et les témoins en 2012) mesurés à 1 mm près et les individus conservés dans le formol (les morts, les épinoches de $\geqslant$ 25 mm et les populations exposées au BPA) mesurés à 0,01 mm près. L'incertitude est beaucoup plus importante pour les poissons vivants (Fig. 4.8). A la suite de ce constat, la méthodologie de mesure sur les poissons vivants a été optimisée (*e.g.* uniformisation du séchage avant la pesée).

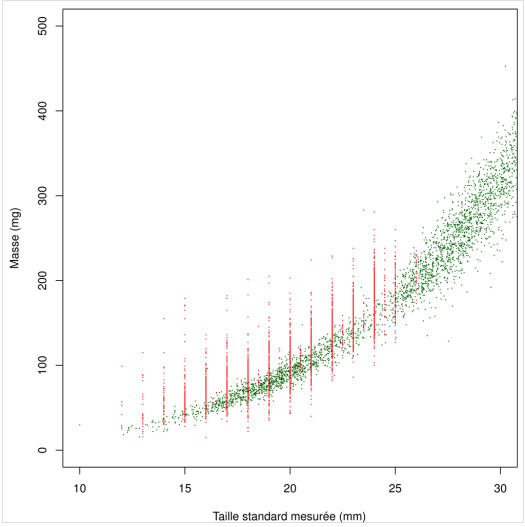

FIGURE 4.8 – Relation taille - masse des épinoches ($\leqslant$ 30 mm).
. : Épinoche vivantes ; . : Épinoche conservées dans le formol.

Les poissons issus des populations exposées au polluant sont directement euthanasiés et placés dans le formol, ce qui introduit un élément supplémentaire de variabilité entre les populations témoins et les populations traitées. Cette variabilité pose la question de savoir s'il ne serait pas préférable de conserver tous les poissons dans le formol. Cette méthode aurait plusieurs avantages :

(i) gagner en précision (Fig. 4.8) pour les données des juvéniles ;

(ii) stopper la prédation conspécifique (Tableau 4.2) ;

(iii) permettre une organisation simplifiée lors de la récupération des poissons, car ces derniers sera euthanasiés dès leur récupération puis conservés dans le formol.

Cependant, l'inconvénient serait que les juvéniles ne pourrait plus constituer les stocks pour les futures expériences. Cet inconvénient pourrait être contourné en mettant en place un élevage basé sur des fécondations *in-vitro* dont le protocole est connu (Santos *et al.*, 2013).

4.4.2 L'acquisition des données

Cette étape est motivée par l'acquisition des données allométriques de tous les individus des populations ainsi que de leur maturité selon deux stades : matures (mâles ou femelle) et juvéniles. Ces stades sont discriminés par leur taille standard par rapport à un

seuil de 25 mm, qui correspond à la taille à partir de laquelle les gonades sont suffisamment différenciées pour pouvoir être distinguées (observations réalisée à l'INERIS).
Par rapport à ce seuil, les individus sont soit mesurés et pesés puis placés en élevage (pour les individus de moins de 25 mm, non exposé à un polluant) soit placés dans du formol à 4 % pour être conservés en vue de la détermination de leur sexe, et pour les mâles, de leur état de maturité.
L'acquisition de la taille et de la masse des poissons peut s'avérer répétitive et lassante (700 individus par populations en moyenne, 11 à 12 populations par expérience). Sur les trois expériences et les 22 populations témoins suivies, des coefficients de déterminations compris entre 96.5 et 99.1% étaient obtenus pour chaque population (Tableau en annexe D, page 292). Ainsi lors de cette étape les exigences ne sont plus de minimiser le temps et le personnel, mais bien plus de maximiser la concentration du personnel en charge de la mesure et la précision ces mesures.
Les stades de maturité des mâles ont été définis par observations visuelles afin de gagner du temps dans l'acquisition des données et de réduire les coûts. L'histologie aurait été une méthode adéquate et fiable avec un nombre de mesures plus faibles à effectuer, elle est actuellement en cours de réalisation par l'unité ECOT.

4.5 Comparaison entre les années

En conclusion, nous voyons que le protocole a été optimisé au cours des expériences. Le tableau 4.3 synthétise ces évolutions.

Tableau 4.3 – Les différences entre les années

Modifications	**2010**	**2011**	**2012**
Bâche	non	non	oui
Date de plantation du cresson	Semaine 44	Semaine 46	Semaine 43
Date de plantation du myriophylle	Semaine 44	Semaine 46	Semaine 44
Date de plantation de la callitriche	Semaine 45 - 46	Semaine 45	Semaine 46
Organisation des macrophytes	Fig. B - 4 haut, page 288	Fig. B - 4 bas, page 288	Fig. B - 4 bas, page 288
Sexage des fondateurs	Caractères sexuels secondaires	Morphologie	Morphologie
Couleur des tags	Orange	Vert	Vert
Suivi des macrophytes	classe d'occupation	classes d'occupation + photos + mesure de la hauteur hors de l'eau (pour le cresson)	classes d'occupation + photos + mesure de la hauteur hors de l'eau (pour le cresson)
Prélèvement de zooplancton	4.75 L en amont & 15.75 L en aval ; fréquence : 2 semaines	5 L en amont & 18 L en aval ; fréquence : 4 semaines	5 L en amont & 18 L en aval ; fréquence : 4 semaines
Fréquence d'échantillonnage du périphyton	2 semaines	4 semaines	4 semaines
Dérive des épinoches	semi-quantitatif ; pas quotidiennement	quantitatif et quotidiennement	quantitatif et quotidiennement

CHAPITRE

5

DESCRIPTION DE LA DYNAMIQUE DE POPULATION D'ÉPINOCHE EN MÉSOCOSME EN CONDITIONS TÉMOINS

5.1 Introduction

L'étude de la dynamique de la population de l'épinoche à trois épines en conditions témoins est un pré-requis indispensable pour comprendre et expliquer les effets des expositions à un contaminant sur le poisson dans les mésocosmes de l'Ineris. Cette étude se fonde sur la connaissance du cycle de vie de l'épinoche (Chapitre 3) et sur le protocole que nous avons défini pour étudier la dynamique de la population d'épinoche à trois épines dans des mésocosmes lotiques (Chapitre 2.3 et Chapitre 4). Dans ce chapitre, nous préciserons les détails du protocole propre à cette étude (dates de suivi, caractéristiques des fondateurs...) puis nous présenterons les résultats issus de deux expériences menées successivement au cours de l'année 2010 et 2011.

Les questions posées dans cette partie concernent les étapes clés et les facteurs qui expliquent la variabilité intra - annuelle (suivie par les 11 populations pendant chaque expérience) et la variabilité inter - annuelle (suivie par la réalisation de deux expériences consécutives dans des conditions et protocoles proches).

5.2 Matériel et Méthode

5.2.1 Protocoles

Les protocoles mis en œuvre lors des deux années d'expérience sont proches de celui développé dans le chapitre 2.3. Les quelques différences sont détaillées dans le chapitre 4 car les expérimentations de ces deux années ont permis un retour d'expérience et une amélioration du protocole final.
Chaque expérience a impliqué 11 populations suivies en conditions témoins (le dernier canal était réservé pour d'autres expériences).

Les jours sont notés *jref* en prenant comme date référence le 10 mars de l'année en cours. En effet, cette date du 10 mars est la date pour laquelle la photopériode est de 11h30/12h30 de jour/nuit, permettant la reprise de la reproduction (Georges, 2010).

5.2.2 L'habitat

5.2.2.1 Aménagement et stabulation

Les mésocosmes ont été aménagés et stabulés entre octobre 2009 et mars 2010. pour la première expérience et entre octobre 2010 et mars 2011 pour la seconde année d'expérience. Le protocole d'aménagement des canaux est décrit chapitre 2.3.1 (page 58).

5.2.3 Les fondateurs

En 2010. les épinoches ont été introduites dans les mésocosmes le 10 mars. Les mâles fondateurs mesuraient 49.14 ± 2,04 [44.12 - 54.56] mm et pesaient 1.94 ± 0,28 [1.25 - 2.84] g. Les femelles fondatrices mesuraient 51.34 ± 4.31 [45,00 - 58.79] mm et pesaient 2.139 ± 0,58 [1,03 - 3.92] g (Tableau 5.1). Lors de l'introduction, il n'y avait pas de différence significative des tailles standard des fondateurs (ANOVA ; ddl résiduels = 99 ; $p = 0{,}447$) et des fondatrices (ANOVA ; ddl résiduels = 154 ; $p = 0{,}713$) entre les canaux. En 2011, les épinoches ont été introduites dans les mésocosmes le 4 mars. Les mâles fondateurs mesuraient 41.66 ± 2.85 [33.65 - 46.33] mm et pesaient 1.131 ± 0,245 [0,55 - 1.71] g (Tableau 5.1). Les femelles fondatrices mesuraient 42.43 ± 1.67 [38.54 - 45.47] mm et pesaient 1,06 ± 0,15 [0,74 - 1.41] g. Lors de l'introduction, il n'y avait pas de différence

significative des tailles standard des fondateurs (ANOVA ; ddl résiduels = 99 ; $p = 0{,}916$) et des fondatrices (ANOVA ; ddl résiduels = 154 ; $p = 0{,}148$) entre les canaux.

5.2.4 Suivi de la population

5.2.4.1 Observation de la dérives des juvéniles (dévalaison)

Les juvéniles sortant des canaux avec le trop plein d'eau sont dénombrés et réintégrés dans les canaux. En 2010. à partir du 68ème jref, les individus n'étaient plus dénombrés individuellement mais des indices d'abondance étaient relevés (notation en fonction du nombre : 1 - 10 ; 11 - 50 ; 50 - 100 ; > 100).

5.2.4.2 Suivi de la taille standard

En 201, trois populations (2, 4 et 7) ont été suivies régulièrement. En 2011, tous les 21 jours, trois populations tirées aléatoirement ont été suivies. A la suite d'un échantillonnage, les trois populations choisies ne pouvaient être ré-échantillonnées avant que toutes les autres l'aient été.

5.2.5 Fin d'expérience

Les expériences se sont achevées le 13 octobre 2010 et le 8 octobre 2011, respectivement pour la première et la seconde expérience. Les populations ont donc été suivies 217 jref en 2010 et 212 jref en 2011.

TABLEAU 5.1 – Taille standard (mm) et masse (g) des poissons fondateurs en 2010 et 2011.

Population	**Femelles**		**Mâles**	
	Longueur (mm)	**Masse (g)**	**Longueur (mm)**	**Masse (g)**
2010				
1	52,60 ± 4,43	2,30 ± 0,70	49,88 ± 1,58	1,96 ± 0,31
2	51,79 ± 4,09	2,17 ± 0,65	50,49 ± 2,52	2,03 ± 0,27
3	51,65 ± 3,48	2,27 ± 0,73	49,27 ± 1,76	1,92 ± 0,24
4	50,94 ± 2,87	1,94 ± 0,37	48,90 ± 2,23	1,86 ± 0,41
5	51,26 ± 3,32	2,02 ± 0,57	49,03 ± 1,84	1,93 ± 0,23
6	51,90 ± 2,41	2,30 ± 0,58	48,91 ± 2,25	2,02 ± 0,34
7	51,47 ± 3,26	2,17 ± 0,44	48,51 ± 2,29	1,85 ± 0,26
8	50,19 ± 3,36	1,96 ± 0,51	48,19 ± 2,12	1,85 ± 0,24
9	52,14 ± 4,30	2,19 ± 0,66	48,63 ± 2,10	1,90 ± 0,27
10	49,20 ± 9,05	2,09 ± 0,53	49,35 ± 1,43	2,03 ± 0,19
11	51,57 ± 3,56	2,13 ± 0,55	49,40 ± 2,10	1,99 ± 0,32
2011				
1	41,96 ± 1,68	1,03 ± 0,16	41,80 ± 2,49	1,13 ± 0,23
2	42,50 ± 1,85	1,08 ± 0,17	42,13 ± 2,42	1,19 ± 0,24
3	42,69 ± 1,52	1,08 ± 0,15	40,79 ± 2,92	1,06 ± 0,24
4	41,69 ± 1,51	1,02 ± 0,13	41,75 ± 2,74	1,19 ± 0,25
5	42,51 ± 1,83	1,05 ± 0,17	41,02 ± 3,90	1,09 ± 0,28
6	42,08 ± 1,74	1,00 ± 0,18	41,45 ± 2,86	1,15 ± 0,27
7	42,53 ± 1,71	1,07 ± 0,14	42,82 ± 3,02	1,25 ± 0,26
8	43,64 ± 1,23	1,15 ± 0,08	41,22 ± 2,84	1,05 ± 0,23
9	42,00 ± 1,59	1,03 ± 0,15	42,04 ± 3,11	1,10 ± 0,25
10	42,66 ± 1,60	1,11 ± 0,15	41,00 ± 2,66	1,09 ± 0,24
11	42,47 ± 1,78	1,04 ± 0,13	42,19 ± 2,97	1,15 ± 0,24

5.3 Résultats

5.3.1 Suivi de l'habitat

5.3.1.1 Paramètres physico-chimique

L'année 2010 présente un profil de la température moyenne de l'eau habituel en Picardie : après une période froide, caractérisée par une température moyenne journalière inférieure à 15°C jusqu'au 70 à 80ème jref, les températures augmentent jusqu'à un maximum enregistré aux alentours du 120ème jref, amorçant ensuite un déclin jusqu'à la fin de l'expérience (Fig. 5.1).
L'année 2011, quant à elle, présente un profil différent. Les températures moyennes journalières enregistrées augmentent jusqu'au 94ème jref après lequel, elles se stabilisent autour de 18°C (Fig. 5.1).
En comparant les deux années, il faut noter que les températures moyennes journalières les plus basses furent enregistrées en 2011. L'hiver fut plus rigoureux que l'année 2010. Cependant, les premiers jref ne sont pas présentés car les sondes n'avaient pas été installées. L'année 2010, cependant, montre durant l'été, des températures moyennes journalières supérieures à 20°C, lorsque ces mêmes maximales dépassent difficilement les 19°C en 2011 à la même période. Enfin, les mois d'automne étant plus doux en 2011 qu'en 2010, les épinoches ont profité de conditions thermiques plus clémentes avec des températures mesurées proches de leur température optimale.

Pour une même année, les profils de températures moyennes journalières sont très proches entre les canaux suivis (Fig. 5.1).

Quelles que soient les années, les mesures moyennes d'oxygène dissous, de pH ou de conductivité présentent une variabilité annuelle importante sans qu'il soit possible de dégager de tendance et de distinguer des périodes comme lors de l'étude de la température moyenne journalière. Cependant, il faut noter que la conductivité est supérieure en 2010 par rapport à 2011 jusqu'au 120ème jref après lequel, le rapport est inversé (Fig. 5.2 A). Le pH et l'oxygène dissous sont en revanche, toujours supérieurs en 2011 (Fig. 5.2 B et C).

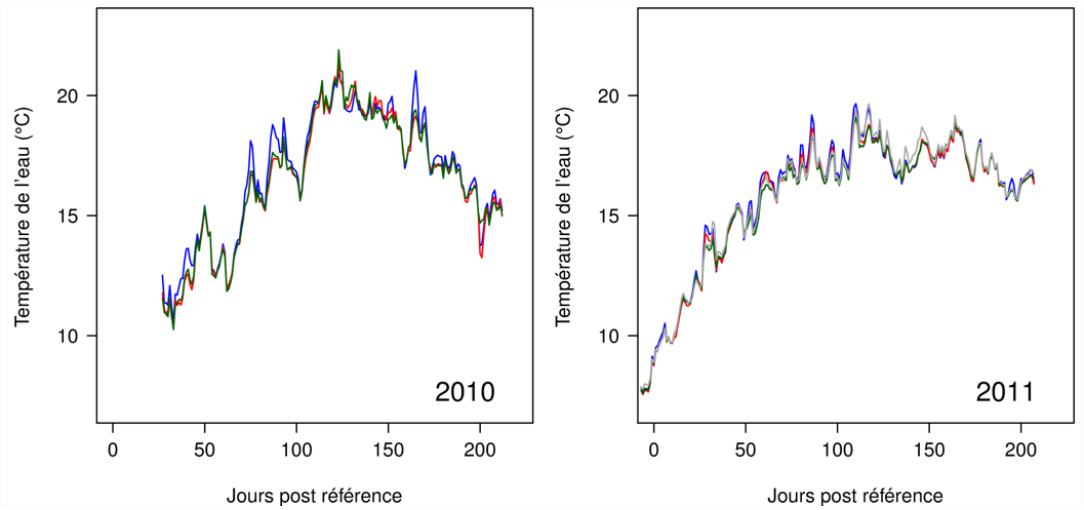

FIGURE 5.1 – Suivi de la température moyenne journalière dans les mésocosmes pour 3 et 4 canaux, respectivement pour 2010 (gauche) et 2011 (droite).

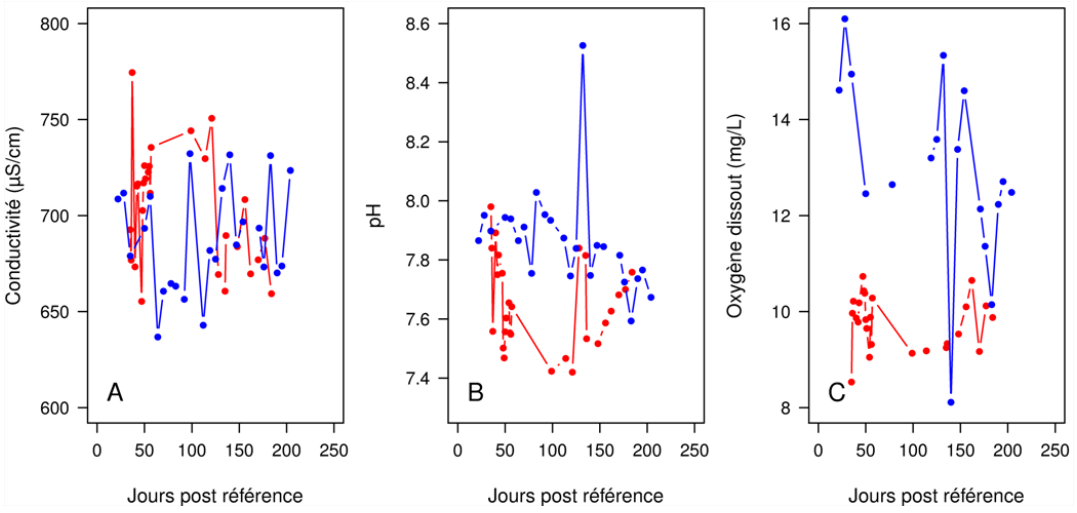

FIGURE 5.2 – Suivi de la moyenne à chaque prélèvement de la conductivité (A), du pH (B) et de l'oxygène dissous (C) dans les canaux pour 2010 (—) et 2011 (—).
Les données manquantes lors de la mesure de l'oxygène dissous à certaines dates de 2011 correspondent à une saturation de l'appareil, les données étaient aberrantes.

5.3.1.2 Les macrophytes

En 2010 et 2011 (Fig. 5.3), les espèces les plus abondantes dans les mésocosmes étaient le cresson et les spirogyra.

Entre 2010 et 2011, (Fig. 5.3) les observations concernant la dynamique du cresson sont identiques : le volume occupé par le cresson augmente dans les premiers mètres des canaux et diminue ensuite. En revanche, le volume occupé par le cresson est en moyenne supérieure en 2010.

La répartition des macrophytes était spatialisée : le cresson se trouvait dans la partie amont alors que la callitriche et le myriophylle se trouvaient dans la partie aval. La spirogyre, en revanche se retrouvait tout le long du canal. Il faut cependant relever qu'en 2011, à partir du 144ème jref, la callitriche se trouvait en amont également (faible volume)

La dynamique de la callitriche a été différente entre les deux années. En 2010, des pics de volume ont été observés (respectivement entre le 30 et le 40ème jref et autour du 100ème jref), alors qu'en 2011 aucune diminution brutale du volume n'était constatée. Le volume occupé par la callitriche était plus important en 2011 qu'en 2010.

Le volume occupé par le myriophylle était comparable en 2010 et en 2011 tant au regard de la dynamique que du faible volume de cette espèce.

La spyrogyre est une espèce à croissance rapide qui s'est fortement développé lors des deux années. La dynamique était similaire au cours des deux années, caractérisée par une succession de phases d'augmentation et de diminution rapide du volume occupé.

5.3.2 Suivi de la nourriture

Les données de nourriture présentées ne concernent que les invertébrés car les autres données n'ont pas encore été acquises (sous-traitance par une entreprise d'identification de zooplancton [1]). La quantité de nourriture présentée dans le cadre de ce chapitre est la nourriture présente dans les canaux, indépendamment des tailles des poissons et de leur capacité à se nourrir de ces ressources.

1. Entreprise de M. Matthieu Lonjaret

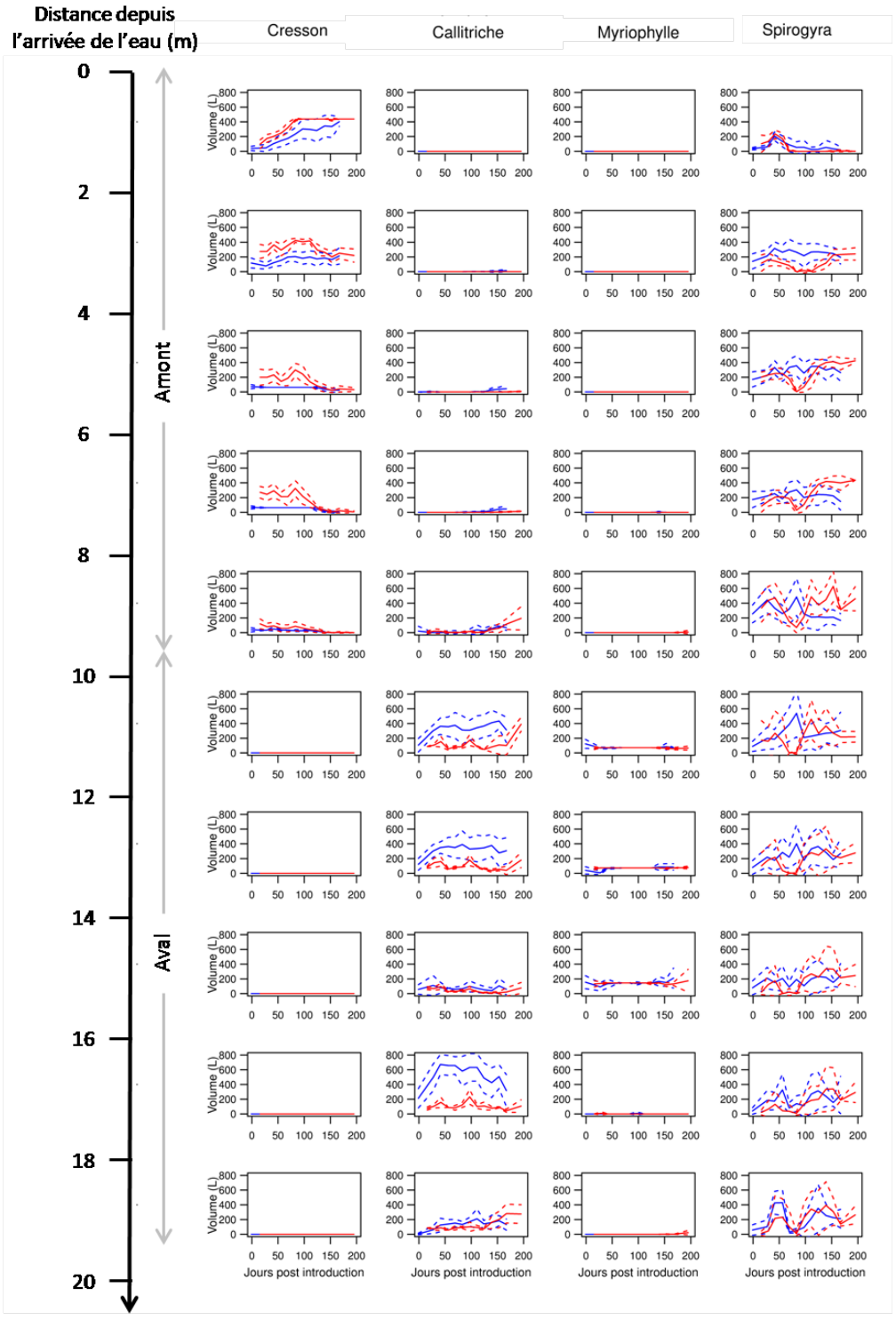

FIGURE 5.3 – Suivi du volume occupé par les macrophytes (cresson, callitriche, myriophylle et spirogyra) en 2010 (—) et en 2011 (—), au cours du temps et selon la distance depuis l'introduction de l'eau. Les mesures présentées sont les moyennes ± les SD sur les 11 canaux tous les deux mètres.

En 2010, la quantité de nourriture présente était supérieure, en moyenne, à 20 g dans les mésocosmes à partir du 50ème jref puis tout au long de l'expérience. Peu avant le 100ème jref un pic de nourriture était observé. La variabilité était forte tout au long de l'expérience.
En 2011, la quantité de nourriture a augmenté de façon importante ($\times$ 4 par rapport au 44 ^{ème} jref) jusqu'au 94ème jref. Puis, après cette date, la nourriture diminuait par palier.

Les deux années étaient marquées par une forte variabilité entre les canaux (Fig. 5.4).

Toutes les épinoches ont de la nourriture disponible (Fig. 5.4). Ce sont les épinoches les plus grandes (plus de 40 mm) qui ont le plus de nourriture disponible.

5.3.3 Suivi de la dynamique de population de l'épinoche

5.3.3.1 Suivi visuel

En comparant les deux années (Tableau 5.2), nous voyons que les stades des juvéniles ont été observés aux mêmes dates en 2010 (42ème jref dans tous les canaux) qu'en 2011 (entre le 40ème et le 48ème jref). En revanche, les juvéniles de plus de 20 mm ont un décalage de 20 à 30 jours (en 2010. entre le 63ème et le 70ème jref alors qu'en 2011 pas avant le 81ème jref, voir le 96ème jref).

Lors des deux années, un nombre important de cadavre a été observé à partir du 100ème jref environ. Cette information qualitative n'est pas intégrée dans le tableau, mais elle est importante pour le suivi de la dynamique de la population.

5.3.3.2 Suivi de la dérive des juvéniles

Le suivi visuel, présenté précédemment et le suivi de la dérives des juvéniles montrent des résultats analogues. Les deux années sont similaires et les premiers alevins ont été récupérés au même moment pour les deux années, le 40ème et 41ème jref, respectivement en 2010 et en 2011 (Fig. 5.5 et Fig. 5.6). Puis, pendant les 10 jours qui ont suivi, les effectifs ont augmenté fortement (jusqu'à 150 poissons récupérés par jour) puis les effectifs récupérés ont diminué. Jusqu'au 91ème jref (dernières dates du suivi de la dévalaison en 2010. Fig. 5.5), des pics épisodiques d'apparition d'alevins ont été observés dans certains

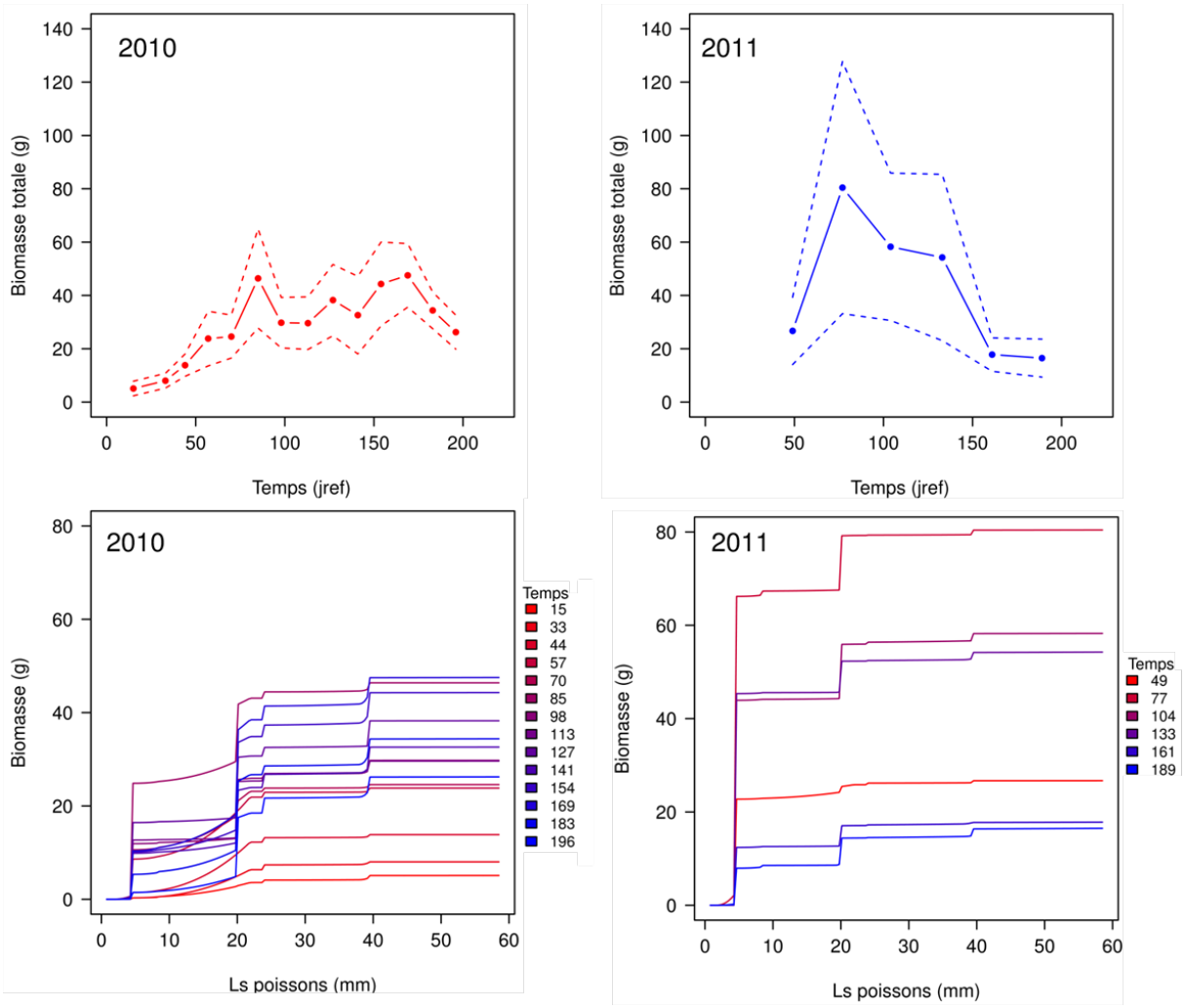

FIGURE 5.4 – Biomasse fraîche estimée d'invertébrés ...
Haut : ... totale (moyenne de tous les canaux ± SD) au cours de l'expérience 2010 (—) et 2011 (—)
Bas : ... disponible pour les épinoches en fonction de la taille de l'épinoche et du temps de l'expérience.

TABLEAU 5.2 – Date des premières observations par suivi visuel (en jour post référence) en fonction des canaux

Premiers...	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
2010											
< 10 mm	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42
10 - 15 mm	56	56	56	56	56	56	56	63	56	56	56
15 - 20 mm	56	56	56	63	63	56	56	63	70	56	63
> 20 mm	63	63	63	70	70	70	63	70	70	63	70
2011											
< 10 mm	40	40	40	48	48	40	40	40	48	40	48
10 - 15 mm	53	60	60	60	60	74	60	60	60	60	60
15 - 20 mm	60	81	60	74	60	74	74	60	60	74	67
> 20 mm	89	89	81	81	81	96	81	81	89	81	96

canaux. En 2011, le pic de dévalaison a été observé entre le 44ème et le 94ème jref (Fig. 5.6). Selon les populations, le nombre d'alevins qui dérivait quotidiennement n'était pas pas le même après. A titre d'illustration, après 94 jref, dans les populations 6 et 9, il y avait très peu d'alevins qui continuaient de dériver alors que dans les populations 3 et 8, après 144 jref, des alevins étaient encore récupérés.

5.3.3.3 Suivi des effectifs par CMR

En 2010 et en 2011, les profils d'évolution du nombre d'individus estimés étaient les mêmes (Fig. 5.7). Après une période pendant laquelle la reproduction a débuté (jusqu'au 50ème jref), les estimations du nombre d'individus ont fortement augmenté (jusqu'à 1500 voir 2000 individus estimés, respectivement pour 2010 et 2011) puis ont diminué progressivement jusqu'à revenir au 200ème jref à des populations estimées de l'ordre de 500 et 250 individus (respectivement pour 2010 et 2011).

La valeur se distinguant en 2011 au 106ème jref par le nombre important d'individus estimés (2376 [1764 - 3228]) a été contrôlée par un recomptage sur photographie. Il s'agit d'une estimation dans la population qui se trouvait dans le canal 11. Elle est 3.5 fois supérieure aux autres valeurs estimées le même jour sur les deux autres populations.

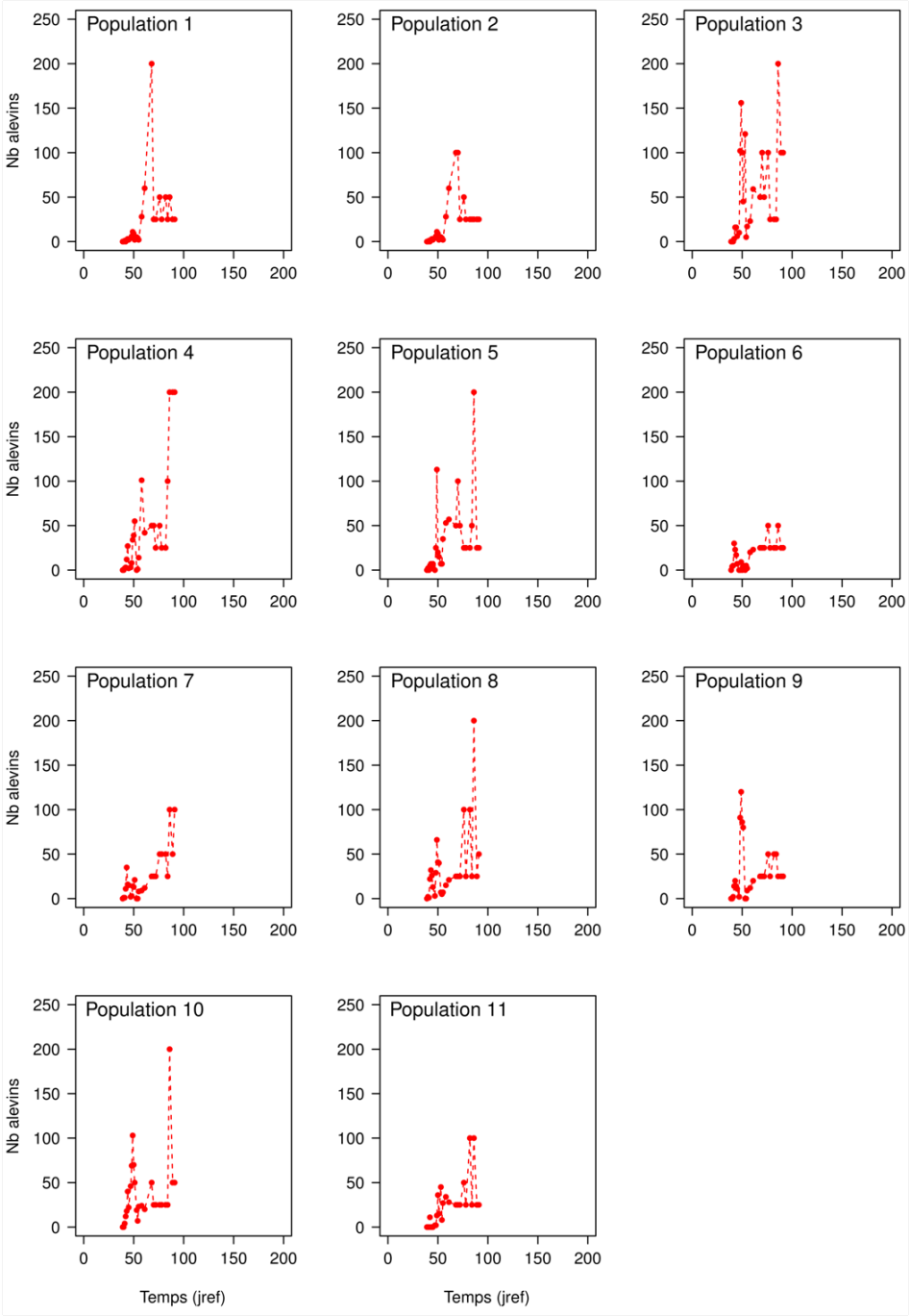

FIGURE 5.5 – Quantités d'alevins dévalés quotidiennement en 2010. A partir du 63ème jref, les quantités sont estimées à partir d'indices d'abondances.

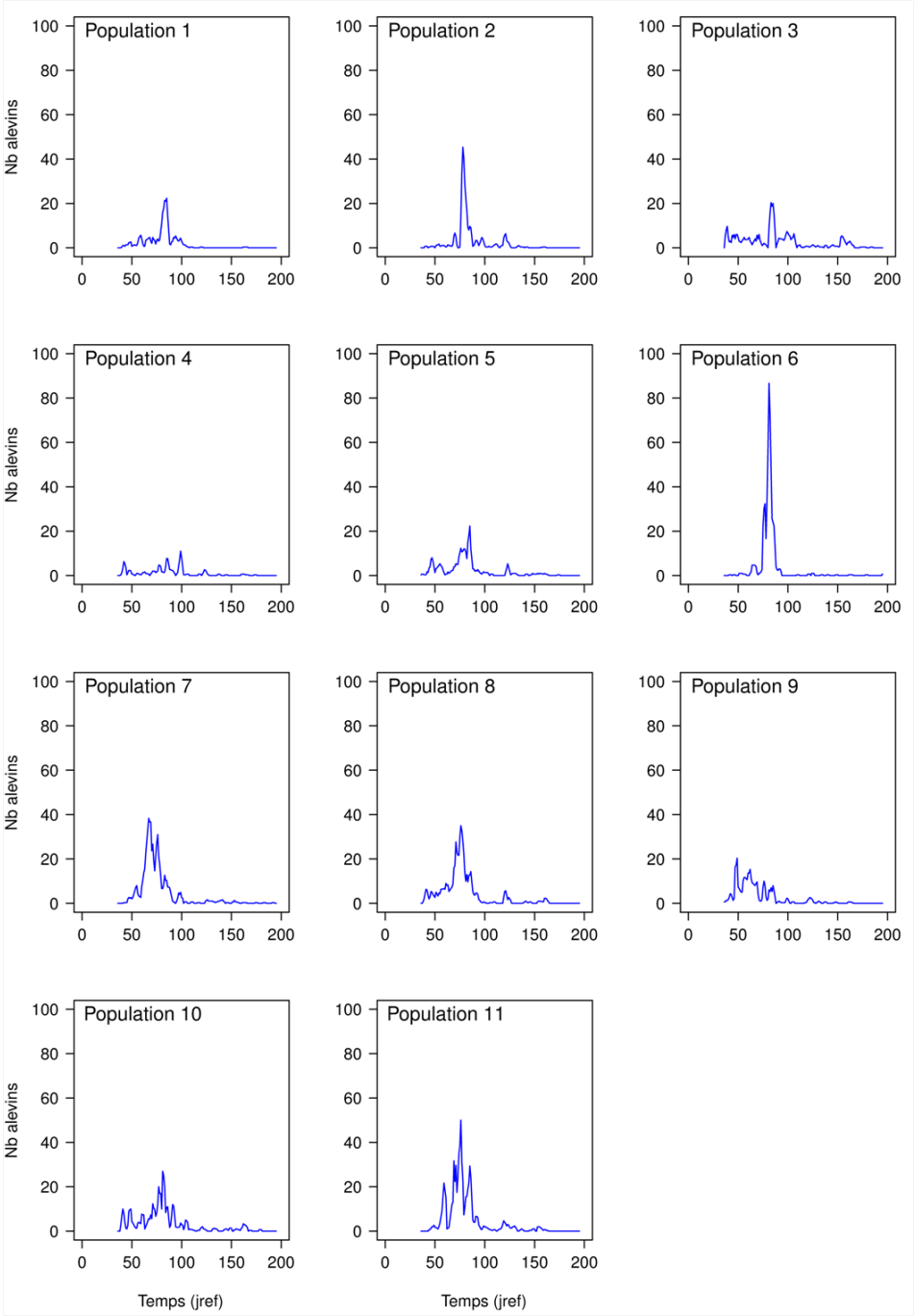

FIGURE 5.6 – Moyenne des quantités d'alevins dévalés lors des trois précédents jours en 2011 (pour lisser les courbes).

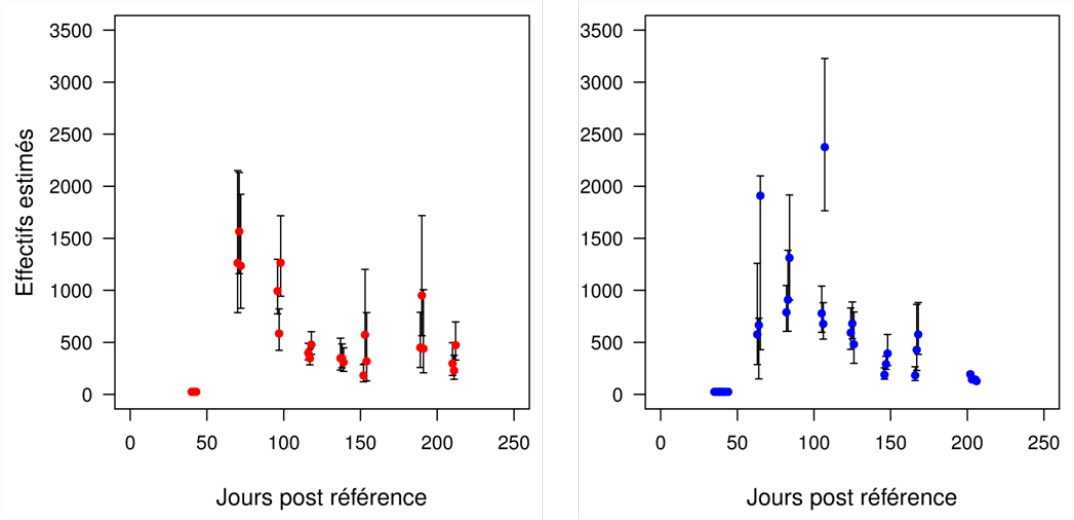

FIGURE 5.7 – Suivi de l'estimation, sans correction du biais, du nombre d'individus (Moyenne ± intervalle de confiance) dans les populations au cours de l'expérience 2010 (—) et 2011 (—).

Nous ne pouvons justifier une telle différence.

En comparant les deux années témoins, il apparait que les estimations d'effectifs sont équivalentes jusqu'au 100ème jref. Puis, au cours des 50 jours suivants, les effectifs estimés en 2010 étaient, en moyenne, deux fois moindre que ceux estimés en 2011 (371 individus en moyenne en 2010 contre 642 [2] individus en 2011). Ensuite les effectifs estimés étaient similaires. La dernière estimation suppose cependant que les populations en 2010 étaient plus importantes que les populations en 2011 (respectivement 333 individus en moyenne en 2010 contre 155 en 2011) à la fin de l'expérience. Ces observations peuvent être le résultat d'une saison de reproduction différente selon les deux années de contrôle ou une survie moindre des alevins en 2011. Cette survie pouvant être affectée par les conditions climatiques ou par un manque de nourriture qui implique une prédation cons-spécifique plus importante.

5.3.3.4 Suivi de la distribution de taille

Lors des suivis (2010 et 2011), la médiane de la taille des épinoches (hors fondateurs) dans la population augmente au cours de l'expérience, jusqu'au 150ème jref environ, date à partir de laquelle, la taille médiane stagne (Fig. 5.8).

2. Sans considérer la valeur extrême de 2376 individus estimés

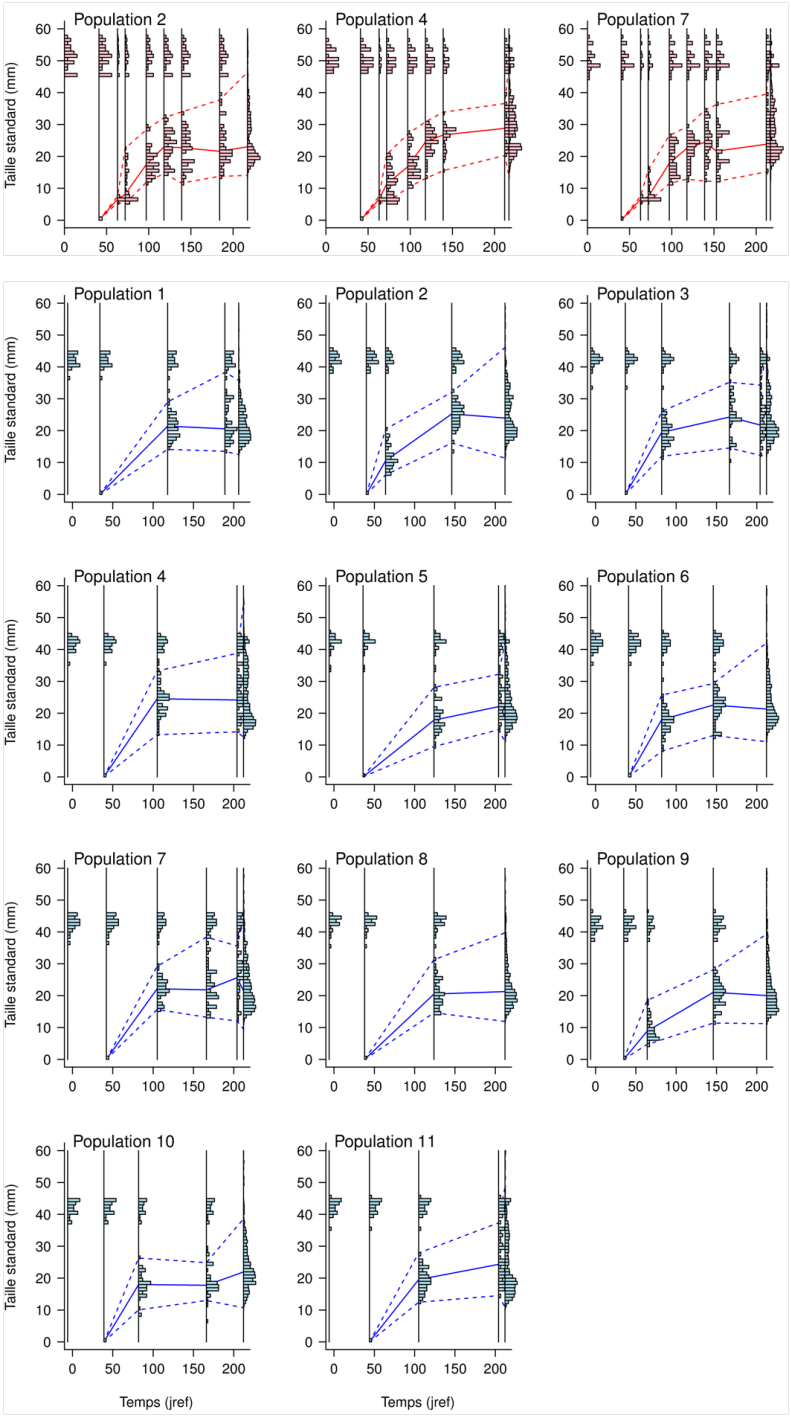

FIGURE 5.8 – Suivi de la distribution des tailles standard des épinoches en 2010 (—) et en 2011 (—). Les barres représentent les proportions d'effectifs par classe de tailles (les classes de tailles font 1 mm). La ligne continue représente la médiane de la distribution (hors fondateurs) et les lignes discontinues représentent les percentiles 2.5 et 97.5% de la distribution (hors fondateurs).
Pour un même canal, la distribution de la taille des fondateurs est reproduite au cours du temps pour rappeler qu'ils sont toujours présents. En revanche, la sous-population de fondateurs n'étant pas échantillonnée, la distribution est la même pour toute les dates, à l'exception de la dernière.

En 2011, toutes les populations montrent un patron similaire à celui observés sur les trois populations suivies en 2010 (Fig. 5.8). Cependant, l'observation était moins fine qu'en 2010 en raison du nombre de populations suivies plus important impliquant que le pas de temps entre deux échantillonnages était plus grand.
Les populations 2 et 4 ont des tailles médianes supérieures à la médiane des tailles de toutes les populations de 2011. En revanche, les populations 5, 9 et 10 ont des tailles médianes inférieures à la médiane des tailles de toutes les populations de 2011.

5.3.4 Effets sur les variables au temps final

Les variables finales sont présentées fig. 5.9.

Les coefficients des relations allométriques, liant la taille et la masse de tout type d'individu (Eq. 2 - 10, page 90, chap. 2), permettent de définir l'indice de condition des individus. Leurs valeurs sont reportées dans l'annexe D (page 291).

5.3.4.1 Structure de la population

Le nombre total d'individus dans les populations à la fin des expériences était en moyenne de 871,82 ± 182,06 [627 - 1282] en 2010 et de 934,36 ± 136,65 [707 - 1190] en 2011 (Fig. 5.9 A). Les valeurs ne sont pas significativement différentes entre les années (Anova ; ddl résiduels = 20 ; $p = 0.373$).

Le pourcentage de mâles dans les populations en fin d'expérience varie entre 9,8 et 29,0% en 2010 et entre 11,3 et 22,3% en 2011 (Fig. 5.9 B). Les pourcentages de mâles ne sont pas significativement différents entre les deux années (Anova ; données transformées *arcsin* ; ddl résiduels = 20 ; $p = 0.067$). La maturité des mâles n'est pas la même entre les années. En 2010, il y avait un pourcentage de mâles matures significativement plus important qu'en 2011 (Anova, données transformées *arcsin* ; ddl résiduels = 20 ; $p < 0.01$) et moins de mâles immatures (Anova, données transformées *arcsin* ; ddl résiduels = 20 ; $p < 0.01$).
Le pourcentage de juvéniles dans la population n'a pas été impacté par l'année (Anova, données transformées *arcsin* ; ddl résiduels = 20 ; $p = 0.0572$). Par conséquent, le pourcentage de mâles et de juvéniles n'étant pas significativement différent entre 2010 et 2011,

nous pouvons déterminer que le pourcentage de femelles dans la population ne l'est pas non plus, informant que la structure de la population n'est pas différente entre les années.

5.3.4.2 Taille finale des individus

Les mâles fondateurs mesurent 54,71 ± 1,47 et 48,97 ± 1,48 mm en fin d'expérience, respectivement en 2010 et en 2011 (moyenne des moyennes de chaque population). Ils sont significativement plus grands en 2010 (ANOVA ; dll résiduel= 20 ; $p < 0{,}001$). Les femelles fondatrices mesurent 61,27 ± 1,32 et 55,58 ± 1,61 mm en fin d'expérience, respectivement en 2010 et en 2011 (moyenne des moyennes de chaque populations). Elles sont significativement plus grandes en 2010 (ANOVA ; dll résiduel= 20 ; $p < 0{,}001$). Cependant, lors de l'introduction, les fondateurs, mâles et femelles, étaient également significativement plus grands en 2010 (ANOVA mâles ; dll résiduel= 20 ; $p < 0{,}001$, ANOVA femelles ; dll résiduel= 20 ; $p < 0{,}001$). Par conséquent, il est important de suivre le gain de croissance entre le début et la fin de l'expérience. En 2010, le mâle fondateur moyen de chaque population a grandi en moyenne de 5,57 ± 1,24 mm pendant l'expérience. Ce gain de taille moyen est significativement inférieur à celui de 2011 (ANOVA ; dll résiduel= 20 ; $p < 0{,}01$). Les conclusions sont identiques pour les fondatrices (ANOVA ; dll résiduel= 20 ; $p < 0{,}001$). Ce raisonnement est renforcé par le ralentissement de la croissance pour les tailles élevées.

Les mâles non fondateurs (nés dans les mésocosmes) ont une taille qui n'est pas différente selon les années (ANOVA ; dll résiduel= 20 ; $p = 0{,}275$). Leurs tailles standard moyennes sont comprises entre 31,28 et 34,75 mm selon les populations. A l'inverse des mâles nés dans le mésocosme, les femelles non fondatrices sont significativement plus grandes en 2010 (ANOVA ; dll résiduel= 20 ; $p < 0{,}01$). Elles mesurent entre 33,36 et 36,56 mm en moyenne en 2010 selon les populations et entre 30,61 et 34,43 mm en moyenne en 2011 selon les populations.
Enfin, les juvéniles sont significativement plus petits en 2011 (ANOVA ; dll résiduel= 20 ; $p < 0{,}01$).

5.3.4.3 Indice de condition

L'indice de condition des fondateurs (mâles et femelles) n'est pas significativement différent entre 2010 et 2011 (ANOVA mâles ; dll résiduel= 20 ; $p = 0{,}863$, ANOVA femelles ; dll résiduel= 20 ; $p = 0{,}161$). En revanche, il diffère significativement pour les individus nés pendant l'expérience (ANOVA mâles ; dll résiduel= 20 ; $p < 0{,}001$, ANOVA femelles ; dll résiduel= 20 ; $p < 0{,}05$, ANOVA juvéniles ; dll résiduel= 20 ; $p < 0{,}001$). L'indice de condition en 2010 est inférieur pour les adultes nés pendant l'expérience, et supérieur pour les juvéniles à l'indice de condition en 2011.

5.3.4.4 Coefficients de variations des tailles et des indices de conditions

Indépendamment des années et des populations, les valeurs moyennes des coefficients de variations de la taille standard des fondateurs et des fondatrices en fin d'expérience sont comprises entre 2 et 9% (Fig. 5.10 A et C). Elles ne sont pas significativement différentes entre 2010 et 2011 (ANOVA mâles, données transformées *arcsin* ; dll résiduels = 20 ; $p = 0{,}848$; ANOVA femelles, données transformées *arcsin* ; dll résiduels = 20 ; $p = 0{,}312$). Les valeurs moyennes des coefficients de variations de la taille standard des mâles et des femelles nés pendant l'expérience ne différent significativement pas selon les années (ANOVA mâle, données transformées *arcsin* ; ddl résiduels = 20 ; $p = 0{,}0647$; ANOVA, données transformées *arcsin* ; ddl résiduels = 20 ; $p = 0{,}078$). Les coefficients de variation moyens des mâles sont de 18,50 ± 1,92 et 16,92 ± 1,88 en 2010 et en 2011 et les coefficients de variation moyens des femelles sont de 23,60 ± 1,93 et de 21,96 ± 2,19, respectivement en 2010 et 2011. En revanche, les coefficients de variation moyens des juvéniles diffèrent significativement entre les années (ANOVA, données transformées *arcsin* ; ddl résiduels = 20 ; $p < 0{,}001$).

Les indices de condition présentent une variabilité statistiquement identique entre les années, à l'exception de l'indice de condition des juvéniles qui est significativement plus variable en 2010 (23,97 ± 7,06) qu'en 2011 (13,03 ± 2,92 ; ANOVA, données transformées *arcsin* ; ddl résiduels = 20 ; $p < 0{,}001$).

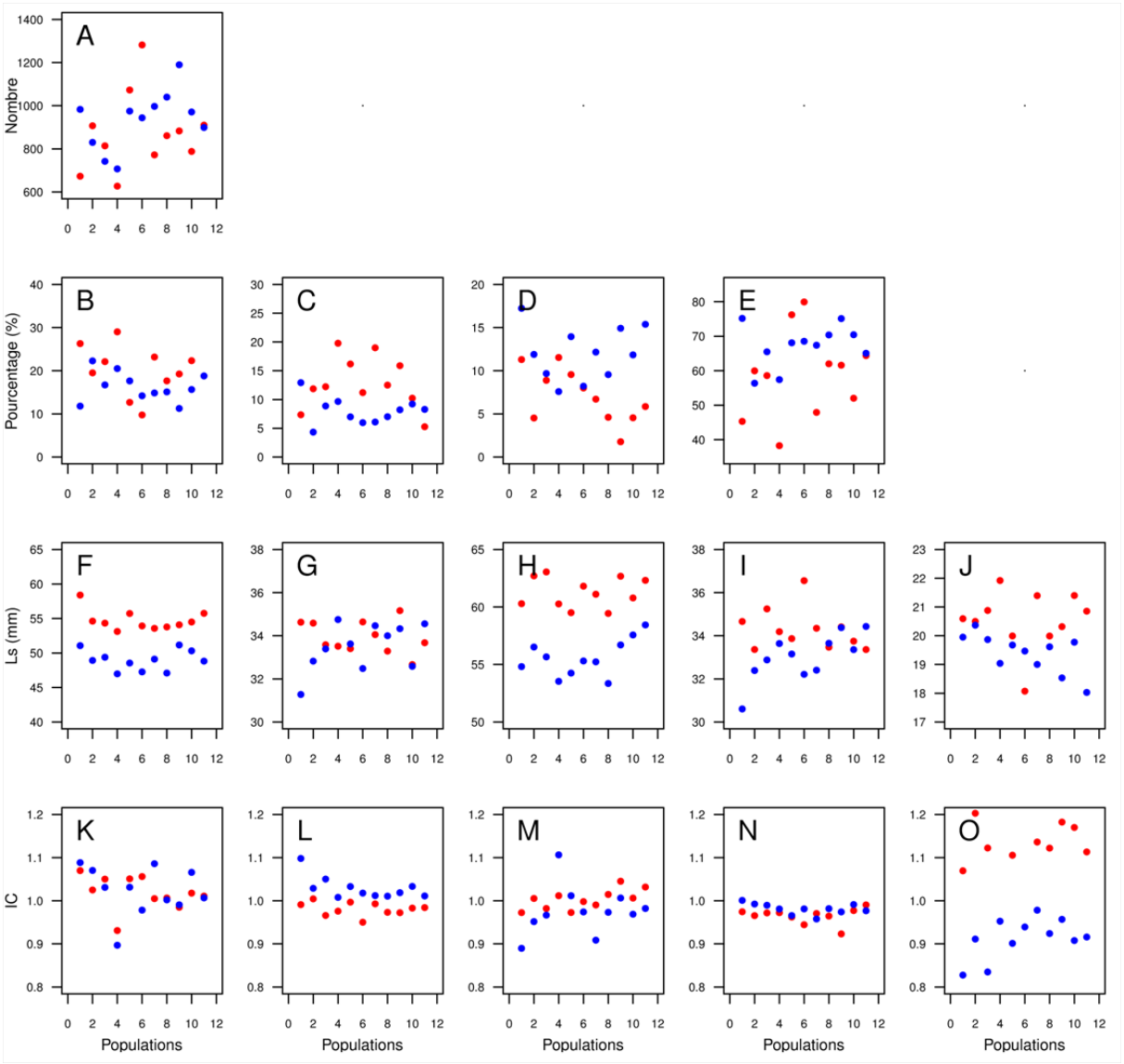

FIGURE 5.9 – Moyenne par population des variables biologiques à la fin de l'expérience en 2010 (—) et 2011 (—).
- Nombre total d'individus dans la population (A),
- Pourcentages de mâles (B) parmi la population, de mâles matures parmi les mâles (C), de mâles immatures parmi les mâles (D) et de juvéniles (E),
- Tailles standard des mâles fondateurs (F) et non-fondateurs (G), des femelles fondatrices (H) et non fondatrices (I) ainsi que des juvéniles (J),
- Indices de condition des mâles fondateurs (K) et non-fondateurs (L), des femelles fondatrices (M) et non fondatrices (N) ainsi que des juvéniles (O).

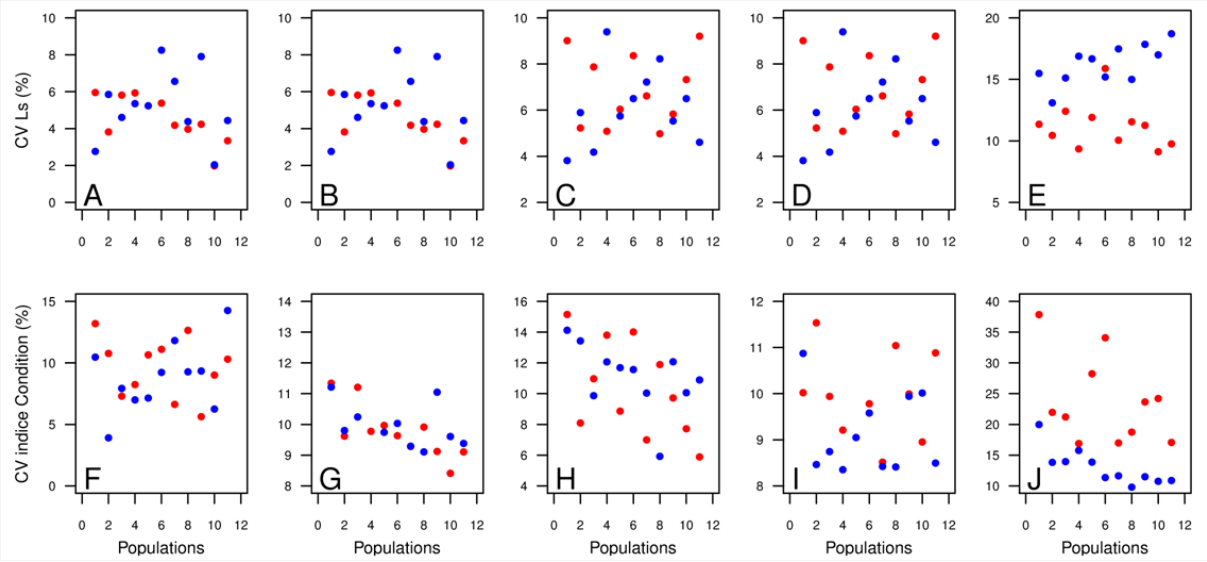

FIGURE 5.10 – Coefficients de variation par populations des variables biologiques (taille standard et indice de condition) à la fin de l'expérience en 2010 (—) et 2011 (—).
- Tailles standard des mâles fondateurs (A) et non-fondateurs (B), des femelles fondatrices (C) et non fondatrices (D) ainsi que des juvéniles (E),
- Indices de condition des mâles fondateurs (F) et non-fondateurs (G), des femelles fondatrices (H) et non fondatrices (I) ainsi que des juvéniles (J).

5.3.4.5 Classification ascendante hiérarchique

La classification ascendante hiérarchique (Fig. 5.11) renseigne sur les similarités entre les populations en considérant toutes les variables descriptives de la population. Au regard des valeurs de la probabilité d'existence d'un nœud par la méthode de bootstrap multi-échelle, il apparait que deux groupes sont formés à partir du nœud 19. Ces deux groupes sont dépendants de l'année. En 2010. 9 des 11 populations sont fusionnées et en 2011, le groupe est formé de 10 des 11 populations.

Les populations qui se détachent du reste des populations sont les populations 5 et 6 en 2010 et la population 1 en 2011.

Les populations 5 et 6 sont caractérisées par de fortes variabilités. Le CV des variables (taille standard en fin d'expérience et indice de conditions) de ces deux populations sont supérieures à la moyenne CV de toutes les populations de 2010. De plus, 6 des 12 valeurs maximales rencontrées sont des valeurs de ces populations.

La population 1 en 2011 est celle qui a enregistré le plus de mortalité de fondateurs au cours de l'expérience et qui a le moins de femelles et de mâles non fondateurs à la fin de l'expérience. Cette population présente les meilleurs indices de conditions enregistrés en 2011 pour tous les groupes, hormis pour les juvéniles et les femelles fondatrices qui présentent les indices de conditions les plus faibles.

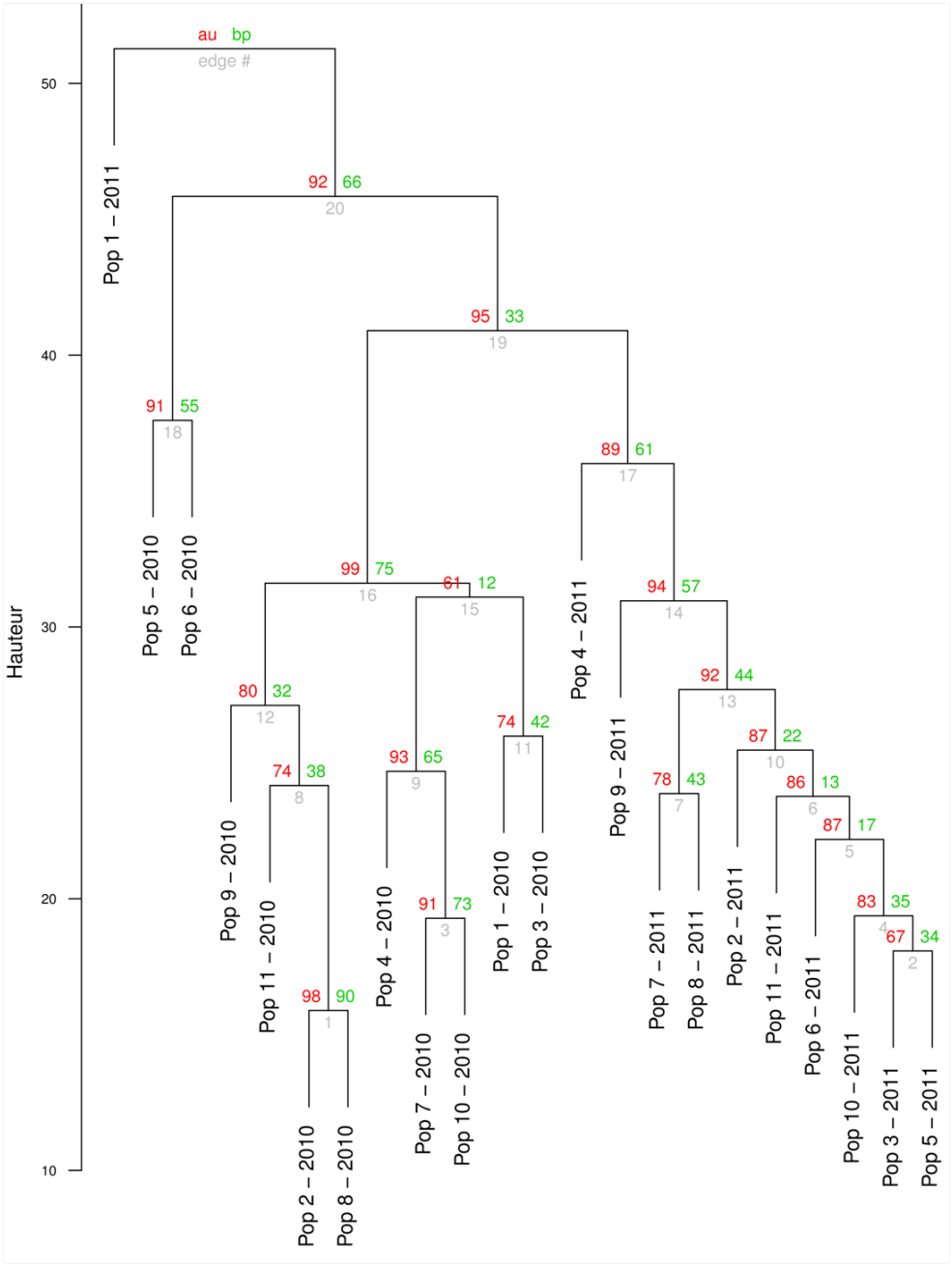

FIGURE 5.11 – Classification ascendante hiérarchiques des variables biologiques à la fin de l'expérience (variables centrées réduites avant analyse, distance de Manhattan, fusion basée sur les moyennes, 1000 bootstrap). Les nombre en rouge correspondent à la probabilité d'existence du nœud en réalisant des bootstraps multi-échelles (canaux et variables). Les nombres verts correspondent à la probabilité d'existence du nœud en réalisant des bootstraps normaux (canaux). Le chiffre gris correspond au numéro du nœud, classé par distance ascendante

.

5.4 Discussion

Il faut noter que la faible quantité de nourriture estimée dans les canaux en 2010 et 2011 (moins de 100 g de nourriture, quel que soit le jour ou l'année) semble trop faible par rapport à des estimations de nourriture attendue [3]. Il est donc fortement supposé que la population de macro-invertébrés est sous-estimée avec la méthode d'échantillonnage employée.

5.4.1 Dynamique de population

Les méthodes de suivi de la dynamique de populations permettent, conjointement, d'identifier quatre phases principales, mais il faut noter, cependant, que des différences inter-annuelles peuvent existent.
La CMR montre une augmentation soudaine des effectifs de la population entre le 40ème aucun alevins dévalés avant et le 80ème jref, date du premier échantillonnage de la population. Les effectifs estimés passent de 15 à 1500 (en moyenne) en 40 jours. Il s'en suit une diminution importante du nombre de poissons dans la population jusqu'au 150ème jref, puis une légère reprise de l'augmentation des effectifs jusqu'au 200ème jref et enfin une nouvelle décroissance des effectifs sur la fin de l'expérience. L'information de l'arrivée successive et rapide des différents stades est appuyée par le suivi de la distribution de la taille standard qui montre une forte croissance entre le 50 ^{ème} et le 100ème jref, puis, malgré un ralentissement de la croissance, cette dernière demeure jusqu'à la fin de l'expérience. Le suivi de la dérive montre des conclusions identiques concernant la forte augmentation des effectifs entre les 40ème et 80ème jref.

5.4.1.1 Première phase : l'augmentation soudaine et forte des effectifs

La première phase débute à partir du 40ème jref pour les deux années témoins, avec l'apparition des premiers alevins dans les mésocosmes. Logiquement, préalablement à cette observation, nous aurions du observer les nids construits par les mâles et pouvoir mieux

3. En ne considérant que les gammares comme macro-invertébrés dans les canaux : 1 gammare de 3 mm pèse 0.11 mg d'après l'équation Eq. 2 - 7a p. 82 et le tableau 2.6 p. 85, soit moins de 1000 gammares dans les canaux, ce qui est trop peu

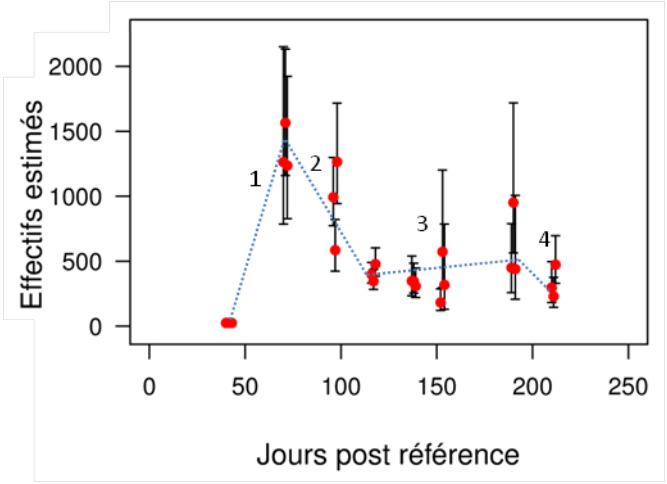

FIGURE 5.12 – Dynamique de la population d'épinoche en 2010. Les quatre phases de la dynamique de la population sont mentionnées par un numéro.
Le jour 0 post référence correspond au début du mois de mars. Le 200ème jref correspond au début du mois d'octobre.

connaître le temps entre les premiers nids observés et l'apparition des premiers juvéniles dans les populations. Cependant, en 2010, cette information n'était pas prise en compte dans le suivi visuel et en 2011, l'expérimentateur n'avait pas l'œil assez avisé pour les distinguer. En 2011, les premiers nids ont été observés après l'apparition des premiers alevins.

En 2011 et en 2012, dès l'introduction des fondateurs dans les canaux, des expériences sur la fécondité des mâles ont été conduites dans des conditions extérieures proches des conditions en mésocosmes. Les premiers nids ont été observés dans cette expérience, le 8 avril 2011 et le 2 avril 2012. Ces nids ont donné des œufs quatre jours après (respectivement 112 dans le premier nid observés en 2011 et 251 et 255 dans les deux premiers nids de 2012).

Par rapport à nos données en mésocosmes, nous pouvons essayer d'estimer la date de construction des nids : il a fallut 118 ˚C.J aux œufs pour éclore (valeurs pour faire éclore 50 % de 229 œufs suivis), soit environ 17 jours, en considérant une température seuil de 4 ˚C. Puis il a fallut 24 ˚C.J aux alevins pour résorber leur sac vitellin (3 jours en prenant une température minimale de 4 ˚C). Lors des expériences menées sur la reproduction des mâles, des observations ont été réalisées montrant qu'il fallait 2 jours à un mâle mis dans des conditions optimales pour construire un nid et collecter les œufs auprès des femelles.

D'où, nous pouvons estimer que les mâles ont construits leur nid autour 17 ^{ème} jref, soit autour du 27 mars.
La différence de 17 jours avec le 10 mars (Georges, 2010) provient peut être du temps de maturation. En effet, à partir du 10 mars, Georges (2010) constate une augmentation du diamètre des ovocytes des femelles et non pas une ponte de la part des femelles.

La première reproduction des fondateurs implique une forte augmentation des effectifs. Cette augmentation est visible lors des CMR réalisées, mais également par le suivi de la dérive des juvéniles (dévalaison). Concernant la dévalaison, il n'y a pas une proportion constante de juvéniles récupérés. Cette proportion varie entre 0,03 % (population 11 en 2011 au 107ème jref) à 5,8 % (population 6 en 2011 au 83ème jref). Cette disparité provient pour partie de l'emplacement des nids. En effet, dans le cas ou un nid se trouve en aval, il y aura d'autant plus de probabilité que les juvéniles dévalent, que le nid soit proche des derniers mètres du mésocosme.

Lors de leur introduction, les fondatrices mesuraient en moyenne 51,34 mm et 42,43 mm, respectivement en 2010 et en 2011. En se reportant aux figures relatives à la fécondité des femelles (Fig. 3.12, page 125), le nombre d'œufs produits était de 150 œufs par femelles (soit 2250 œufs) en 2010 et 75 œufs par femelles (soit 1125 œufs) en 2011.
La comparaison avec les estimations d'effectifs dans les populations montre qu'en 2010. les estimations sont inférieures au nombre d'œufs maximum disponible (moyenne 1250 individus *vs* 2250 œufs disponibles). Cette différence peut être expliquée par trois hypothèses :
(i) La première est que la mortalité des alevins a été particulièrement forte. Cependant, cette hypothèse est peu probable car la prédation n'était pas forte à cette période car il y a une nourriture abondante et une faible compétition entre les mâles car tous ont un territoire suffisant (2 m^2 alors que 0,1 à 0,2 m^2 suffisent d'après Wootton 1985 et van den Assem 1967).
(ii) La deuxième hypothèse est qu'un manque de nourriture a induit une fécondité moindre des femelles en 2010. car la nourriture a un effet sur le nombre d'œufs produits par une femelle (Wootton 1973b et Fig. 3.12 A, page 125). Cette hypothèse semble vraisemblable car la biomasse d'invertébrés était faible au début de l'année 2010.

En 2011, les estimations d'effectifs dans la population sont conformes avec le nombre d'œufs produits par les femelles (moyenne 1050 individus *vs* 1125 œufs disponibles).

Enfin, concernant le reste de l'écosystème, la période antérieure à l'augmentation des effectifs est profitable aux macrophytes dont le volume augmente de façon concomitante en amont et en aval, mais également aux macro-invertébrés dont la biomasse augmente. En revanche, l'augmentation massive des effectifs des épinoches entraine un déclin du volume des macrophytes et de la biomasse des macro-invertébrés qui sont consommés pour nourrir les individus. C'est la phase d'eaux claires. Lors de cette période, la nourriture disponible et la place nécessaire pour le développement des épinoches ne sont pas suffisantes.

5.4.1.2 Deuxième phase : la décroissance des effectifs

Le manque de place et de nourriture implique une augmentation de la compétition entre les individus. Cette compétition à pour conséquence d'augmenter la mortalité des juvéniles (comme observé par le suivi visuel), en particulier par la prédation conspécifique.
Le poids de cette prédation semble forte au regard de la chute brutal des effectifs qui ne peut être compensée par l'éclosion de nouveaux œufs. En revanche, dans le reste de l'écosystème, le volume de macrophytes et la biomasse de macro-invertébrés ré-augmente du fait de la pression moins forte.

Cette période est également celle d'une croissance importante des juvéniles. La température est supérieure à 15 °C, favorisant la croissance. En 20 à 30 jours les juvéniles gagnent 10 mm, (par exemple : en 2010 les juvéniles mesuraient environ 10 mm à la sortie du nid le 40ème jref et plus de 20 mm entre le 63 et le 70ème jref, données issues du suivi visuel). Ceci implique un taux de croissance de l'ordre de 0,30 mm/j, taux de croissance conforme avec les observations des expériences réalisées.

De plus, les juvéniles survivants à la prédation peuvent aisément se cacher dans le cresson (observations personnelles) qui occupe encore une partie importante de la zone amont.

5.4.1.3 Troisième phase : stabilisation des effectifs

A la suite de cette décroissance et en raison d'une nouvelle augmentation de la quantité de nourriture, les effectifs augmentent à nouveau. Cette observation est certainement le fruit d'une diminution de la prédation conspécifique. La nourriture étant de nouveau disponible, les juvéniles ne sont plus prédatés. De plus, les macrophytes se développant également, il est plus facile pour les juvéniles de se cachés. Cependant, cette augmentation des effectifs demeure modérée. La reproduction n'est pas massive comme lors de la première phase, mais elle est répartie au cours du temps. Les épinoches continuent de croître (écart plus important entre les IC à 95 % des distribution de taille, Fig. 5.8), mais le taux de croissance moyen de la population diminue (Fig. 5.8).

5.4.1.4 Quatrième phase : fin de la période de reproduction

La dernière période est marquée par une diminution légère des effectifs à partir du 180ème jref. Cette constatation est le résultat d'une mortalité des juvéniles les plus petits car, les individus grandissant, mais les effectifs restant constant, la pression de prédation se fait plus forte sur les autres compartiments trophiques (macrophytes, macro-invertébrés...) conduisant à une réduction des ressources alimentaires et à une augmentation de la compétition pour l'accès à la nourriture. Cette prédation n'est pas compensée par un renouvellement des individus par la reproduction car la fin de la période de reproduction est attendue autour du 208ème jref (Georges, 2010). Afin de comparer cette estimation avec les données issues des expériences en mésocosmes, considérons la taille finale des juvéniles les plus petits à la fin de l'expérience.

Par rapport à la nourriture présente dans les canaux et la température de l'eau en fin d'expérience, la croissance estimée est de 0,30 mm/j (Tableau 5.5, Fig. 3.7, page 118). Les juvéniles mesureraient 5,72 ± 0,26 mm (taille à la résorption du sac vitellin, tableau 3.8, page 121) le 210ème jref (en considérant une éclosion le 208ème jref et une résorption du sac vitellin en 2 jours). Lors de la récupération des populations, les juvéniles auraient donc grandi de 2,1 mm/j en 2010 (217 jref - 210 jref × 0,30 mm/j) et de 0,6 mm/j en 2011 (212 jref - 210 jref × 0,30 mm/j). Or, à la fin des expériences, les juvéniles les plus petits mesuraient 10 mm en 2010 et 9,55 mm en 2011. Les tailles estimées des plus petits juvéniles sont donc inférieures aux tailles observées. La conclusion est donc que

la reproduction s'est arrêtée avant le 208ème jref dans les mésocosmes. Le différentiel de taille (observé - prédit) est de 2,2 mm en 2010 et 3,2 mm en 2011. En supposant une croissance de 0,3 mm/j, l'arrêt de la reproduction serait donc 7 jours plus tôt en 2010 (2,2 mm / 0,3 mm/j) et 11 jours plus tôt en 2011 (3,2 mm / 0,3 mm/j), soit entre le 25 et le 28 septembre.
Cette fin de la reproduction n'est pas visible avec les données acquises. Des individus ont été relevés lors de la dérive le 203 ^{ème} jref (pop 6 2011). Cependant, par suivi visuel, des alevins de moins de 10 mm n'ont pas été observés à partir du 130ème jref pour les deux années de suivis.

5.4.1.5 Bilan

Chaque méthode permet d'identifier les quatre phases de la dynamique de population. Ces rôles sont précisés dans le tableau 5.3. Elles permettent également d'observer les différents stades et d'estimer les dates d'apparitions (Tableau 5.4).

Avec les connaissances acquises lors des chapitre précédent concernant la croissance (Fig. 3.7, page 118), nous pouvons estimer des taux de croissance pour chaque période des expériences en mésocosme, en considérant la température et la nourriture (Tableau 5.5). Ces informations nous permettent d'estimer quelles sont les conditions rencontrées durant ces deux années témoins.

Les estimations des taux de croissance (Tableau 5.5) montrent que dès l'apparition des alevins, les conditions de nourriture et de températures sont favorables pour une croissance importante (taux de croissance aux alentours de 0,30 mm/j) dans nos conditions. Ce taux de croissance est conforme avec les observations de la taille médiane faites entre le 40ème et le 100ème jref (taille médiane : environ 20 mm le 100ème jref, soit un taux de croissance de 0,20 mm/j ; borne supérieure de l'intervalle de confiance à 95% : environ 30 mm, soit un taux de croissance de 0,3 mm/j)

TABLEAU 5.3 – Mise en évidence des phases par les différentes méthodes de suivis.

Phases	Dates (jref)	Dévalaison des juvéniles	Observation semi-quantitative visuelle	Échantillonnage de la population (CMR)	Distribution de la taille
I	40-70	Augmentation du nombre de juvéniles récupérés quotidiennement	Observations des nids	Augmentation des effectifs	Forte croissance de la taille médiane
II	70-118	Diminution du nombre de juvéniles récupérés quotidiennement	Observations de classes de tailles de 5 mm croissantes et observations de cadavres dans le fond des mésocosmes	Diminution des effectifs	Taille médiane stable
III	115-190	Récupération d'un faible nombre de juvéniles	Observations de quelques petits individus	Légère augmentation des effectifs	Augmentation de l'intervalle à 95% de la distribution de taille
IV	190-fin			Diminution des effectifs	

5.4.2 Variabilité

5.4.2.1 Inter-annuelle

Les observations visuelles et la dérive des juvéniles révèlent que les premiers juvéniles ont été observés dans les canaux à la même date pour les deux années : le 40ème jref. Or, lors du suivi visuel, un décalage apparait dans les dates d'apparition des juvéniles de classes plus grandes. Ce décalage est de 4 jours pour les juvéniles de 10 à 15 mm (56ème jref en 2010 *vs* 60 ^{ème} jref en 2011) et de près de 20 jours pour les individus de plus de 20 mm (63ème jref en 2010 *vs* 81 ^{ème} jref en 2011). Cette différence concernant les juvéniles de 20 mm est également observée sur le suivi de la taille standard des poissons. Ce décalage peut être lié à deux hypothèses :

(i) Au cours des deux années, les suivis non pas été réalisés par le même observateur. Or, selon les observateurs, les impressions visuelles ne sont pas forcément les mêmes (*i.e.* un poisson de 15 mm ne sera pas considéré de la même taille car l'eau a un effet loupe im-

TABLEAU 5.4 – Mise en évidence des stades (par classes de tailles) par les différentes méthodes de suivis.

Classe de tailles (mm)	**Dévalaison des juvéniles**	**Observation semi-quantitative visuelle**	**Échantillonnage de la population (CMR)**	**Distribution de la taille**
< 10	19/04/2010 20/04/2011	21/04/2010 19/04/2011 au 27/04/2011	avant le 09/05/2010 avant le 29/04/2011	avant le 09/05/2010 avant le 29/04/2011
10 - 15		05/05/2010 au 12/05/2010 02/05/2011 au 23/05/2011	9/05/2010 avant le 19/05/2011	
15 - 20		05/05/2010 au 19/05/2010 09/05/2011 au 30/05/2011	14/05/2010 19/05/2011	
> 20		12/05/2010 au 19/05/2010 30/05/2011 au 14/06/2011	19/05/2010 29/05/2011	

TABLEAU 5.5 – Estimation des taux de croissance (mm/j) dans les mésocosmes en fonction des périodes de l'expérience (pas de temps de 50 jours).

	Périodes (jref)	**T °C**	**Nourriture peu abondante**	**Nourriture abondante**	**Nourriture très abondante**
2010	0 - 50	12,5	0,12 à 0,15	0,15 à 0,18	0,18 à 0,22
	50 - 100	15	0,26 à 0,28	0,28 à 0,29	0,29 à 0,33
	100 - 150	19	0,28 à 0,30	0,30 à 0,32	0,32 à 0,35
	150 - 200	17,5	0,26 à 0,29	0,29 à 0,30	0,30 à 0,34
2011	0 - 50	11	0,10 à 0,13	0,13 à 0,15	0,15 à 0,20
	50 - 100	16	0,26 à 0,28	0,28 à 0,30	0,30 à 0,34
	100 - 150	17,5	0,26 à 0,29	0,29 à 0,30	0,30 à 0,34
	150 - 200	17	0,26 à 0,29	0,29 à 0,30	0,30 à 0,34

Le texte en bleu précise le cas rencontré pour l'année considérée.

portant). Alors que l'apparition des alevins est plus évidente car ils sont petits (premiers stades observés), nombreux et que la dérive vient corroborer les observations.
(ii) Les températures plus élevées en 2010 ont permis une croissance plus rapide des juvéniles.
Il est vraisemblable que les deux hypothèses se vérifient, à des moments différents. Au début du suivi visuel, constater un décalage de 4 jours entre deux observations pour des poissons ayant une taille comprise entre 10 et 15 mm n'est pas aberrant et représente un écart lié au pas de temps entre deux suivis visuels. En revanche, les 20 jours de décalage pour les poissons de plus de 20 mm ne peuvent s'expliquer par cette hypothèse et l'effet de la température qui est différente entre les deux années semble plus probable. De plus, cette hypothèse est renforcée par deux résultats observés à la fin des expériences. Le premier concerne le pourcentage de mâles matures parmi les mâles qui est significativement plus important en 2010. Les individus ayant grandi plus vite, il est logique de retrouver une proportion plus importante d'individus matures. Le second est que les femelles non-fondatrices (nées pendant l'expérience) et les juvéniles sont significativement plus grands en 2010.

La croissance des juvéniles était supérieure en 2010, alors que celle des fondateurs (mâles et femelles) était moindre qu'en 2011. La raison de cette observation est que les fondateurs étaient significativement plus grands en 2010 qu'en 2011. Par conséquent, leur taille standard lors de l'introduction était plus proche de leur taille maximale, impliquant, selon les équations de croissance de von Bertalanffy (1938), un taux de croissance diminué.

La nourriture plus abondante en 2011 explique le fait que les indices de condition des adultes (fondateurs et non-fondateurs) soient significativement plus importants qu'en 2010. En effet, l'indice de condition, comme son nom l'indique, renseigne sur l'"état de santé" des individus concernant leur alimentation. Ce "bien-être" est estimé par le rapport entre la masse d'un individu et la masse estimée par rapport à sa taille. Le fait que l'indice de condition soit significativement moindre pour les juvéniles en 2011 indique que le nourriture abondante présente n'est pas nécessairement disponible pour les petits individus, ou que les adultes ont mangé leur source de nourriture. L'indice de condition

de toutes les populations est élevé, indiquant un bon état des poissons dans les conditions des mésocosmes.

Pour conclure cette partie, nous constatons que lors des deux années d'expériences, 15 des 34 variables biologiques suivies présentent des différences significatives entre les années au seuil α de 5%. Ce rapport est de 21 / 34 dans le cas d'un seuil α de 7%. Ces différences sont très importantes et expliquent pourquoi les années sont tant discriminées lors de la classification ascendante hiérarchique (Fig. 5.11, page 190). Cependant, en s'intéressant aux différences entre les années, les facteurs responsables sont aisément identifiables.
Toutes les moyennes des indices de conditions des individus nés pendant les expériences sont significativement différentes. Cela signifie que la quantité de nourriture n'a pas été la même entre les années pour les individus. Ce constat a été effectué avec un rapport $\times$ 2 à 3 identifié (Fig. 5.4, page 178). Les fondateurs n'ont pas été impactés, car étant plus grands que tous les autres, ils ont deux avantages : en cas de compétition ils sont favorisés (ayant une bouche plus grande, ils ont une quantité de nourriture disponible supérieure), et en cas de manque de nourriture, ils peuvent également prédatés les juvéniles.
Toutes les moyennes des tailles standards finales sont significativement différentes entre les années, à l'exception des mâles nés pendant l'expérience. Or, la croissance, comme nous l'avons montré, est dépendante pour partie de la température. Cette croissance plus importante a eu des répercussions sur la structure de la population avec le pourcentage des trois sexes (mâles, femelles et juvéniles) et le nombre de mâles et de femelles nés pendant l'expérience significativement différent au seuil α de 7 %.

La variabilité inter-annuelle est donc fortement due à la température de l'eau, ainsi qu'à la quantité de nourriture présente. Ces deux facteurs ont des effets sur la croissance des individus, mais également sur la structure de la population. Ces deux facteurs sont ceux sur lesquels des efforts de caractérisation et de quantification doivent être fournis pour parvenir à un modèle de dynamique des populations le plus fiable possible.

5.4.2.2 Intra-annuelle

Lors de la classification ascendante hiérarchique (Fig. 5.11 p. 190), trois groupes ont été formés : il s'agit des populations de 2010, des populations de 2011 et d'un groupe de population n'ayant pas de similitude statistique avec les autres. Ce groupe est composé des populations 5 et 6 en 2010 et 1 en 2011.
Comme nous venons de le voir, les deux premiers groupes cités se différencient par la variabilité inter-annuelle, que nous avons expliquée par les différences de température et d'abondance de la nourriture. Cependant, il est important de comprendre pourquoi les populations 5 et 6 en 2010 et 1 en 2011, formant le dernier groupe, ne sont pas similaires aux autres populations. Pour ce faire, nous avons réalisé une analyse en composante principale (ACP), avec l'ensemble des données (données centrées réduites), afin de relier les observations avec les variables mesurées (Fig. 5.13).

Les trois premières composantes de cette ACP expliquent 63 % de la variabilité (Fig. 5.14).

La première composante est fortement impactée par l'indice de condition des juvéniles, des mâles (tous les mâles) et des mâles non-fondateurs. Elle discrimine fortement la population 1 de l'année 2011 car cette dernière présente le plus faible indice de condition des juvéniles, le plus fort indice de condition des mâles et en particulier celui des mâles non fondateurs et une très faible variabilité de la taille standard des juvéniles. Cette population est en plus marquée par le taux de mortalité des fondateurs le plus important (respectivement 60 et 70 % pour les femelles et les mâles). Cette mortalité n'est pas expliquée car elle est sans comparaison avec ce qui a été observé dans les autres canaux. Par ailleurs, cette population est caractérisée par un plus faible nombre de mâles et de femelles non fondateurs. Ces derniers ont les tailles standards moyennes les plus faibles (30,61 et 31,28 mm, respectivement pour les femelles et pour les mâles) observés à la fin de l'expérience. Ceci est caractéristique d'une population dans laquelle le renouvellement a été affecté par un manque de géniteurs. Cette caractéristique est appuyée par le fait que la structure de la population est différente des autres populations, avec plus de 75% de la population qui est au stade juvénile (contre 67% en moyenne dans les autres populations de la même année).
La deuxième composante est impactée par les coefficients de variations (CV) des va-

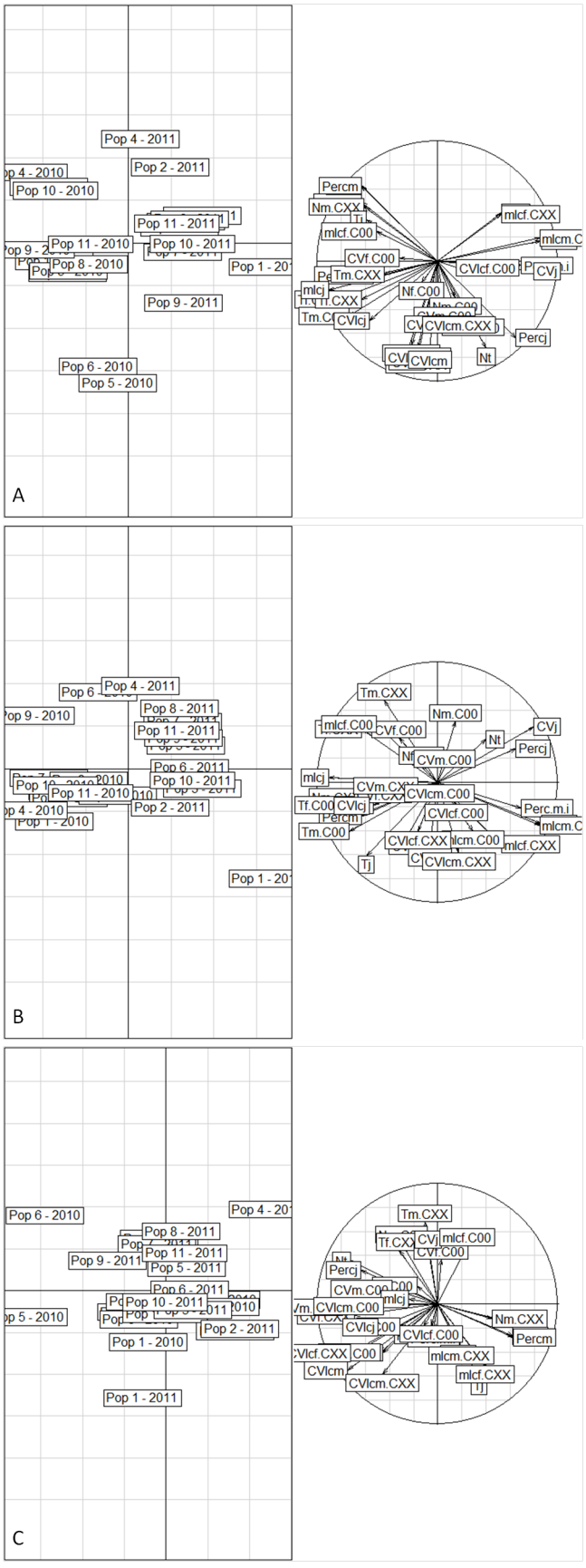

FIGURE 5.13 – Analyse en composante principale de l'ensemble des données.
A : Axe 1 - 2 ; B : Axe 1 - 3 ; C : Axe 2 - 3

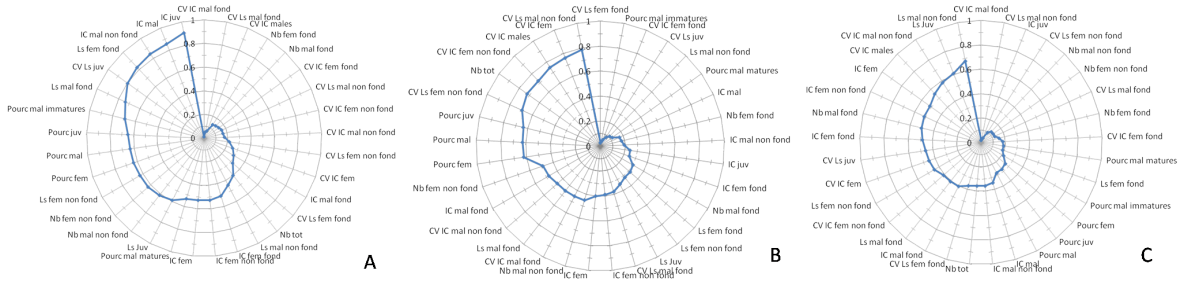

FIGURE 5.14 – Poids des variables biologiques sur les composantes de l'analyse en composante principale (en valeur absolue), la composante 1 (A) explique 28,2 % de la variabilité. La composante 2 (B) explique 21,0 % de la variabilité et la composante 3 (C) représente 13,5 % de la variabilité.
IC : Indice de condition, *Ls* : Longueur standard moyenne, *Pour* : pourcentage, *Nb* : nombre, *CV* : coefficient de variation,
mal : mâles, *fem* : femelles, *juv* : juvéniles,
fond : fondateurs, *non fond* : nés pendant l'expérience.

riables biologiques, en particulier le CV de la taille standard des mâles et des femelles non-fondateurs, et le CV de l'indice de conditions des femelles et des mâles. De plus, cette composante montre un poids important de la structure de la population caractérisée par le nombre total et par les pourcentages de mâles, de femelles et de juvéniles. Lors d'une analyse approfondie de ces populations, nous nous sommes aperçus qu'il s'agissait de populations pour lesquelles les effectifs totaux étaient les plus importants.

Dans la population 5, une erreur de sexage a été commise (1 mâle pris pour une femelle) lors de la détermination du sexe des poissons (par observations des caractères sexuels secondaires) en amont de l'expérience.

Dans la population 6, en revanche, aucune erreur de sexage n'a été observée sur les 11 femelles fondatrices survivantes. Or la population 6 est celle qui a le plus d'individus (1286) et le plus fort pourcentage de juvéniles (79,95%) et trois mâles fondateurs survivants à la fin de l'expérience. l'hypothèse la plus probable, mais non vérifiable est qu'une erreur de sexage en faveur d'un mâle a été commise (dans les 4 femelles mortes), expliquant le nombre important de juvéniles.

La troisième composante est impactée par la taille standard des mâles non-fondateurs et des juvéniles ainsi que par l'indice de condition (moyenne) des femelles et par la variabilité de l'indice de condition des mâles. Or, la population 1 en 2011 présente la plus petite

taille standard moyenne des mâles non fondateurs (31,28 mm) et les plus forts indices de conditions des femelles (1,00) ainsi que la plus forte variabilité de l'indice de condition des mâles (CV > 11,15 %).

Ainsi, les trois composantes de l'ACP permettent d'identifier les variables qui discriminent les populations. Par cette analyse, nous mettons en avant l'importance des fondateurs au début de l'expérience de deux manières différentes :

(i) Les erreurs de sexage en faveur des mâles sur deux populations en 2010 ont eu pour conséquences d'accroître l'effectif total de la population et la variabilité de la taille standard des mâles et des juvéniles.

(ii) La mortalité importante, mais non expliquée, des fondateurs (60% de femelles et 70% de mâles) dans la population 1 en 2011 a donné une population caractérisée par des tailles standards moyennes des mâles et des femelles non fondateurs les plus petites sur l'ensemble des populations. De plus, la compétition pour la nourriture a été moins importante que dans les autres populations car les individus adultes étaient moins nombreux et plus petits, augmentant ainsi l'accès à la nourriture disponible, ayant un impact favorable sur l'indice de condition des individus adultes.

5.5 Conclusions

Cette partie a défini les phases clés lors du déroulement des expériences en mésocosmes lotiques en conditions témoins.

Dans ces expériences, la variabilité inter-annuelle s'est expliquée essentiellement par des différences au niveau de la température ainsi que par des différences au niveau de la quantité de nourriture disponible. Ces deux facteurs ont eu pour conséquence d'affecter la croissance et la reproduction des individus.

La variabilité intra-annuelle, quant à elle, s'explique principalement par des différences au niveau des conditions initiales (sex-ratio des fondateurs introduits) ou est la résultante d'une mortalité importante et précoce des fondateurs. Ces deux facteurs influent directement sur la reproduction et indirectement sur des processus de prédation et de compétition qui sont moindres par rapport aux autres canaux (moyennes des indices de conditions fortes).

CHAPITRE

6

ÉTUDE DES EFFETS DU BISPHÉNOL A SUR UNE POPULATION D'ÉPINOCHES.

6.1 Introduction

L'épinoche à trois épines présente un réel potentiel pour estimer le risque lié aux perturbateurs endocriniens (Bernhardt *et al.*, 2006; Björkblom *et al.*, 2007; Brian *et al.*, 2006; Jolly *et al.*, 2009; Katsiadaki *et al.*, 2002), parmi lesquels le bisphénol A(BPA). Une étude des effets du BPA en mésocosmes répondrait aussi au manque de données pour évaluer les effets du BPA à l'échelle de la population dans des conditions écosystémiques.

Cette partie vient compléter le travail entrepris précédemment. Le cycle de vie de l'épinoche en mésocosme étant connu, un protocole a été défini afin de suivre la dynamique de la population en mésocosme lotiques à Verneuil-en-Halatte, cette dernière ayant été caractérisée en conditions témoin. Les connaissances acquises sont donc assemblées pour mettre en avant et observer les effets d'une molécule en condition écosystémique.

6.2 Matériel et Méthode

6.2.1 Contamination par le BPA

6.2.1.1 Choix des concentrations

En accord avec les informations trouvées dans la littérature (Tableau 1.1 et Flint *et al.* 2012; Licht *et al.* 2004; Oehlmann *et al.* 2000; Staples *et al.* 2011), trois concentrations de BPA ont été sélectionnées : 1, 10 et 100 μg/L.

La plus petite concentration est de l'ordre de grandeur des concentrations qui se retrouvent dans l'environnement. De plus, une étude a montré que des effets sur les espèces les plus sensibles peuvent être mis en évidence à cette concentration d'exposition (Oehlmann *et al.*, 2000). La concentration la plus élevée est supposée donner lieu à des effets notables sur toutes les communautés : macrophytes (Alexander *et al.*, 1988), macro-invertébrés (Andersen *et al.*, 1999; Duft *et al.*, 2003; European Union, 2008; Flint *et al.*, 2012; Fukuhori *et al.*, 2005; Hoshi *et al.*, 2003; Jobling *et al.*, 2004; Kohra *et al.*, 2002; Levy *et al.*, 2004; Pascoe *et al.*, 2002) et poissons (Flint *et al.*, 2012; Metcalfe *et al.*, 2001; Mihaich *et al.*, 2012). Enfin, la concentration intermédiaire permet de respecter une suite logarithmique des concentrations testées. Les canaux ont été distribués aléatoirement pour chaque concentration de façon à obtenir 3 canaux par concentrations de BPA et trois canaux témoins (Tableau 6.1).

Les concentrations les plus fortes (10 et 100 μg/L) sont également choisies afin de répondre à la troisième question méthodologique de cette thèse énoncée lors de l'introduction : *"Peut-on mettre en évidence, à l'aide des mésocosmes, l'effet d'une perturbation sur la dynamique de population d'épinoche ?"*. La concentration de 100 μg/L étant reconnue dans la littérature comme ayant des effets sur tous les compartiments, est assez forte pour répondre à la question posée. En cas de non effet observé, la réponse à la question méthodologique sera négative. Dans le cas d'une étude avec de faible concentrations (environnementale et en-dessous), en cas de non effet observé, les conclusions n'auraient pas pu être généralisées à l'utilisation des mésocosmes car seules les espèces les plus sensibles

sont impactées à 1 μg/L de BPA.

TABLEAU 6.1 – Attribution des concentrations pour chaque canal des mésocosmes.

Concentration (μg/L)	**Canaux**		
0	2	3	11
1	1	5	8
10	6	9	10
100	4	7	12

6.2.1.2 Protocole de contamination

Les mésocosmes ont été contaminé de façon chronique avec du BPA entre le 15 avril (noté jours post contamination, *jpc* + 0) et le 28 septembre 2012 (jpc + 166). La date de début de contamination a été choisie afin que les adultes aient eu un temps nécessaire pour leur adaptation dans le milieu et la mise en place de la reproduction dans les mésocosmes tout en s'assurant que les premiers alevins ont été exposés au BPA dès les premières heures de leur vie.

La solution mère de BPA était une solution de BPA (99%, Sigma-Aldrich, France) dans de l'éthanol (95%, Prolabo) à la concentration de 40 g/L. Dans des cuves de 400 L, une solution fille à 5 mg/L fut réalisée par ajout d'eau. Des pompes péristaltiques étaient connectées entre les cuves et les mésocosmes pour alimenter en continu les mésocosmes, en introduisant le volume de solution fille nécessaire dans le bac de mélange des mésocosmes. Le stock de solution initiale était changé tous les 12 jours.

Les volumes d'éthanol introduit sont de 7,12 $\times$ 10^{-3}, 5,36 $\times$ 10^{-2} et 0,472 μL/h, respectivement pour les concentrations à 1, 10 et 100 μg/L de BPA (Les informations sur le calcul sont dans l'annexe F p. 300).

6.2.1.3 Suivi de la contamination

Tous les mois, la concentration de BPA dans l'eau était mesurée dans tous les mésocosmes, à différents emplacements (0, 5 et 19 m depuis l'introduction de l'eau). Les

mesures ont été effectuées par l'unité NOVA de l'INERIS.

La méthode utilisée pour doser le BPA était une extraction par phase solide en ligne couplée à de la chromatographie par phase liquide/spectrométrie de masse en tandem. Un étalon interne de BPA $^{12}C_{13}$ (énergie de cone 24, énergie de collision 26 et transition m/z 227 à 212) était également ajouté à tous les échantillons avant analyse afin de prendre en compte des effets d'interférences matricielles pendant l'extraction et la détection. La limite de quantification et de détection a été établie à 0,1 μg/L. Un complément d'information est disponible dans la publication de de Kermoysan *et al.* (2013a) et dans l'annexe G (page, 301).

6.2.2 L'habitat : Aménagement et stabulation

Les mésocosmes ont été aménagés et stabulés entre octobre 2011 et mars 2012.
Le protocole d'aménagement des canaux, de suivi des paramètres physico-chimiques et de suivi des abondances d'espèces sont décrits chapitre 2.3.1 (page 58).

6.2.3 Les fondateurs

Le 5 mars 2012 (jpc - 40), les poissons fondateurs (15 femelles et 10 mâles) ont été introduits dans les mésocosmes. Les mâles mesuraient entre 39.66 mm et 51.26 mm (44.36 $\pm$ 2.50 mm, Tableau 6.2). Les longueurs ne différaient pas significativement entre les canaux (ANOVA ; ddl résiduels = 118 ; p = 0,59). Les femelles mesuraient entre 40,00 mm et 48.20 mm (42.95 $\pm$ 1.40 mm, Tableau 6.2). Les longueurs ne différaient pas significativement entre les canaux (ANOVA ; ddl résiduels = 177 ; p = 0,782).

Tableau 6.2 – Allométrie des fondateurs en 2012.

Population	**Femelles**	**Mâles**
	Longueur (mm)	**Longueur (mm)**
1	43,57 ± 1,64	44,56 ± 1,47
2	43,38 ± 1,08	44,25 ± 2,14
3	42,93 ± 1,35	43,83 ± 2,29
4	42,22 ± 1,43	44,39 ± 1,87
5	42,88 ± 1,30	44,44 ± 2,07
6	42,42 ± 1,33	45,76 ± 2,47
7	43,41 ± 1,29	44,02 ± 3,17
8	43,61 ± 1,06	45,30 ± 3,37
9	42,87 ± 1,16	44,16 ± 2,53
10	42,87 ± 1,46	44,05 ± 3,13
11	42,65 ± 1,44	43,98 ± 2,07
12	43,26 ± 1,91	43,79 ± 1,90

6.2.4 Suivi de la population

Les protocoles détaillés sont décrit dans le chapitre 2.3.2.2 (page 72).

6.2.5 Fin d'expérience

L'exposition s'est achevée le 28 septembre 2012 et les populations ont été récupérées entre le 1er et le 4 octobre 2012 (172 jpc soit 210 jref). La récupération des populations s'est déroulée selon le protocole défini chapitre 2.3.3.1 (page 74).

6.2.6 Acquisition et analyse des données

Les variables biologiques estimées au cours et à la fin de l'expérience sont celles qui sont énumérées dans le chapitre 2.3.2.2 (page 72). Pour les résumer, elles caractérisent la dynamique de la population en s'intéressant aux juvéniles (dérive) au nombre d'individus total dans la population (estimation par méthode de CMR et suivi visuel) et à la distribution des classes de taille.

Le développement des gonades a été échantillonné sur les mâles et les femelles tant fondateurs, que ceux qui sont nés pendant l'exposition. Les poissons mesuraient entre 25 et 65 mm. Le développement a été estimé par deux mesures (longueur et largeur) qui ont été résumées en quatre variables : le ratio de la longueur de la gonade sur la longueur standard du poisson, le ratio de la largeur de la gonade sur la longueur standard du poisson, la surface de la gonade (largeur $\times$ longueur) sur la longueur standard du poisson et le ratio du volume des gonades sur le volume du poisson (en considérant la relation largeur / longueur du poisson 1 :4, Wootton 1984). Les ratios ont été préférés car ils permettent de s'affranchir de la longueur du poisson. Ces différents ratios permettent de prendre en compte toutes les dimensions du poisson.

Le traitement des données est présenté chapitre 2.4.3 (page 90).

6.3 Résultats

6.3.1 Suivi de la contamination

Les concentrations en BPA diminuent progressivement le long du canal, quelle que soit la concentration nominale (Fig. 6.1). Les concentrations mesurées montrent qu'elles sont proches des concentrations nominales à l'entrée des mésocosmes. Puis, les concentrations diminuent rapidement entre 0,5 et 5 m et reste constantes jusqu'à 19 m.

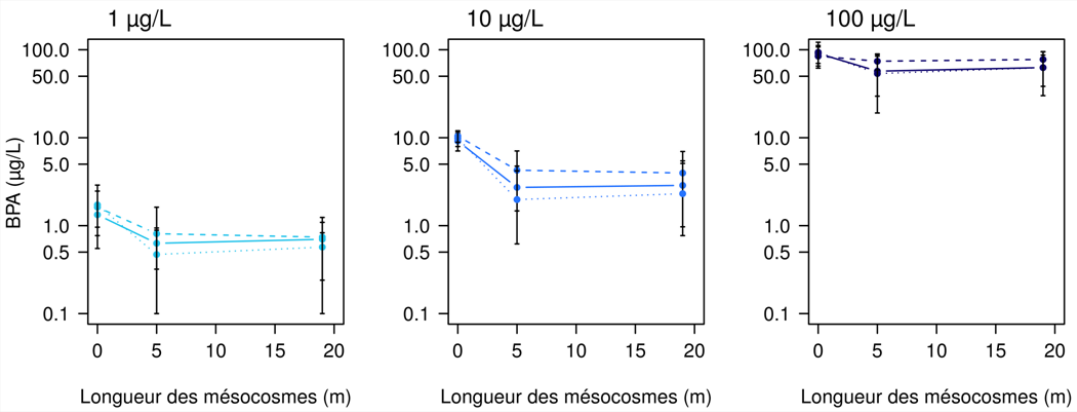

FIGURE 6.1 – Concentration de BPA dans les mésocosmes en fonction de la longueur du mésocosme.
Les points représentent les moyennes des mesures sur l'ensemble de l'expérience pour un mésocosme, et les écarts types représentent la variabilité au cours de la contamination.

6.3.2 Suivi de l'habitat

6.3.2.1 Paramètres physico-chimique

Les données présentées sont les moyennes globales sur l'ensemble de la période d'étude dans le but de présenter une allure globale et non pas une analyse détaillée des conditions environnementales (Complément d'informations dans l'annexe G, page 301).

La moyenne journalière de la température de l'eau présente des différences entre 5 et 15 m (RM-ANOVA ; ddl résiduels = 348 ; $p < 0{,}001$). De plus, l'interaction de l'emplacement (5 ou 15m) et du temps influe sur la température (RM-ANOVA ; ddl résiduels = 348 ;

$p < 0{,}001$). La température moyenne journalière évolue entre 2.81 ˚C et 20,57 ˚C.

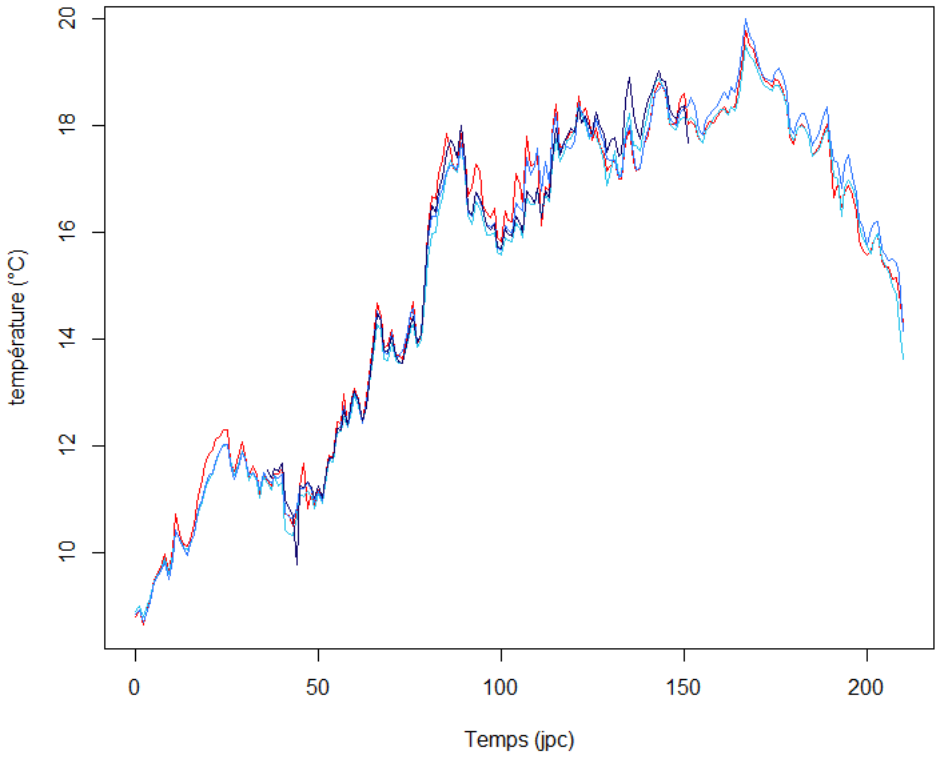

FIGURE 6.2 – Moyennes journalières des températures de l'eau pendant l'expérience pour les canaux témoins (—), exposés à 1 μg/L de BPA (—), à 10 μg/L de BPA (—) et à 100 μg/L de BPA (—).

Le profil de la température est proche de celui rencontré en 2011, à savoir une augmentation progressive de la température moyenne journalière, puis, à partir du 100ème jpc une température relativement stable jusqu'au 170ème jpc, qui montre ensuite un décrochage de la température moyenne journalière (semblable à ce qui avait été observé en 2010).

Les paramètres environnementaux (pH, conductivité et oxygène dissous) sont présentés Fig. 6.3.

L'interaction du temps et de la concentration en BPA à des effets sur l'oxygène dissous et sur le PH dans l'eau (RM-ANOVA Oxygène dissous ; ddl résiduels = 225 ; $p < 0{,}005$, RM-ANOVA pH ; ddl résiduels = 206 ; $p < 0{,}01$) mais par sur la conductivité (RM-ANOVA ; ddl résiduels = 215 ; $p = 0{,}204$). Le pH, la conductivité et l'oxygène dissous sont

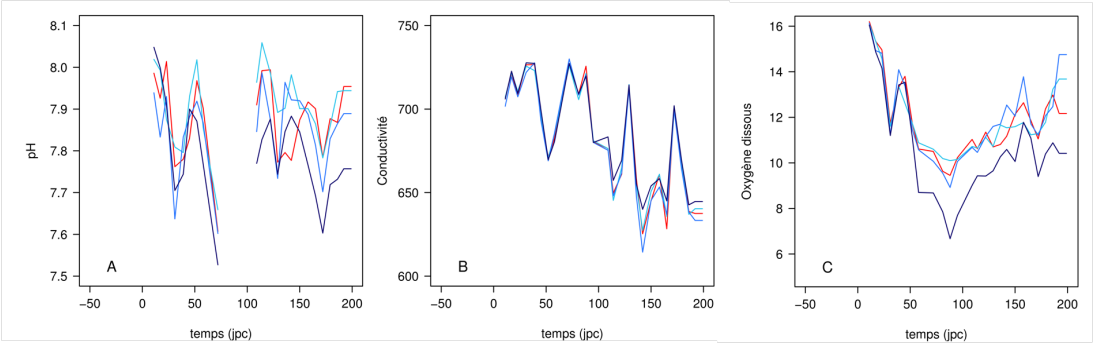

FIGURE 6.3 – Mesure des paramètres physico-chimique (pH, Oxygène dissous et conductivité) pendant l'expérience pour les canaux témoins (—), exposés à 1 μg/L de BPA (—), à 10 μg/L de BPA (—) et à 100 μg/L de BPA (—).
A : pH ; B : conductivité (μS/cm) ; C : Oxygène dissous (mg/L).

significativement affectés par la concentration en BPA et le temps d'exposition (tableau 6.3, RM-ANOVA Conductivité ; ddl résiduels = 215 ; $p < 0{,}001$, RM-ANOVA Oxygène dissous ; ddl résiduels = 225 ; $p < 0{,}001$, RM-ANOVA pH ; ddl résiduels = 206 ; $p < 0{,}001$). En particulier, le pH est significativement plus faible à 100 μg/L le 65ème jpc et entre le 109ème jpc et la fin des expériences (DUNNETT ; $p < 0{,}05$). La concentration en oxygène dissous dans les canaux exposés à 100 μg/L est significativement plus faible que dans les canaux témoins entre le 31 et le 68ème jpc et entre le 109ème et le 138ème jpc (DUNNETT ; $p < 0{,}05$). La conductivité est significativement plus élevée à 100 μg/L que dans les témoins entre le 68ème et le 109ème jpc (DUNNETT ; $p < 0{,}05$).

TABLEAU 6.3 – Valeurs des paramètres physico-chimique (pH, Oxygène dissous et conductivité) de l'environnement (moy ± sd) pour chaque traitement.

	Témoins	**1 μg/L**	**10 μg/L**	**100 μg/L**
Oxygène dissous (mg/L)	12,0 ± 1,6	12,3 ± 1,8	12,1 ± 1,6	10,5 ± 2,3
pH	7,84 ± 0,10	7,85 ± 0,12	7,82 ± 0,13	7,74 ± 0,11
Conductivité (μS/cm)	684 ± 32	679 ± 30	682 ± 33	685 ± 29

6.3.2.2 Les macrophytes

Le volume occupé par les macrophytes dépend de la concentration en BPA (RM-ANOVA ; ddl résiduels = 42 ; p < 0.001). Lors de l'expérience, le volume occupé par les macrophytes dans la partie amont augmente entre le -38ème jpc et le 47ème jpc (Fig. 6.4). Puis, il se stabilise jusqu'au 103ème jpc, à partir duquel, le volume diminue dans les canaux témoins et exposés à 1 et 10 μg/L de BPA (73ème jpc dans les canaux exposés à 100 μg/L de BPA). Le volume occupé dans la partie amont augmente progressivement au cours de l'expérience. Seuls les canaux exposés à 100 μg/L de BPA montrent un retard dans la croissance des végétaux (Fig. 6.4).

Le volume présenté Fig. 6.4 est la somme des moyennes d'un même traitement des volumes des quatre macrophytes présentent dans les mésocosmes à un même endroit. Le cresson est l'espèce prépondérante. Il est présent dans la partie amont de chaque canal. Le volume du cresson est significativement affecté par la concentration en BPA (RM-ANOVA ; ddl résiduels = 3594 ; p < 0,001). En particulier, le volume occupé par le cresson est négativement affecté par rapport aux autres traitements les 59ème jpc, 73ème jpc et toutes les dates à partir du 116ème jpc (DUNNETT ; $p < 0,05$).
Les autres espèces (callitriche, myriophylle et spyrogyra) sont présentes dans la partie aval des canaux. Leur volume n'est pas dépendant de la concentration en BPA (RM-ANOVA callitriche ; ddl résiduels = 3594 ; p = 0,076, RM-ANOVA myriophylle ; ddl résiduels = 3594 ; p = 0,368, RM-ANOVA spyrogyra ; ddl résiduels = 3594 ; p = 0,348). Seul le 59ème jpc présente un volume de callitriche significativement différent entre les canaux exposés à 100 μg/L de BPA et les autres canaux (DUNNETT ; $p < 0,05$).
L'interaction du temps et de la concentration en BPA n'influe pas sur les volumes des macrophytes (RM-ANOVA cresson ; ddl résiduels = 3594 ; p = 0,0547, RM-ANOVA callitriche ; ddl résiduels = 3594 ; p = 0,169, RM-ANOVA myriophylle ; ddl résiduels = 3594 ; p = 0,395, RM-ANOVA spyrogyra ; ddl résiduels = 3594 ; p = 0,134).

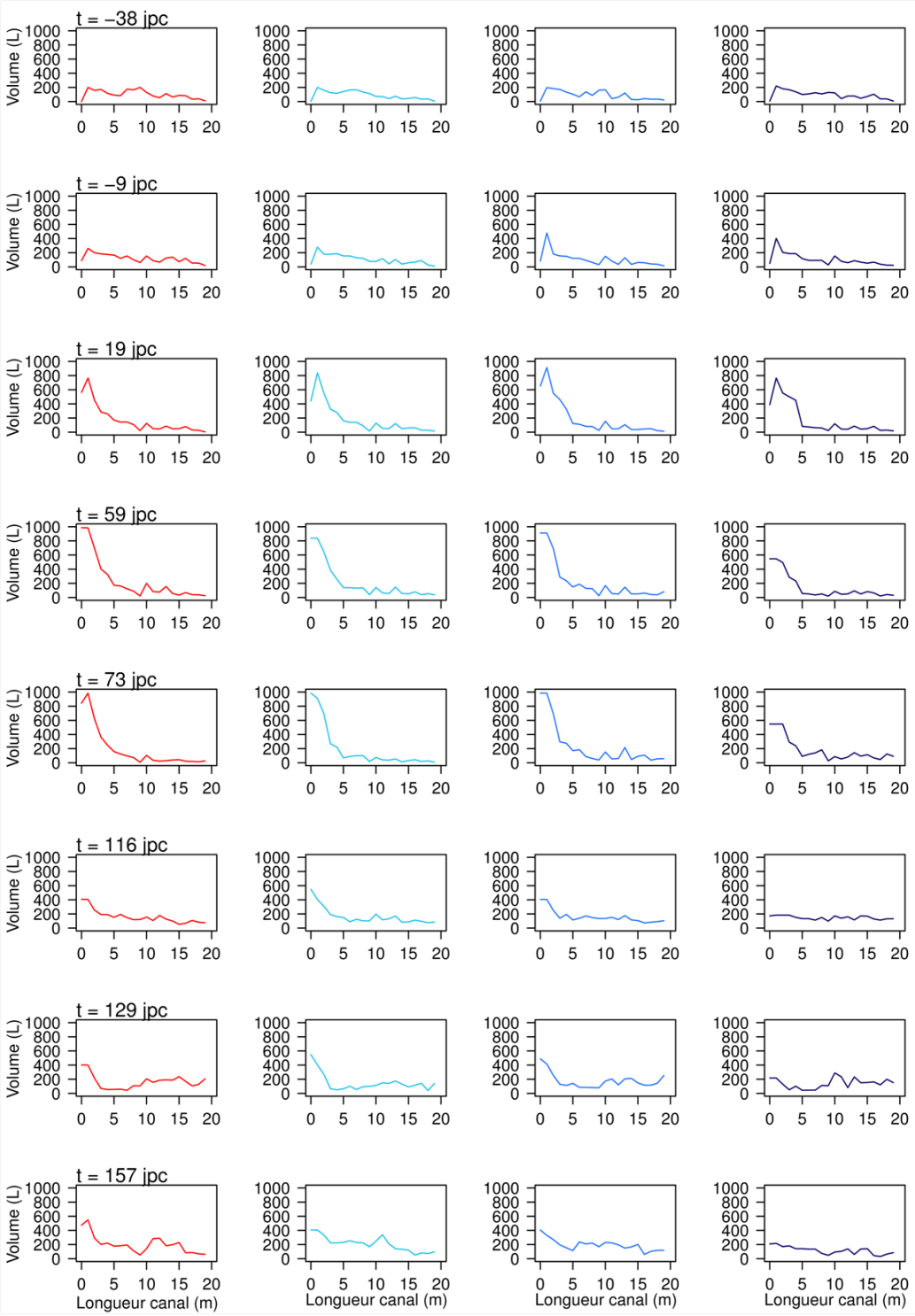

FIGURE 6.4 – Volume global moyen par traitement occupé par les macrophytes dans les mésocosmes pendant l'expérience pour les canaux témoins (—), exposés à 1 μg/L de BPA (—), à 10 μg/L de BPA (—) et à 100 μg/L de BPA (—).

6.3.3 Suivi de la nourriture

A ce jour, les analyses d'identification et de dénombrement du zooplancton ne sont pas finies. Par conséquent, les données ne peuvent être présentées.

Concernant les macro-invertébrés, la biomasse totale présente dans les mésocosmes évolue au cours de l'expérience (Fig 6.5). Après introduction des espèces, la biomasse totale diminue jusqu'au début de la contamination. Ensuite, une augmentation importante de la biomasse totale est observée dans toutes les conditions pendant les 20 premiers jpc, à l'exception des systèmes exposées à 10 μg/L de BPA dans lesquelles, l'augmentation importante est observée jusqu'au 74 ^{ème} jpc. Ensuite, la biomasse totale diminue (phase des eaux claires) jusqu'au 130 ^{ème} jpc. Après cette date, la biomasse totale augmente à nouveau.

Quels que soient le traitement et le nombre de jours post contamination considérés, la biomasse accessible augmente avec la taille de la bouche du poisson (largeur de la bouche : $0,258 \times Ls - 0,571$ et hauteur de la bouche : $0,0755 \times Ls - 0,175$, Eq. 2 - 8, page 87) jusqu'à un plateau (Fig. 6.6). La biomasse totale disponible par classe de taille évolue entre 0,1 kg pour les petites classes de tailles (bouche de 1.2 mm, juvéniles sortant du nid, soit 7 mm) à 8 kg pour les épinoches ayant une bouche dont la largeur est supérieure à 6 mm (soit longueur standard de 24 mm) le 18 ^{ème} jpc (tous les traitements) et le 74 ^{ème} jpc pour les populations exposées à 10 μg/L de BPA. Cependant, ces valeurs sont sous-estimées car le zooplancton [1] n'est pas pris en compte dans les calculs. Or le zooplancton, en raison de sa petite taille, sera disponible pour toute la population.

6.3.4 Effets sur la dynamique de population d'épinoches

6.3.4.1 Suivi quantitatif par observations visuelles

Le suivi réalisé par observations visuelles (suivi visuel) montre que quasiment aucun nid n'a été construit avant l'exposition au BPA (tableau 6.4). La contamination a débuté avec la reprise de la reproduction. Par conséquent, comme initialement prévu, tous les poissons nés dans le mésocosme au cours de l'expérience ont été exposés au BPA.

1. Données en cours d'analyse

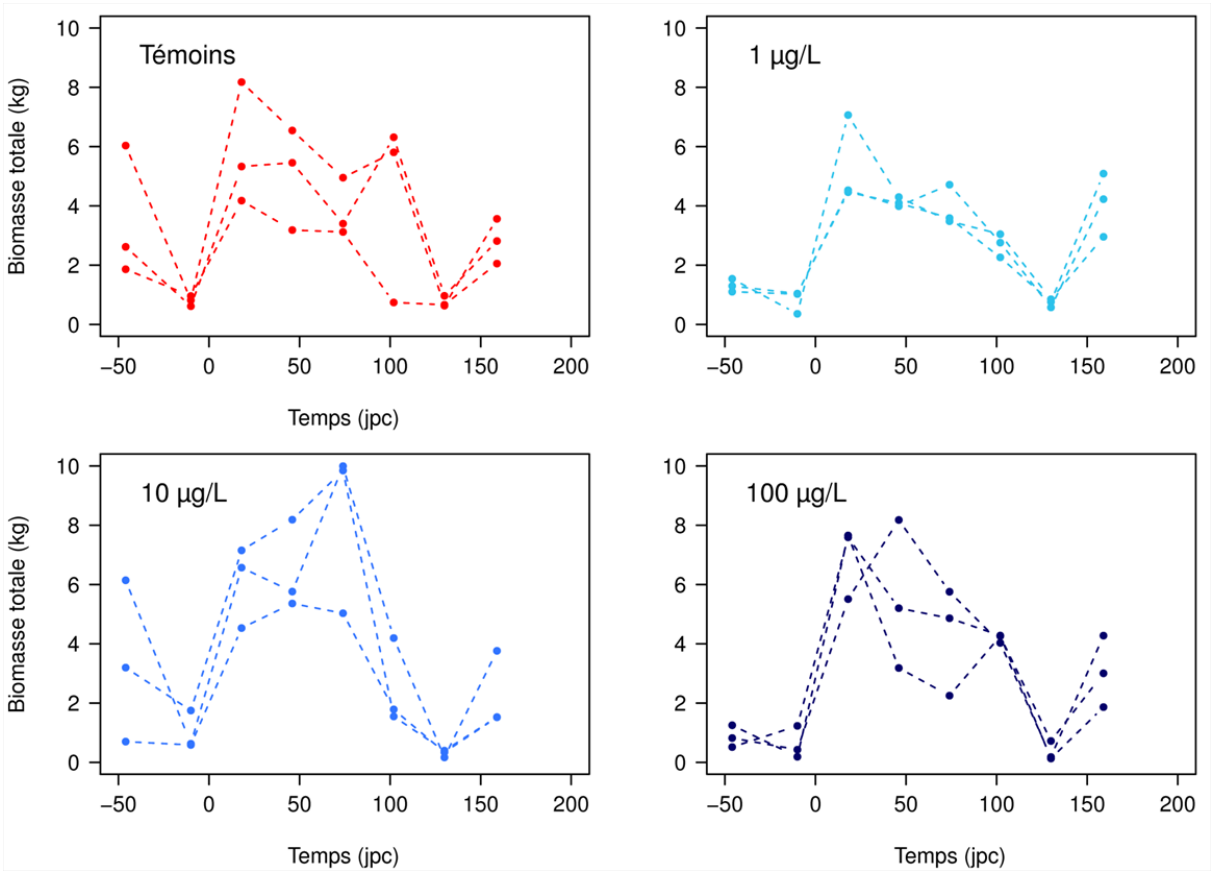

FIGURE 6.5 – Suivi de la biomasse totale de nourriture dans les mésocosme pendant l'expérience pour les canaux témoins (—) et exposés à 1 μg/L de BPA (—), à 10 μg/L de BPA (—) et à 100 μg/L de BPA (—).
Les points correspondent aux observations réalisées.

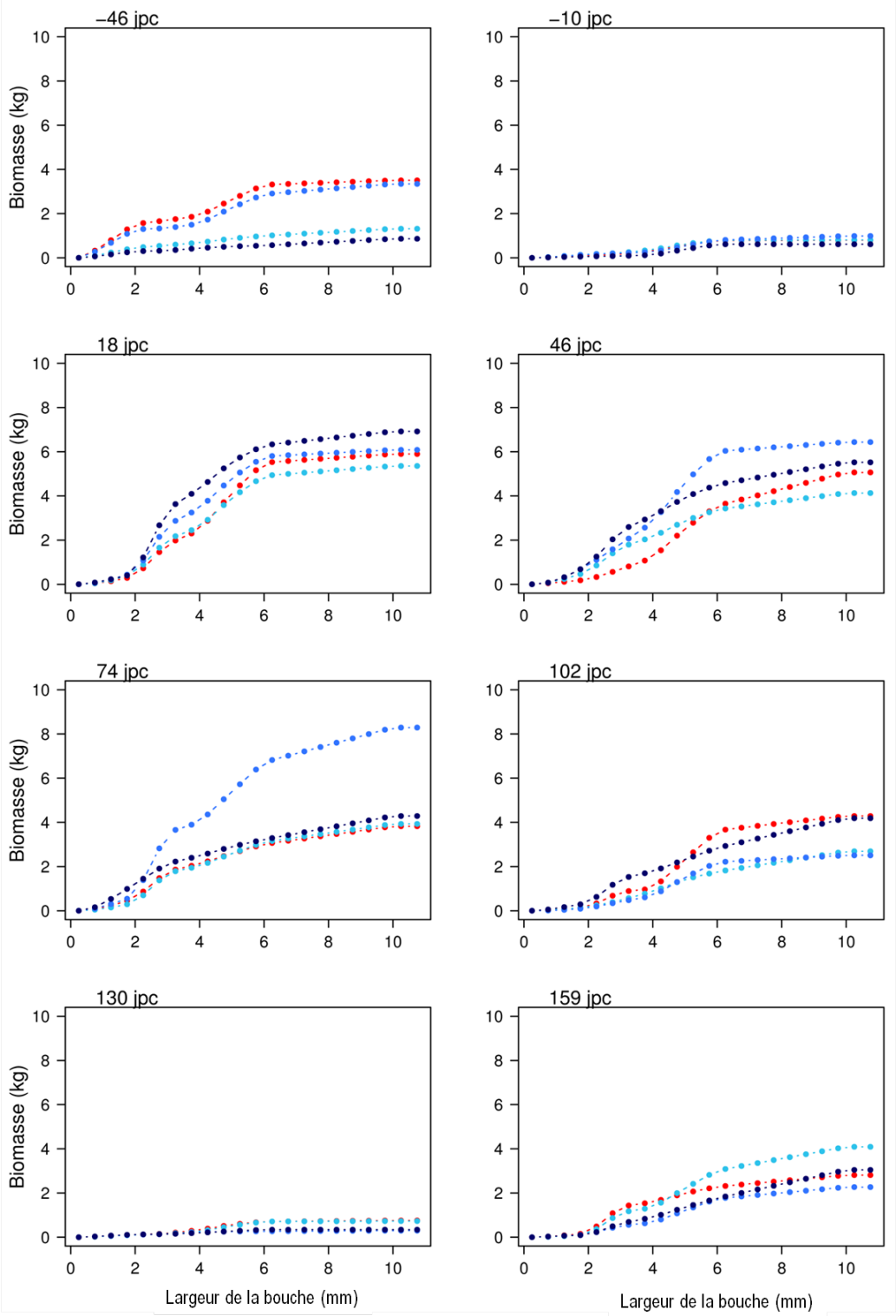

FIGURE 6.6 – Suivi de la biomasse disponible pour les épinoches en fonction de la taille de leur bouche ($0,258 \times Ls - 0,571$ Nettleship 2011) dans les mésocosme pendant l'expérience pour les canaux témoins (—) et exposés à 1 μg/L de BPA (—), à 10 μg/L de BPA (—) et à 100 μg/L de BPA (—).

Dans une seule population exposée à 10 μg/L de BPA (Population 6), le premier nid a été observé 9 jours avant le début de la contamination (tableau 6.4). Cette population présente également la caractéristique d'avoir des juvéniles de moins de 10 mm 5 jours seulement après le début de la contamination. Cependant les observations par suivi visuel mentionnent de 1 à 20 individus seulement. Dans la majorité des populations, les premiers juvéniles de moins de 10 mm sont observés entre le 12 ^{ème} et le 20 ^{ème} jpc. Puis, entre le 20 ^{ème} et le 26 ^{ème} jpc, les juvéniles de 15 à 20 mm apparaissent. Seule la population 4 (exposée à 100 μg/L de BPA) montre une apparition tardive de cette classe de taille (32 ^{ème} jpc). Les juvéniles de 15 à 20 mm apparaissent dans toutes les populations (exceptée la population 4) entre le 32 ^{ème} et le 38 ^{ème} jpc. Enfin, entre le 38 ^{ème} et le 46 ^{ème} jpc, les juvéniles de plus de 20 mm sont observés dans toutes les populations. De manière générale, le suivi visuel montre une diminution du nombre de juvéniles de moins de 15 mm observés et une augmentation du nombre de juvéniles de plus de 15 mm à partir du 53 ^{ème} jpc (6 juin 2012). A compter du 109 ^{ème} jpc (1 ^{er} août 2012), le nombre de nid observés diminue et il est nul dès le 125 ^{ème} jpc (17 août 2012).

TABLEAU 6.4 – Date des premières observations par suivi quantitatif réalisé par observations visuelles (en jour post contamination) en fonction des conditions d'exposition au BPA

Premiers...	**0 μg/L**			**1 μg/L**			**10 μg/L**			**100 μg/L**		
	2	**3**	**11**	**1**	**5**	**8**	**6**	**9**	**10**	**4**	**7**	**12**
Nids	-1	-1	-1	5	-1	-1	-9	5	-1	-1	-1	5
< 10 mm	20	20	12	12	12	5	5	12	12	20	12	12
10 - 15 mm	26	26	20	20	20	20	26	20	20	32	20	20
15 - 20 mm	38	38	32	32	32	32	32	38	38	46	32	38
> 20 mm	46	46	46	38	38	38	38	38	46	46	46	46

6.3.4.2 Suivi de la dérive des juvéniles

Les observations qualitatives du suivi visuel (tableau 6.4) sont en accord avec les observations quantitative du suivi de la dérive des juvéniles (Fig. 6.7). Les premiers alevins

ont été récupérés le 2 ^{ème} jpc dans les populations 2 (Témoin), 8 (1 μg/L de BPA), 9 et 10 (10 μg/L de BPA). Dès le 14 ^{ème} jpc, des alevins ont été relevés dans tous les canaux. Les fréquences cumulées (Fig. 6.7) montrent que dans toutes les conditions, 90 % des alevins sont observés avant le 50 ^{ème} jpc, indépendamment des conditions. Les profils d'évolution des fréquences cumulées sont similaires, ce qui indique une synchronisation de la reproduction dans les canaux d'une même concentration. Cependant, il apparaît sur la figure 6.7 un décalage d'une dizaine de jours concernant les populations exposées à 10 μg/L de BPA par rapport aux autres conditions. Les alevins y sont relevés de façon plus précoce dans le temps.

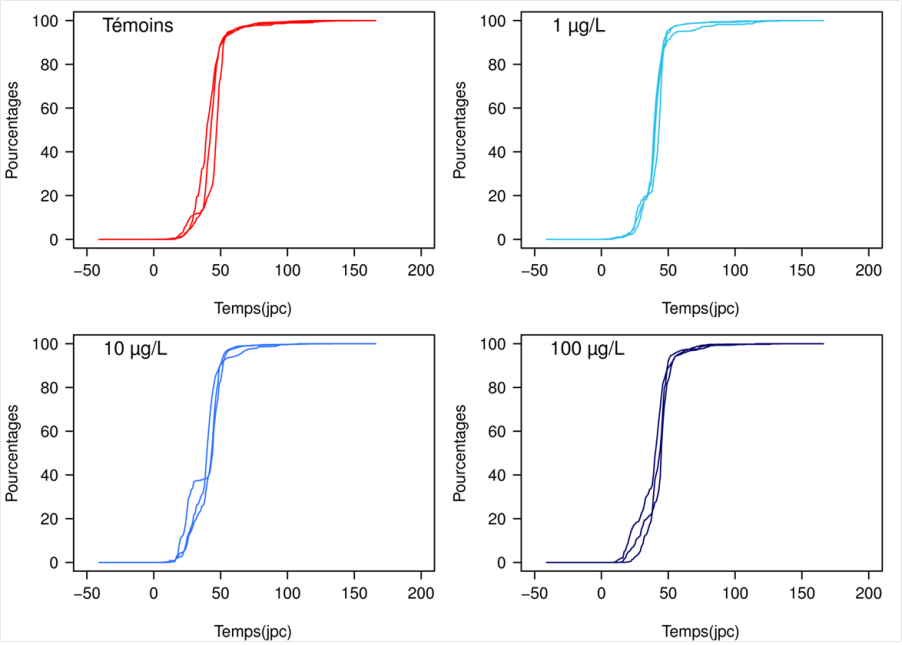

FIGURE 6.7 – Suivi de la dérive au cours du temps des juvéniles pendant l'exposition pour les populations témoins (—) et exposées à 1 μg/L de BPA (—), à 10 μg/L de BPA (—) et à 100 μg/L de BPA (—).

En termes de quantité, des différences sont à noter entre les conditions (Fig. 6.8). Tout d'abord, les populations exposées à 1 μg/L de BPA (— Fig. 6.8) présentent des dérives moyennes moins importantes que les populations témoins jusqu'au 37 ^{ème} jpc. Ensuite, les dérives moyennes deviennent supérieures aux populations témoins jusqu'au 43 ^{ème} jpc avant de redevenir moins importantes ou équivalentes jusqu'à la fin de la contamination.

Les populations exposées à 10 μg/L de BPA (— Fig. 6.8), quant à elles, présentent des

dérives moyennes équivalentes ou légèrement inférieures (moyenne de 4 individus de différences au maximum) jusqu'au 16 ^{ème} jpc. Ensuite, les dérives moyennes deviennent plus importantes que dans les populations témoins (5 à 70 individus en moyenne quotidiennement) jusqu'au 28 ^{ème} jpc, date à partir de laquelle les dérives moyennes deviennent très inférieures aux populations témoins (jusqu'à 317 individus de différence en moyenne le 41 ^{ème} jpc). Cette période dure jusqu'au 52 ^{ème} jpc, puis les dérives moyennes oscillent entre plus fortes et moins fortes que celles observées dans les populations témoins.
Enfin, les populations exposées à 100 μg/L de BPA (— Fig. 6.8) présentent des dérives moyennes très inférieures aux populations témoins jusqu'au 46 ^{ème} jpc (écart de plus de 100 individus). Puis, pendant deux jours consécutifs, les 47 et 48 ^{ème} jpc, respectivement 127 et 167 individus en moyennes sont observés en plus dans les populations exposées. Après ces deux jours, les dérives moyennes ont tendance à être moins importante que les populations témoins, malgré quelques jours ou elles sont plus importantes.

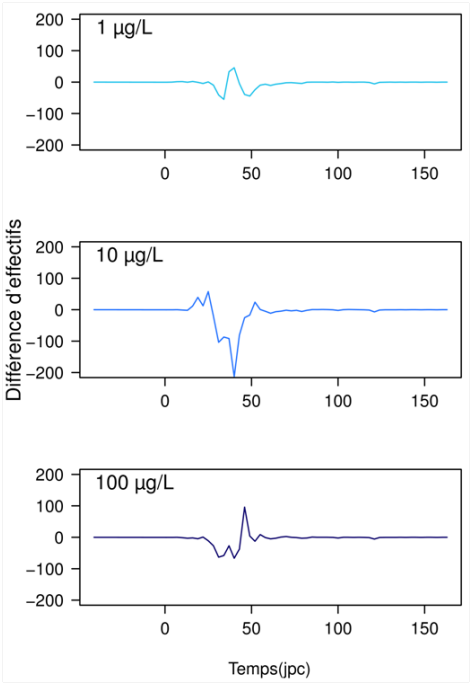

FIGURE 6.8 – Différences moyenne (3 canaux par contamination sur trois jour) entre les dérives des juvéniles par rapport aux populations contrôles (Contrôles - exposées) en fonction des concentrations en BPA : 1 μg/L de BPA (—), 10 μg/L de BPA (—) et 100 μg/L de BPA (—).

6.3.4.3 Suivi des effectifs par CMR

La première CMR montre une forte incertitude, quel que soit le traitement (Fig. 6.9). A partir de la seconde CMR, les incertitudes sont plus faibles. De manière générale, le suivi de la CMR montre une importante augmentation des effectifs jusqu'à la première CMR, puis une diminution entre le 40 ^{ème} jpc et le 50 ^{ème} jpc, après quoi, les effectifs des populations se stabilisent.

Plus précisément, dans les populations témoins (— Fig. 6.9), les effectifs se stabilisent à environ 500 individus dans la population.

Dans les populations exposées à 1 μg/L de BPA (— Fig. 6.9), la stabilisation est plus longue à se mettre en place. Il y a une tendance à la diminution des effectifs au cours du temps, mais d'une date à l'autre, de fortes oscillations dans les estimations sont observées.

Dans les populations exposées à 10 μg/L de BPA (— Fig. 6.9), la stabilisation se fait en deux temps. Tout d'abord, un plateau jusqu'au 72 ^{ème} jpc est observé. Lors de ce plateau, les effectifs estimés sont proches de 900 individus. Il y a ensuite une seconde diminution jusqu'à environ 450 individus estimés. Cette estimation est la même jusqu'à la fin de l'expérience.

Enfin, dans les populations exposées à 100 μg/L de BPA (— Fig. 6.9), il y a une décroissance linéaire de l'estimation des effectifs entre le 41 ^{ème} jpc (1864 [1365 - 2573] individus estimés) et le 83 ^{ème} jpc (479 [369 - 639] individus estimés). Puis, jusqu'à la fin de l'expérience, les estimations fluctuent entre 370 et 900 individus.

La comparaison par rapport aux populations témoins montre que du début de l'expérience jusqu'au 40 ^{ème} jpc, il y a un effectif estimé plus important dans les populations témoins que dans les populations exposées (Fig. 6.10). Cet écart atteint 1700 individus le 39 ^{ème} jpc (écart trop important en raison d'un nombre nul d'individu marqué lors de la recapture). Puis, jusqu'au 81 ^{ème} jpc, les effectifs sont plus importants dans les populations exposées au BPA. Le 81 ^{ème} jpc, les effectifs des populations témoins rejoignent ceux des populations exposées à 1 et 10 μg/L de BPA (respectivement — et — Fig. 6.10). En revanche, les populations exposées à 100 μg/L de BPA (— Fig. 6.10) ont des effectifs estimés supérieurs à ceux des populations témoins.

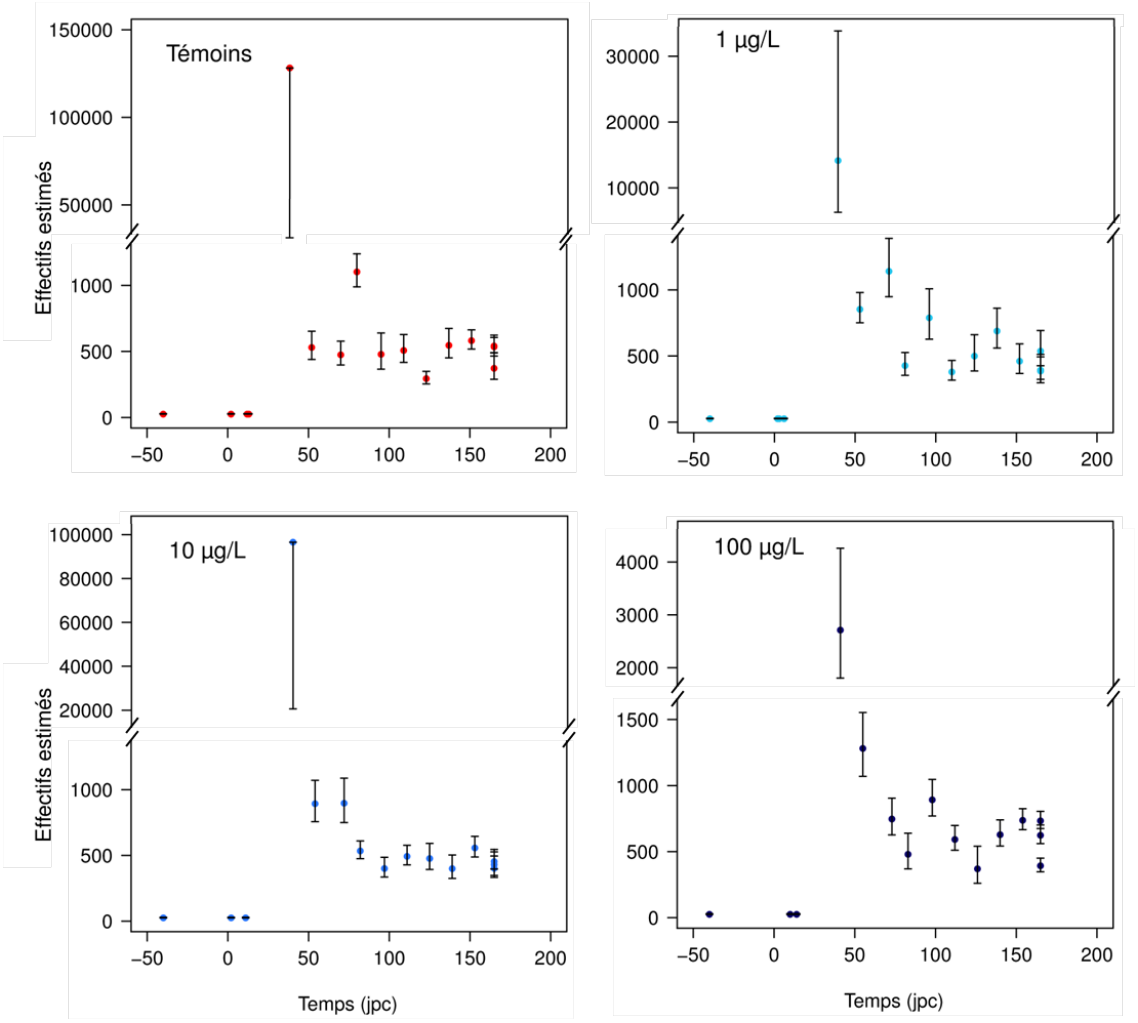

FIGURE 6.9 – Évolution de l'estimation du nombre d'individus dans les populations en fonction de la concentration en BPA au cours du temps. Présentation des moyennes ± IC des canaux échantillonnées selon les expositions au BPA : 0 μg/L de BPA (—), 1 μg/L de BPA (—), 10 μg/L de BPA (—) et 100 μg/L de BPA (—). Chaque date correspond à un canal échantillonné par concentration.

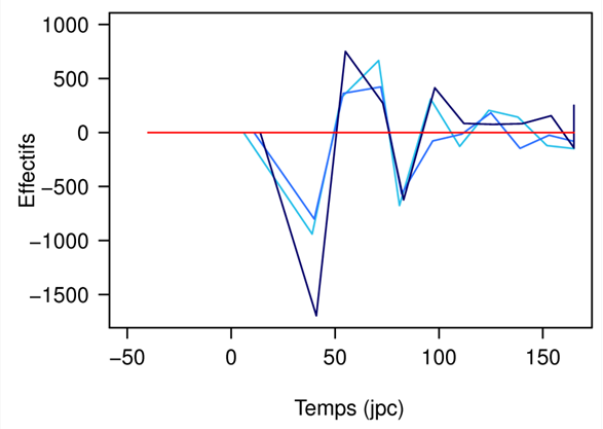

FIGURE 6.10 – Différence au cours du temps des estimations du nombre d'individus entre les populations témoins (références) et les populations exposées au BPA aux différentes concentrations :1 μg/L de BPA (—), 10 μg/L de BPA (—) et 100 μg/L de BPA (—).

6.3.4.4 Suivi de la distribution de taille

Le suivi de la taille au cours du temps (Fig. 6.11) montre que dans toutes les populations, l'évolution de l'intervalle des tailles présentes dans chaque canaux est la même : l'intervalle des tailles des épinoches présentes dans les mésocosmes augmente au cours de l'expérience. La taille médiane de la distribution augmente fortement entre le début de l'apparition des alevins (entre le 12 ^{ème} jpc et le 20 ^{ème} jpc selon les populations) puis la croissance médiane ralentit, mais la taille médiane continue d'augmenter. L'intervalle de confiance à 95 % s'élargit dans le même temps, ce qui est le résultat de l'éclosion de nouveaux individus, et de la croissance des individus nés pendant l'expérience.

6.3.5 Effets sur les variables au temps final

6.3.5.1 A l'échelle de l'individu

La morphologie des gonades des mâles et des femelles est affectée par le BPA (Fig. 6.12, tableau 6.5). Toutes les variables mesurées sur les gonades sont significativement affectées par le BPA, à l'exception du ratio de surface des femelles.

Plus particulièrement, la valeur du ratio $\frac{Longueur\ gonades}{Longueur\ standard}$ est significativement plus petit chez les mâles exposés à 10 et 100 μg/L de BPA (DUNNETT ; $p < 0{,}05$) et chez les femelles exposés à toutes les concentrations (DUNNETT ; $p < 0{,}05$).

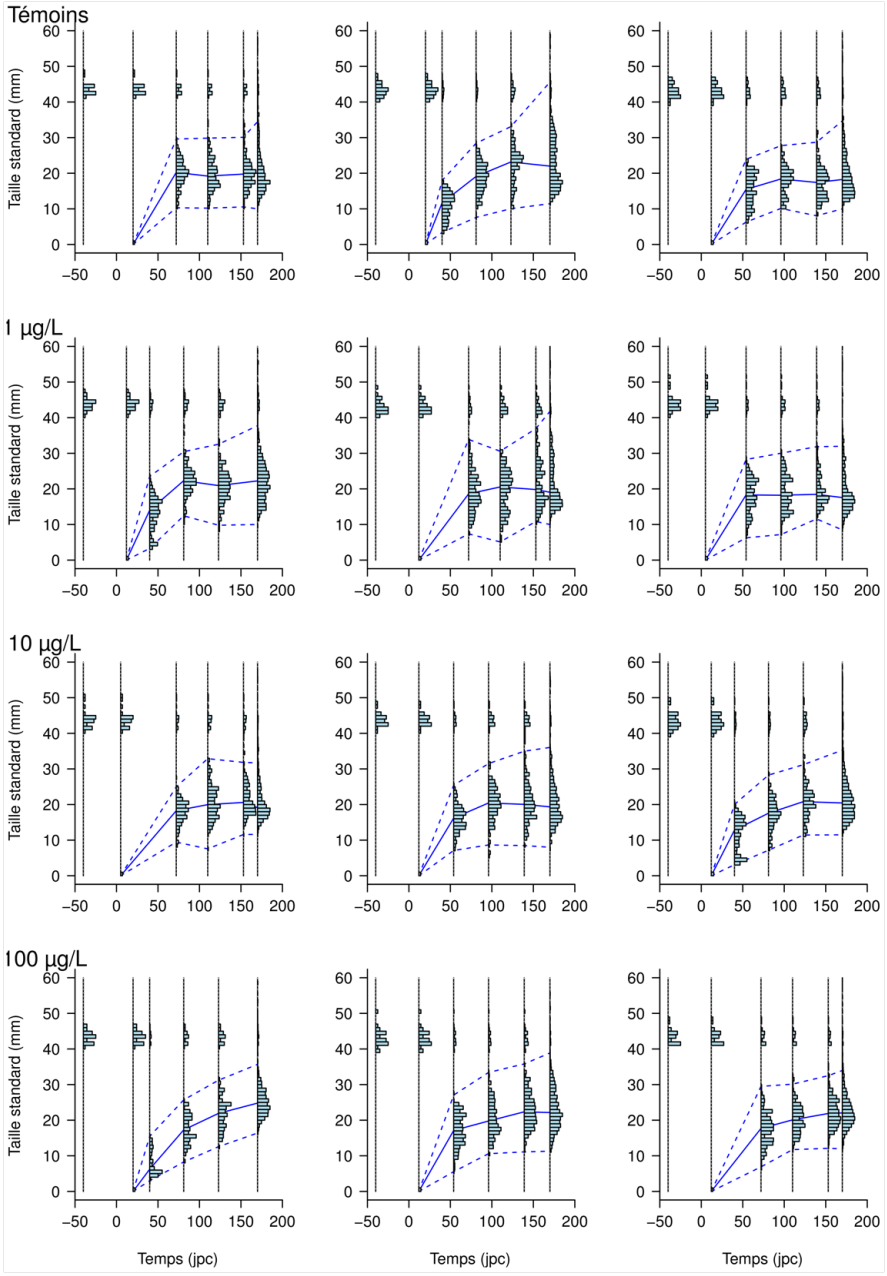

FIGURE 6.11 – Évolution de la distribution des tailles standard des épinoches pour chaque population.
Les barres représentent les proportions d'effectifs par classe de taille (les classes de tailles font 1 mm). La ligne continue montre la médiane de la distribution et les lignes discontinues représentent les percentiles 2,5 et 97,5 de la distribution.
Pour un même canal, la distribution de la taille des fondateurs est reproduite au cours du temps pour rappeler qu'ils sont toujours présents. En revanche, la sous-population de fondateurs n'étant pas échantillonnée, la distribution est la même pour toute les dates, à l'exception de la dernière.

TABLEAU 6.5 – Comparaison statistique (ANOVA) de la morphologie des gonades d'épinoches exposées au BPA.

	degrés de liberté résiduels	**Sommes des carrés**	**F**	**p**	
Femelles					
Lon gonades / Ls individu	95	$1{,}014 \times 10^{-2}$	6,056	$8{,}103 \times 10^{-4}$	***
lar gonades / Ls individu	95	$9{,}348 \times 10^{-4}$	5,759	$1{,}158 \times 10^{-4}$	***
Mâles					
Lon gonades / Ls individu	151	$8{,}001 \times 10^{-3}$	7,019	$1{,}888 \times 10^{-4}$	***
lar gonades / Ls individu	151	$5{,}367 \times 10^{-3}$	12,51	$2{,}378 \times 10^{-7}$	***

*** : $p < 0{,}005$; *Lon* : Longueur ; *lar* : largeur

Les valeurs des ratios $\frac{Largeur\ gonades}{Longueur\ standard}$ et $\frac{Longueur\ gonades}{Longueur\ standard}$ sont significativement plus petits chez les mâles et chez les femelles exposés à 100 μg/L de BPA (DUNNETT ; $p < 0{,}05$).

6.3.5.2 A l'échelle de la population

Les variables biologiques de la population sont présentées Fig. 6.13.

a- Structure de la population

A l'échelle de la population, le BPA n'a pas d'effet sur le nombre total d'individu à la fin de l'expérience (ANOVA ; ddl résiduels = 8 ; $p = 0{,}846$). Chaque canal est peuplé en moyenne (± S.D.) de 978,25 ± 197,44 individus (Estimé sur l'ensemble des populations, Fig. 6.13 A).

Le pourcentage de mâles dans les populations n'est pas significativement différents selon les expositions au BPA (ANOVA ; données transformées *arcsin* ; ddl résiduels = 8 ; $p = 0{,}26$). Il varie entre 9,46% et 24,86%. Il en est de même pour le nombre de mâles nés

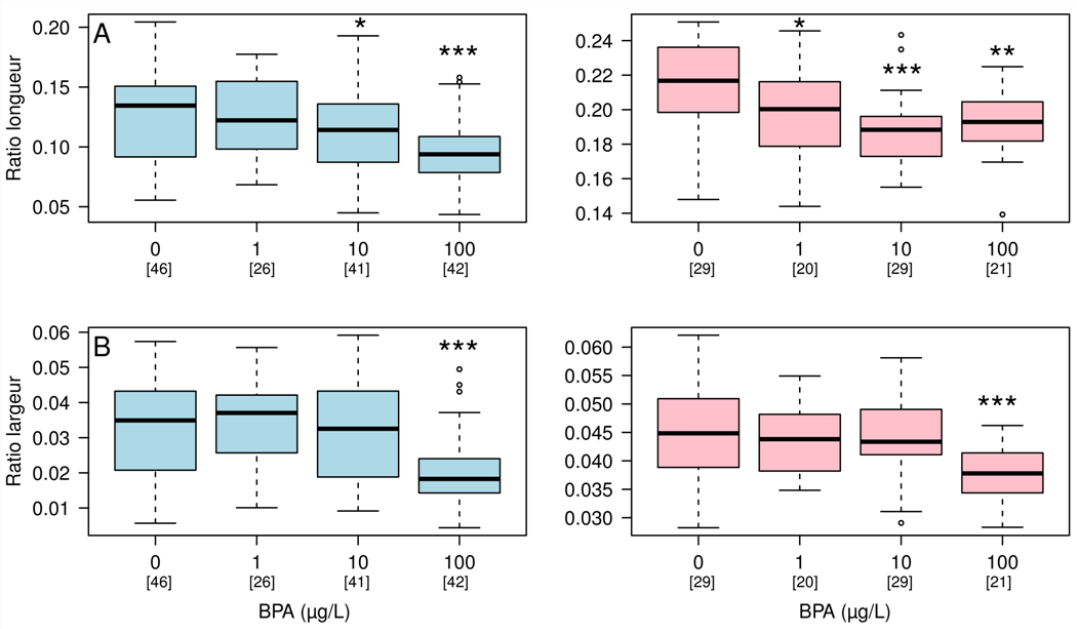

FIGURE 6.12 – Analyse de la morphologie des gonades à la fin de l'expérience en fonction de la concentration de BPA.
● : Mâles ; ● : Femelles
A : Ratio : $\frac{Longueur\ gonades}{Longueur\ standard}$; B : Ratio : $\frac{Largeur\ gonades}{Longueur\ standard}$; .
Les nombres entre crochet indiquent le nombre de d'individus.
Les étoiles correspondent aux différences par rapport au témoin (Test post Hoc de DUNNETT).

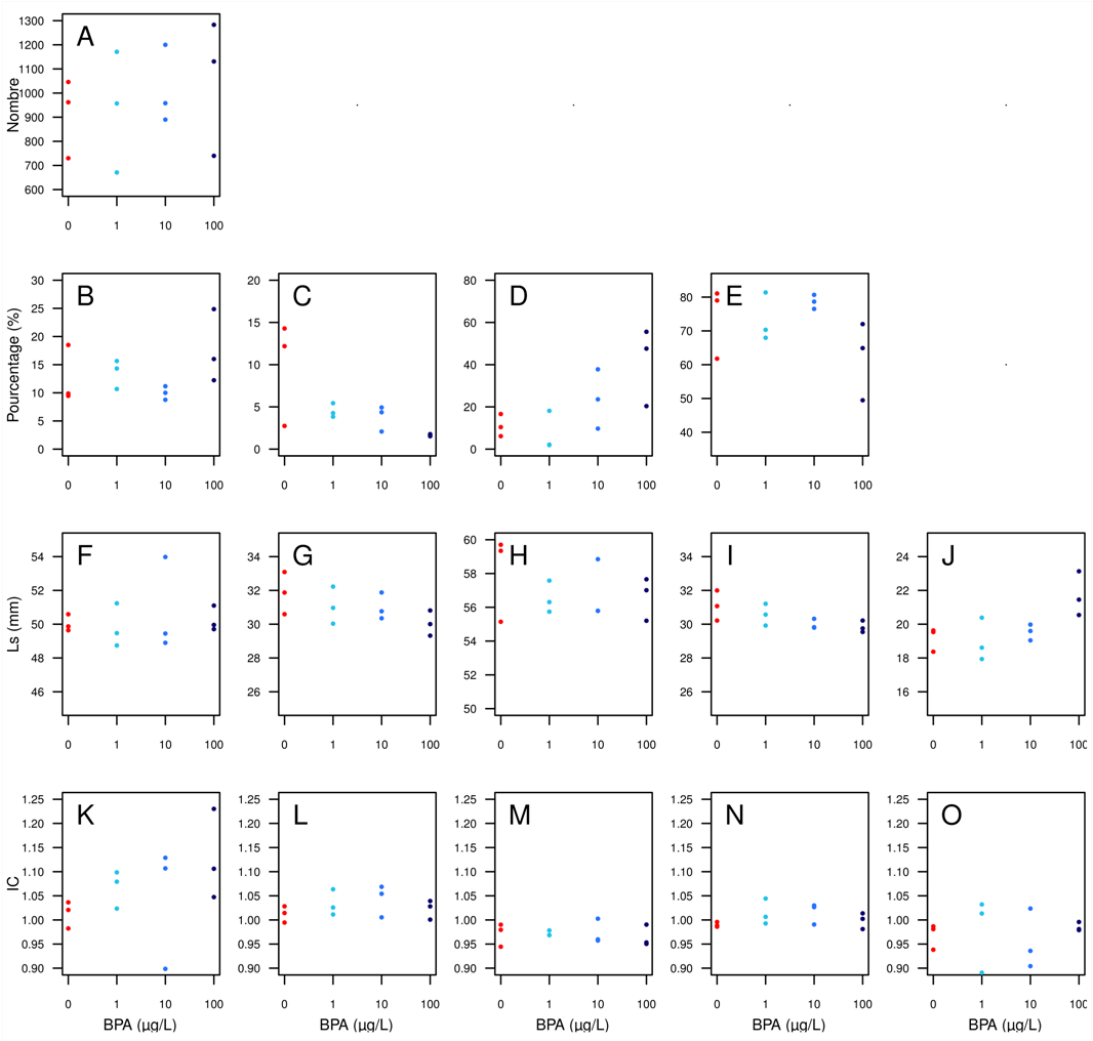

FIGURE 6.13 – Variables biologiques à la fin de l'exposition au BPA aux différentes concentrations : témoins (—), 1 μg/L de BPA (—), 10 μg/L de BPA (—) et 100 μg/L de BPA (—).
- Nombre total d'individus dans la population (A),
- Pourcentages de mâles (B) parmi la population, de mâles matures parmi les mâles (C), de mâles immatures parmi les mâles (D) et de juvéniles (E),
- Moyenne des tailles standard des mâles fondateurs (F) et non-fondateurs (G), des femelles fondatrices (H) et non fondatrices (I) ainsi que des juvéniles (J),
- Indices de condition moyen des mâles fondateurs (K) et non-fondateurs (L), des femelles fondatrices (M) et non fondatrices (N) ainsi que des juvéniles (O).

pendant l'exposition (ANOVA ; ddl résiduels = 8 ; $p = 0{,}26$).
Les observations et les résultats sont identiques pour les femelles. Le pourcentage de femelle dans les populations n'est pas significativement différent selon les conditions (ANOVA ; données transformées *arcsin* ; ddl résiduels = 8 ; $p = 0{,}164$). Il varie entre 9,33 et 25,68 %. Le nombre de femelles nées pendant l'exposition est significativement affecté par la concentration en BPA (ANOVA ; données transformées *arcsin* ; ddl résiduels = 8 ; $p < 0{,}01$).
A la fin de l'expérience, 9,25 ± 2,49 femelles ont survécu sur les 15 introduites et 5,17 ± 2,17 mâles ont survécu sur les 10 introduits. La survie des fondateurs ne dépend pas de la concentration en BPA (ANOVA femelles ; données transformées *arcsin* ; ddl résiduels = 8 ; $p = 0{,}165$; ANOVA mâles ; données transformées *arcsin* ; ddl résiduels = 8 ; $p = 0{,}685$).

Le pourcentage de juvéniles n'est pas affecté par la concentration en BPA (ANOVA ; données transformées *arcsin* ; ddl résiduels = 8 ; $p = 0{,}199$). Il varie entre 49,46 et 81,38%. Le nombre de juvéniles dans les populations n'est pas influencé par la concentration en BPA (ANOVA ; données transformées *arcsin* ; ddl résiduels = 8 ; $p = 0{,}896$). Il varie entre 366 et 968. Chaque population est constituée de 713,83 ± 201,20 juvéniles.

Les stades de maturité des mâles non-fondateurs sont impactés par le BPA (ANOVA mâles immatures parmi les mâles ; données transformées *arcsin* ; ddl résiduels = 8 ; $p < 0{,}01$). A la concentration de 100 μg/L de BPA, un pourcentage significativement supérieur de mâles sont immatures par rapport aux autres conditions (DUNNETT ; $p < 0{,}05$). Le pourcentage de mâles matures est supérieur dans les populations témoins (2 populations ont plus de 10 % de mâles matures et 1 population a moins de 5 % de mâles matures) par rapport aux populations exposées au BPA (5 à 6 % de mâles matures au maximum), mais ces observations ne sont pas significatives au seuil de 5% (ANOVA ; données transformées *arcsin* ; ddl résiduels = 8 ; $p = 0{,}057$).

b- Tailles finales des individus

La taille moyenne des juvéniles est significativement affectée par le BPA (ANOVA ; ddl résiduels = 8 ; $p = 0{,}0351$). Plus précisément, elle est plus grande dans les populations exposées à 100 μg/L (DUNNETT ; $p < 0{,}05$). Ils mesurent en moyenne 19,18, 18,98, 19,54 et 21,71 mm dans les populations exposées respectivement à 0, 1, 10 et 100 μg/L de BPA. Pour autant, il n'est pas possible de tester des effets sur la croissance car il s'agit d'une taille moyenne sur la population et pas la taille de chaque individu.

Les adultes ne présentent pas de taille moyenne significativement différentes selon les traitements tant pour les fondateurs (ANOVA femelles ; ddl résiduels = 8 ; $p = 0{,}605$; ANOVA mâles ; ddl résiduels = 8 ; $p = 0{,}767$) que pour les adultes nés pendant l'exposition (ANOVA femelles ; ddl résiduels = 8 ; $p = 0{,}253$; ANOVA mâles ; ddl résiduels = 8 ; $p = 0{,}107$). Cependant, il faut noter que la taille moyenne des adultes non-fondateurs a tendance à diminuer avec la concentration en BPA.
Les femelles fondatrices mesurent 57,01 ± 1,61 mm. Les femelles nées pendant l'expérience mesurent 30,37 ± 0,73 mm. Les mâles fondateurs mesurent 50,22 ± 1,41 mm. Les mâles nés pendant l'expérience mesurent 30,99 ± 1,08 mm.

c- Indice de condition

Les indices de conditions ne diffèrent pas significativement entre les conditions pour tous les individus, qu'ils soient fondateurs (ANOVA femelles ; données transformées *arcsin* ; ddl résiduels = 8 ; $p = 0{,}206$; ANOVA mâles ; données transformées *arcsin* ; ddl résiduels = 8 ; $p = 0{,}0928$) ou nés pendant l'expérience (ANOVA femelles ; données transformées *arcsin* ; ddl résiduels = 8 ; $p = 0{,}0706$; ANOVA mâles ; données transformées *arcsin* ; ddl résiduels = 8 ; $p = 0{,}739$; ANOVA juvéniles ; données transformées *arcsin* ; ddl résiduels = 8 ; $p = 0{,}116$).

d- Variabilité

Les valeurs des coefficients de variation (CV) pour chacune des variables suivies sont présentées figure 6.14. Les CV rendent compte de l'étalement des distributions.

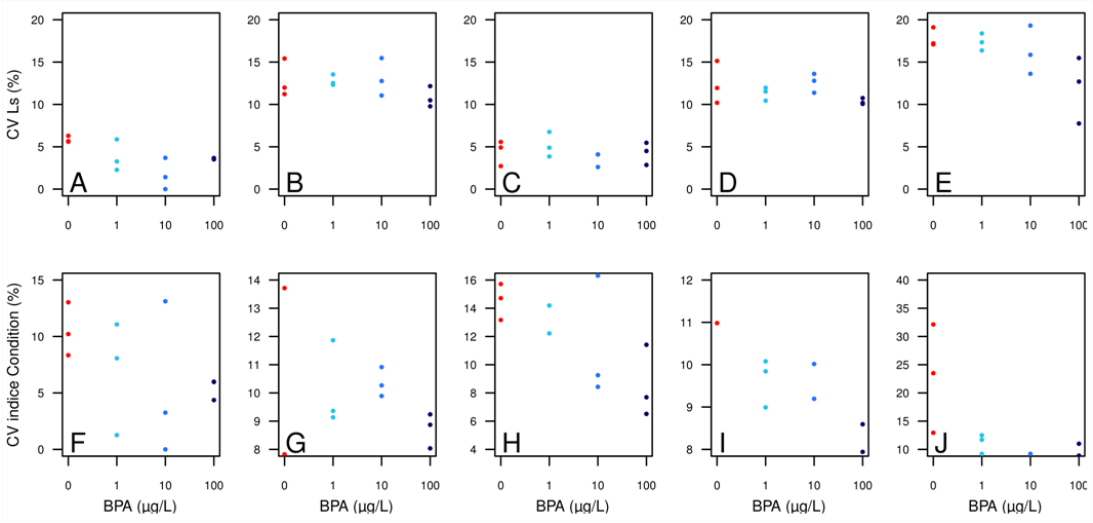

FIGURE 6.14 – Coefficients de variation par populations des variables biologiques (taille standard et indice de condition) à la fin de l'exposition au BPA aux différentes concentrations : témoins (—), 1 μg/L de BPA (—), 10 μg/L de BPA (—) et 100 μg/L de BPA (—).
- Tailles standard des mâles fondateurs (A) et non-fondateurs (B), des femelles fondatrices (C) et non fondatrices (D) ainsi que des juvéniles (E),
- Indices de condition des mâles fondateurs (F) et non-fondateurs (G), des femelles fondatrices (H) et non fondatrices (I) ainsi que des juvéniles (J). Certaines valeurs sont identiques entre les réplicats d'une même condition. Par conséquent, il peut y avoir des points qui se confondent.

La moyenne des CV des tailles standard des fondateurs est de 4,36 ± 1,26 et 4,07 ± 1,58 mm, respectivement pour les femelles et pour les mâles. Ils ne sont pas impactés par le BPA (ANOVA femelles ; données transformées *arcsin* ; ddl résiduels = 8 ; p = 0,653 ; ANOVA mâles ; données transformées *arcsin* ; ddl résiduels = 8 ; p = 0,224). La moyenne des CV des tailles standard des individus nés pendant l'expérience est de 11,67 ± 1,55, 12,39 ± 1,76 et 15.85 ± 3.24 mm, respectivement pour les femelles, les mâles et les juvéniles. Les CV des tailles standard des adultes et des juvéniles nés pendant l'expérience ne sont pas impactés par le BPA (ANOVA femelles ; données transformées *arcsin* ; ddl résiduels = 8 ;

$p = 0{,}262$; ANOVA mâles ; données transformées *arcsin* ; ddl résiduels = 8 ; $p = 0{,}373$; ANOVA juvéniles ; données transformées *arcsin* ; ddl résiduels = 8 ; $p = 0{,}0772$).

La moyenne des CV des indices de conditions des fondateurs est de 12,29 ± 3,68 et 7,69 ± 3,92 %, respectivement pour les femelles et pour les mâles. Ils ne sont pas impactés par le BPA (ANOVA femelles ; données transformées *arcsin* ; ddl résiduels = 8 ; $p = 0{,}114$; ANOVA mâles ; données transformées *arcsin* ; ddl résiduels = 8 ; $p = 0{,}576$). La moyenne des CV des indices de conditions des individus nés pendant l'expérience est de 8,76 ± 1,30, 9,74 ± 1,76 et 12,98 ± 7,36 mm, respectivement pour les femelles, les mâles et les juvéniles. Les CV des tailles standard des adultes nés pendant l'expérience ne sont pas impactés par le BPA (ANOVA femelles ; données transformées *arcsin* ; ddl résiduels = 8 ; $p = 0{,}180$; ANOVA mâles ; données transformées *arcsin* ; ddl résiduels = 8 ; $p = 0{,}237$; ANOVA juvéniles ; données transformées *arcsin* ; ddl résiduels = 8 ; $p = 0{,}280$).

e- Classification ascendante hiérarchique

Les variables biologiques sont comparées entre elles pour classer les populations les unes par rapport aux autres par une classification ascendante hiérarchique (Fig. 6.15).

La classification fait ressortir deux groupes : le premier regroupe les populations 2, 11, 6, 8, 5, 10, 3, 1 et 9. Le deuxième regroupe les populations 12, 4 et 7, soit les populations exposées à 100 μg/L de BPA. Parmi le premier groupe, il est possible de distinguer trois sous-groupes qui ne correspondent pas aux concentrations en BPA.

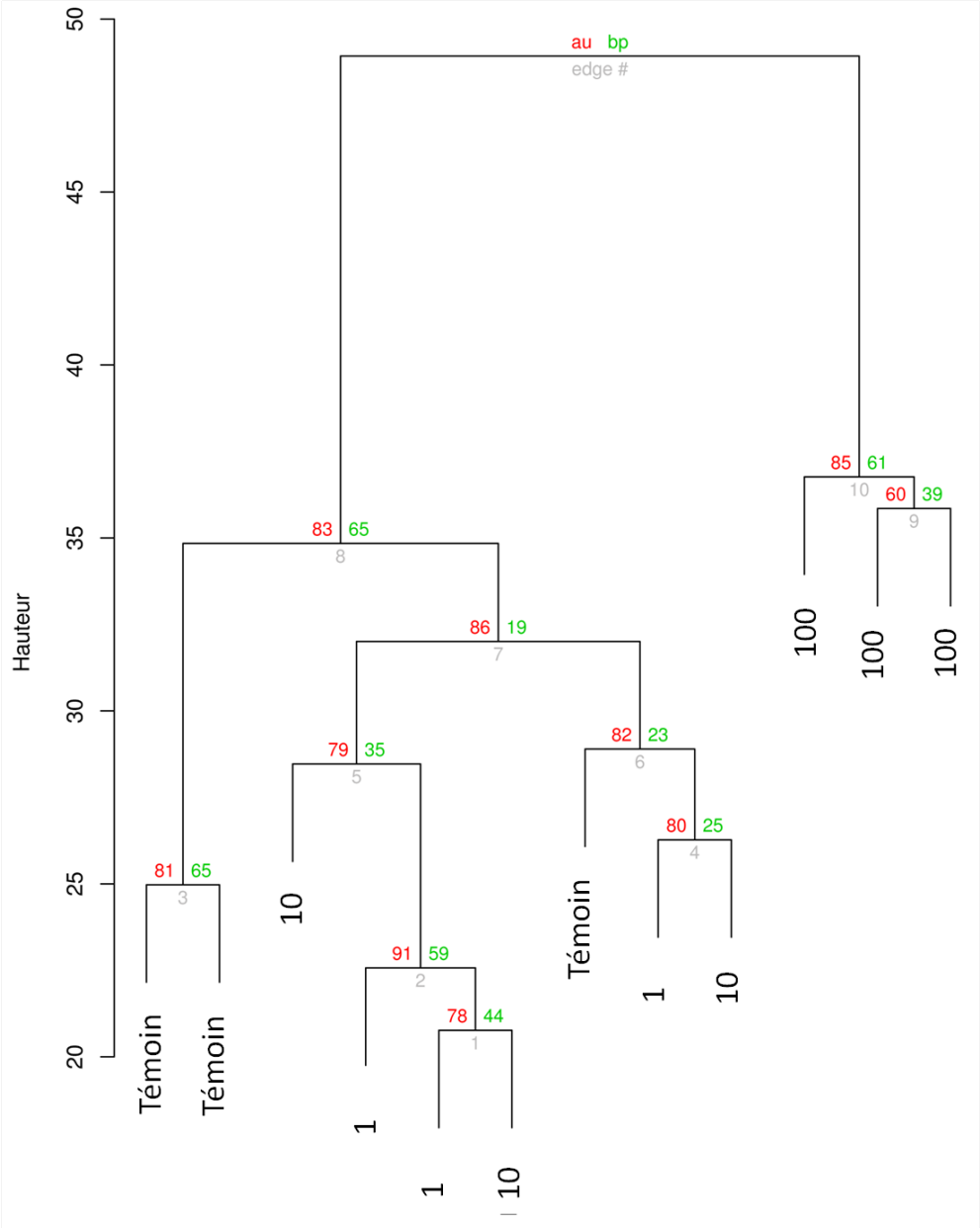

FIGURE 6.15 – Classification ascendante hiérarchiques des variables biologiques à la fin de l'expérience (Distance de Manhattan, fusion basée sur les moyennes, 1000 bootstrap). Les nombre en rouge correspondent à la probabilité d'existence du nœud en réalisant des bootstraps multi-échelles (canaux et variables). Les nombres vert correspondent à la probabilité d'existence du nœud en réalisant des bootstraps normaux (canaux). Le chiffre gris correspond au numéro du nœud, classé par distance ascendante

.

6.4 Discussion

6.4.1 La contamination

Le suivi de la contamination montre une rapide diminution de la concentration en BPA dans l'eau entre 0 et 5 m (diminution de 59, 71 et 31 %, respectivement pour les canaux exposés à 1, 10 et 100 μg/L de BPA). Des expériences sur la cinétique de dégradation du BPA ont été effectuées par des chercheurs d'EDF (rapport H-P77-2011-01974-FR). Ces expériences ont été réalisées dans des béchers avec du sédiment provenant des canaux témoins. Les auteurs suggèrent que la diminution de la concentration observée dans la colonne d'eau est le résultat de la dégradation biologique. Cependant, le volume d'eau dans les cinq premiers mètres est renouvelé en moins de deux heures (1,5 m^3 d'eau et 800 L/h de débit). Or, il y a un temps de latence avant le début de la biodégradation naturelle qui est en moyenne de 3,4 $\pm$ 0,7 jours (Klecka *et al.*, 2001; West *et al.*, 2001). Ceci implique que la biodégradation naturelle n'explique pas toute la décroissance du BPA dans les canaux.

Nous proposons une hypothèse alternative qui repose sur l'accumulation du BPA dans le cresson qui se trouve de façon abondante dans les cinq premiers mètres. Cette hypothèse est appuyée par les connaissances générales du cresson et plus globalement des macrophytes. Le cresson est connu pour accumuler les métaux lourds tels que l'arsenic (Ozturk *et al.*, 2010), le nickel (Duman et Ozturk, 2010; Kara, 2005), le cuivre (Kara, 2005; Roussel *et al.*, 2007b) et le zinc (Kara, 2005). Un complément d'explication est donné dans l'annexe G (page 301). D'autres études ont démontré que les macrophytes ont une forte capacité de réduire les fortes concentrations de matières organiques telles que les nutriments (Nahlik et Mitsch, 2006; Sooknah et Wilkie, 2004), ou les pesticides (Beketov et Liess, 2008) et plus généralement pour augmenter la qualité de l'eau en diminuant la contamination des composés organiques. Afin de valider cette hypothèse, des analyses sont actuellement en cours pour doser le BPA dans les racines et les feuilles du cresson. Cependant, les résultats ne sont pas encore connus.

6.4.2 Les conditions physico-chimiques

Les canaux exposés à 100 μg/L de BPA présentent un pH moyen qui est inférieur au contrôle. Cette différence entre les conditions peut s'expliquer facilement par l'analyse des macrophytes présent dans les canaux. En effet, les macrophytes ont un effet important sur les paramètres physique de l'environnement (pénétration de la lumière, température, hydrodynamique, substrats...), sur le biotope (poissons, détritivores, herbivores...) ou encore sur les paramètres environnementaux tels que l'oxygène dissous, le carbone organique et inorganique et les nutriments (Carpenter et Lodge, 1986). Le fait d'avoir moins de macrophytes implique une diminution de l'activité photosynthétique (donc moins d'oxygène) et ainsi, la consommation de dioxyde de carbone et de nutriment diminue. C'est pourquoi, le déclin du volume de macrophytes dans les mésocosmes exposés au BPA peut induire un déclin du pH (moins de consommation de dioxyde de carbone), un déclin de l'oxygène dissous (moins d'oxygène produit par les végétaux) et une augmentation de la conductivité (moins de consommation de nutriments).
La température de l'eau varie entre 2,48 et 21,37 ˚C. Ces températures sont comprises dans la gamme de tolérance de l'épinoche. En effet, dans la littérature, les températures minimales létales sont proches de 1 ˚C (Barrett *et al.*, 2011) et les températures maximales létales pour l'épinoche varient entre 28 à 29 ˚C (Barrett *et al.*, 2011; Bell et Foster, 1994; Jobling, 1981) et 32 à 35 ˚C (Barrett *et al.*, 2011; Bell et Foster, 1994; Walton *et al.*, 2007).

6.4.3 La dynamique de population

La première CMR montre une incertitude très forte qui est liée au faible nombre d'individu marqués retrouvés lors de la phase de recapture. En particulier, dans la population témoin ainsi que dans la population exposée à 10μg/L de BPA. Dans ces deux populations, aucune épinoche remarquée n'a été observée. Cependant, nous pouvons supposer qu'une partie des individus devaient être marqués et qu'il y a eu un problème au moment de leur comptage. L'autre raison pourrait être un mauvais marquage (temps de balnéation, concentration en Brun de Bismark...).
Malgré la forte incertitude de l'estimation, l'information principale de cette première CMR

est l'augmentation de la population de façon importante, avant une diminution et une régulation de la population.

Les cohortes qui naissent dans les mésocosmes ne sont pas entièrement consommées car l'augmentation de la taille médiane (Fig. 6.11, page 227) est liée à ces individus qui y ont survécu.

Lors de cette expérience, les nids ont été particulièrement suivis. Lors des suivis visuels, les derniers nids furent observés le 125ème jpc (soit le 17 août 2012). Cette observation est surprenante à deux titres : (i) la date est plus d'un mois avant la date limite de reproduction de l'épinoche estimée par Georges (2010), (ii) les conditions environnementales sont bonnes : température moyenne journalière supérieure à 15 ˚C, nourriture abondante. Malheureusement, nous ne pouvons pas comparer cette date avec les années témoins, car l'information n'était pas recueillie. Cependant, par l'analyse concernant la taille des plus petits juvéniles récupérés dans les conditions témoins en 2010 et 2011, nous avons estimés que l'arrêt de la reproduction intervenait entre le 25 et le 28 septembre. En 2012, 36 juvéniles ayant une taille comprise entre 8,5 et 10,5 mm ont été récupérés et mesurés. Par conséquent, même si les nids n'ont plus été observés après le 125ème jpc, la reproduction a continuée. Cependant, le nombre de nids construits a certainement diminué. Les mâles ayant tous effectué plusieurs cycles, étaient fatigués car lors des cycles de reproduction, le mâle se nourrit moins (Bell et Foster, 1994; Wootton, 1984) et n'a comme activité principale que la défense du nid (Östlund Nilsson *et al.*, 2007). Sur le terrain, la plupart des mâle ne font qu'un cycle complet, voir deux (Kynard, 1978; Mori, 1993) sachant qu'au maximum, un mâle peut construire 5 nids pendant la période de reproduction (Wootton, 1976).

6.4.4 Effets sur les variables au temps final

La longueur des gonades a été impactée après 168 jours d'exposition au BPA. Les individus exposés au BPA ont des gonades significativement plus petites que les individus des populations contrôles, tant pour les mâles (dès 10 μg/L) que pour les femelles (dès 1 μg/L). Ces résultats sont en accord avec d'autres études (Flint *et al.*, 2012). A titre d'illustration, la structure des gonades de *C. carpio* est modifiée (perte de structure

typique) lorsque les mâles sont exposés à 1 μg/L (Flint *et al.*, 2012). Des analyses d'histologie sont en cours pour aller plus loin dans l'analyse des échantillons.

A l'échelle de la population, la distribution des fréquences des tailles standards présente un décalage de l'évolution de la classe de taille (Fig. 6.11 page 227). En effet, dans toutes les conditions, sauf à 100 μg/L, la médiane de la distribution de la classe de taille se stabilise après jours de contamination, alors que dans le cas des populations exposées à 100 μg/L, la médiane continue d'augmenter. Ce décalage implique un nombre d'adultes plus important et une moyenne de la taille standard des juvéniles qui augmente. Des hypothèses d'effets directs et indirects peuvent expliquer ces observations.
(i) La nourriture disponible pour les épinoches est supérieure dans les canaux exposés à 100 μg/L. Par conséquent, pendant la phase des eaux claires (consommation de toute la nourriture disponible en réponse à une augmentation très importante des effectifs de la population), la régulation de la nourriture et les phénomènes de densité dépendance furent moindre que dans les autres conditions. Les épinoches sont connues pour être des prédateurs de *R. peregra* (Gaten, 1986). Une relation négative existe entre le cannibalisme et le niveau de nourriture chez les poissons (Smith et Reay, 1991). En conséquence de quoi, plus de juvéniles issus de la première reproduction survivent et croissent dans les populations exposées à 100 μg/L de BPA. A l'inverse, dans les autres populations, les juvéniles sont probablement mangés ou meurent de faim en raison de la rareté de la nourriture.
(ii) Les résultats de cette étude montrent que les gonades sont atrophiées et que la croissance a été plus importante dans les populations exposées au BPA. Cette observation peut être éventuellement mise en lien avec un changement dans la balance énergétique entre l'investissement dans le soma (pour la croissance) et la reproduction.
Comme la croissance a été plus importante dans les populations exposées à 100 μg/L de BPA, à la fin de l'expérience, plus de mâles ont une longueur supérieure à 25 mm (seuil de taille pour pouvoir définir le sexe d'un poisson par observation des gonades) comparé aux autres conditions. Ceci explique également le fait qu'il y ait plus de mâles immatures observés.

La distribution de la fréquence de taille montre une autre différence entre les concentrations. Dans toutes les conditions, exceptée pour 100 μg/L de BPA, la population était composée de juvéniles mesurant entre 10 et 15 mm. Ces juvéniles sont nés pendant la dernière phase de reproduction.

(i) La première explication du manque de cette classe de taille dans les populations exposées à la plus forte concentration de BPA est basée sur un effet indirect. A la fin de l'expérience, la nourriture manquait dans tous les traitements, sauf pour les individus les plus gros qui pouvaient consommer *R. peregra*. De plus, les populations exposées à 100 μg/L de BPA ont des poissons représentant une biomasse totale plus importante que dans les autres concentrations et par conséquent, les populations exposées à 100 μg/L de BPA ont besoin de plus de nourriture que les autres populations pour que toutes les épinoches mangent *ad-libitum*. Les juvéniles et en particulier les plus petits (Nettleship, 2011), peuvent alors être la cible des épinoches adultes ;

(ii) La seconde explication est un effet direct du BPA sur la reproduction. Les individus issus de la première reproduction ne sont pas impactés par le BPA. En revanche, comme les effets directs prennent place et sont visibles après une long phase de latence, il est possible que les reproductions suivantes aient été impactées. Les observations d'atrophie des gonades viennent renforcer cette hypothèse (impact du BPA sur la reproduction). Cependant, aucune différence visuelle n'a été observée par les suivis de la population (visuel ou par échantillonnage) concernant la reproduction.

Lors de la classification, l'information principale est que les populations d'épinoches exposées à 100 μg/L de BPA sont dans un groupe différent des autres populations. Cette observation vient corroborer les conclusions précédentes, et en particulier que les populations d'épinoches exposées à la plus forte concentration en BPA sont impactées et pas les autres populations. Enfin, l'arbre montre une stabilité car les pourcentages issus du bootstrap complet sont supérieurs à 80, signifiant que dans plus de 80% des cas, le nœud est observé.

6.4.5 Comparaison avec les témoins des expériences précédentes

Cette étude comporte trois populations témoins (sans exposition au BPA). Ces trois populations peuvent être comparées aux 22 populations témoins présentées dans le chapitre 5 (page 168).

La première notion à redéfinir pour la comparaison est la notion de jour pour les expériences. il y a un décalage de 36 jours entre les *jours post contamination* de l'exposition des épinoches au BPA et les *jours références par rapport au 10 mars* des expériences en conditions témoins (1er jref = -36 jpc).

Le suivi visuel montre des valeurs de premières observations identique (à 7 jours près, correspondant au pas de temps entre les suivis). De même, dans les deux chapitres, la dévalaison est majoritaire les 100er jref (plus de 90% des juvéniles qui dévalent pendant l'expérience sont observés avant cette date). Enfin, les allures de la CMR sont identiques et les quatre phases de la dynamique de la population sont retrouvées.

Une différence apparaît et concerne les adultes non fondateurs. En 2012 (exposition au BPA), les adultes non fondateurs ont une taille moyenne inférieure aux valeurs moyennes des populations témoins des années précédentes (Chapitre 5). En revanche, la variabilité des mesures est plus importante. La période de reproduction étant identique, la différence de taille moyenne est imputable à la croissance des individus. Comme celle-ci est principalement régie par la température et la nourriture, ces deux facteurs viennent expliquer les différences évoquées précédemment.

6.5 Conclusions

Notre étude présente des populations témoins qui sont comparables avec les populations témoins attendues et déjà observées. En outre, elle montre un impact du BPA dans les populations exposées à 100 μg/L de BPA. En-deçà de cette concentration, seul des impacts anatomiques (atrophies des gonades des épinoches, mâles et femelles) ont été observés, mais aucune conséquence sur les populations ou les communautés n'a pu être mise en évidence.

L'ensemble des résultats sur les différents compartiments sont présentés dans l'article publié dans le journal Aquatic toxicology (Annexe G, page 301).

CHAPITRE 7

DISCUSSION GÉNÉRALE

7.1 Introduction

Le travail de cette thèse s'inscrit dans un contexte général de l'évaluation du risque écotoxicologique, en condition écosystémique. Dans ce cadre, nos travaux visaient à caractériser la dynamique de population de *Gasterosteus aculeatus* en mésocosmes lotiques.

Le retour d'expérience sur les trois ans de thèse a permis d'identifier certaines voies d'amélioration qui seront discutées dans une première partie. Dans une seconde partie, l'analyse des résultats pourra être discutée afin de répondre à des questions qui demeurent non résolues. Ces nouvelles données et réflexions pourront permettre de faire le lien entre les individus et les populations.

7.2 Les voies d'amélioration du protocole

7.2.1 Impact de l'échantillonnage sur la dynamique de la population de l'épinoche

Chaque échantillonnage a un impact sur les conditions de l'expérimentation. Ces impacts extérieurs peuvent induire de la variabilité entre les populations. C'est pourquoi, il faut limiter l'effort d'échantillonnage aux besoins réels et préférer un échantillonnage plus précis (plus fin à une date donnée), mais moins fréquent.

A titre d'illustration, lors des échantillonnages des populations, les pêches à l'épuisette impliquaient une dégradation du couvert végétal dans les canaux, ainsi qu'un stress des poissons (pêches, colorations...). Pendant les campagnes réalisées durant la thèse (2010 à 2012), trois à quatre canaux étaient échantillonnés toutes les trois semaines. Pour les expériences futures, afin de limiter l'impact de l'échantillonnage, mais tout en étant plus fin, les échantillonnages pourront avoir lieu toutes les cinq semaines, mais avec un échantillonnage de toutes les populations.

Le choix de l'échantillonnage partiel des populations a été effectué pour estimer la dynamique de la population dans des conditions où toutes les populations étaient identiques (10 populations témoins en 2010 et 11 populations témoins en 2011). Lors du cas d'étude réalisé (campagne 2012, Chap. 6) qui a testé les effets du BPA, cette organisation a été conservée. Or, lors de cette expérience, l'échantillonnage plus fin (toutes les populations) s'avère important pour discriminer les populations impactées de celles qui ne le sont pas (3 réplicats par concentrations). Ainsi, les résultats des CMR de cette campagne ne permettent pas de mettre en avant des effets sur la dynamique car il y a de fortes oscillations d'une date à une autre, correspondant à différents canaux (Fig. 6.9, page 225).

7.2.2 La standardisation des mesures des poissons

A la fin des expériences, tous les poissons sont récupérés puis ils sont mesurés et pesés et les individus de plus de 25 mm sont sexés par observations des gonades sous loupe binoculaire. Cependant, le protocole de mesure de la taille standard n'est pas le même selon que l'épinoche soit vivante ou morte (Chap. 2.3.3.2, page 78). Ces différences de protocole

de mesures ont des répercussions sur la précision de celles-ci, et plus particulièrement sur la variabilité de la mesure (Fig. 7.1). Celle-ci est importante pour les poissons dont la taille est mesurée avec du papier millimétré, avec une précision de l'ordre du mm.

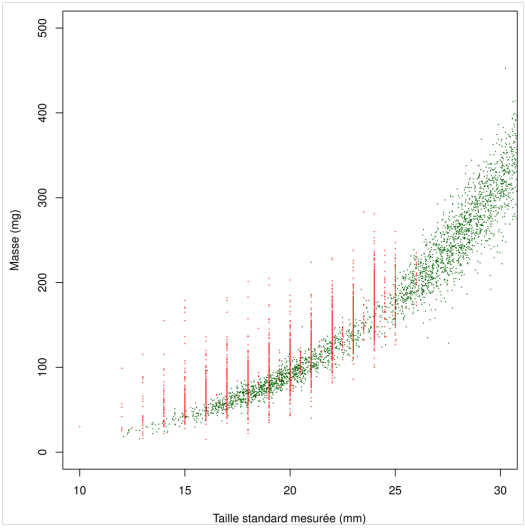

FIGURE 7.1 – Mesure de la masse et de la taille standard des individus de moins de 25 mm à la fin de l'expérience 2010.
● : Épinoches vivantes (mesure de la taille au papier millimétré) ;
● : Épinoches mortes (mesure de la taille au pied à coulisse).

Il serait donc intéressant d'appliquer un même protocole pour tous les individus. Si tous les individus sont mesurés avec un pied à coulisse, les juvéniles auront un stress supplémentaire et le risque de mortalité liée à la manipulation sera accru. Or, ces poissons sont actuellement gardés vivant dans le but d'établir les populations de fondateurs pour l'expérience de l'année N+1. Dans le cas ou tous les poissons seraient tués, une solution pour produire des juvéniles pourrait être de réaliser des fécondations *in-vitro* afin de produire un nombre suffisant de poissons. Cette méthode est présentée dans l'article de Santos *et al.* 2013.

7.3 L'amélioration de l'analyse des données des expériences en mésocosmes

Lors de l'étude de cas, certains résultats sont apparus au niveau de l'organisme à toutes les concentrations, mais pas au niveau de la population. Par exemple, des effets significatifs du BPA ont été observés sur les gonades des épinoches dès 1 et 10 μg/L, (respectivement pour les femelles et pour les mâles ; Chap 6.3.5.1 page 226) mais par sur les variables de la population. La première hypothèse est qu'une variabilité trop importante au niveau des mesures effectuées à l'échelle de la population, ait empêché de mettre en évidence, de manière statistique, des effets au niveau de la population. L'autre hypothèse est qu'il n'y ait pas, après 168 jours d'exposition, de répercussion au niveau de la population de ces perturbations sub-individuelles.

Afin de trancher entre les deux hypothèses, il est important de travailler sur la mise en évidence des différences entre les conditions. Plusieurs méthodes ont été présentées dans le chapitre 1. Nous détaillerons ici la méthode consistant à modéliser la dynamique des populations en mésocosmes développée par Beaudouin (2007) et appliquée dans Beaudouin *et al.* (2012).

Un modèle individu-centré de la dynamique de population de la gambusie en mésocosmes lentiques a été construit, calibré et validé (Beaudouin, 2007; Beaudouin *et al.*, 2012). Il permet de simuler un grand nombre de populations en condition témoins en intégrant la variabilité physico-chimique et trophique. L'ensemble des valeurs prises pour chaque variable biologique estimée donne une loi de distribution mieux caractérisée que des distributions estimées directement à partir de trois mesures dans les canaux témoins. Dans le cadre d'une étude de cas sur l'effet de la densité, ces lois de distribution ont été comparées aux valeurs observées lors de l'étude portant sur les populations ayant différentes conditions initiales (Ni [1], $Ni \times 2$ et $Ni \times 4$). Les résultats montrent, tout d'abord, que toutes les observations des populations contrôles sont comprises dans la loi de distribution du modèle et qu'il n'y a aucune différence significative entre les populations

1. Ni = effectif initial

contrôles simulées et les populations observées.
Ensuite, en comparant ces populations simulées avec les populations dont les conditions initiales ont été perturbées ($Ni \times 2$ et $Ni \times 4$), trois variables (dont les deux identifiées en première approche) qui sont significativement différentes entre les populations contrôles simulées et les populations $Ni \times 2$ et quatre variables (dont les deux identifiées en première approche) sont significativement différentes entre les populations contrôles simulées et les populations $Ni \times 4$.

Cette méthode présente donc deux avantages : (i) un changement d'échelle en permettant de passer de l'individu à la population ; (ii) une amélioration de l'analyse des données. Elle semble être probante pour analyser les données et augmenter la puissance statistique, mais elle nécessite de nombreuses connaissances et un nombre important de données afin de calibrer puis valider le modèle.
Cette thèse a permis de produire des données nécessaire au développement de ce type de modèle. Ainsi, grâce à nos résultats, la biologie de l'épinoche est mieux connue et les valeurs de paramètres rendant compte de la croissance et de la reproduction ont été estimées pour le site de l'Ineris. Il semble donc possible de construire un modèle avec les connaissances acquises et en suivant le protocole de Grimm *et al.* (2010). Le modèle serait propre au suivi de la dynamique de la population d'épinoche en mésocosme lotique. Il pourrait être calibré avec les valeurs des paramètres estimés pour notre site d'étude (chapitre 3) et avec les données d'une année témoin, puis validé sur l'autre année témoin (chapitre 5). Enfin, ce modèle pourrait permettre d'analyser plus finement les observations issues de l'exposition des épinoches au BPA, dans laquelle quatre conditions ont été tripliquées (chapitre 6).

Ce modèle individu-centré, permettra en outre de répondre à certaines questions qui demeurent sans réponse. En effet, certains points n'ont pas pu être travaillés au cours de la thèse (manque de temps ou impossibilité matérielle), comme par exemple, la survie. C'est pourtant une caractéristique essentielle pour comprendre la dynamique des populations de poissons. Les principales questions à résoudre sont les suivantes :

– Quel est le poids de la prédation inter et intra spécifique ?

– Quel est le poids des conditions environnementales (température, manque de nourriture...) sur la survie ?

– Quels sont les effets de la densité dépendance ?

7.4 Les expériences et développements futurs

Les points relevés dans cette partie permettent de définir les perspectives de ce travail. Ainsi le protocole sera ajusté afin de répondre aux besoins des expériences. Ainsi, lors du projet DOREMIPHARM (financement ANSM), qui a pour but d'étudier les effets de produits pharmaceutiques dans les mésocosmes, il sera important de mieux suivre les différences entre les populations de poissons (échantillonnage de la population de façon synchrone entre toutes les populations).

A l'occasion d'une prochaine thèse qui débutera en octobre 2013, un modèle individu-centré sera construit puis calibré et validé, conformément à la méthode proposée par Beaudouin *et al.* (2012). Ce modèle permettra, par la suite, de répondre aux questions listées dans cette partie.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les tests écotoxicologiques réalisés en mésocosmes offrent une pertinence écologique grâce à leur complexité, mais en contrepartie, cette dernière contribue à une variabilité importante entre les différents réplicats d'une expérience. Par conséquent, la variabilité émergeant du protocole expérimental doit être réduite au maximum, afin de ne pas s'ajouter à la première citée.

Cette thèse a permis de définir un protocole pour réaliser des expériences en mésocosmes avec des épinoches à trois épines. Afin que les poissons se développent dans des conditions en accord avec leurs exigences biologiques, des expériences ont été menées sur les traits d'histoire de vie (croissance, survie, reproduction) de cette espèce.

En 2010 et 2011, 11 populations ont été suivies dans des conditions témoins afin d'acquérir des connaissances sur la dynamique de la population sans perturbation. Ces expériences nous ont permis d'améliorer le protocole et de se rendre compte des besoins (méthode de sexage non-invasive, réplicable et fiable...) et des manques (connaissances sur la biologie de l'épinoche...).

Une étude de cas a ensuite été conduite, afin de tester les effets du bisphénol A, perturbateur endocrinien avéré, dont les conséquences environnementales inquiètent. Cette étude a mis en avant des effets de cette molécules au niveau de l'individu (atrophie des gonades) dès 1 μg/L chez les femelles et au niveau de la population (décalage du pic de la distribution de taille, juvéniles plus grands et plus de mâles immatures) dès 100 μg/L.

Les apports de cette thèse sont donc multiples : connaissances sur les traits d'histoire de vie de l'épinoche, sur la dynamique de la population en conditions témoins, connaissances au niveau du fonctionnement d'un environnement semi-naturel, effets du BPA sur les populations en conditions écosystémiques.
Ces connaissances et ces apports seront utilisés et développés dans de prochains projets, et les résultats issus de ces travaux ont fait l'objet de publications scientifiques.

BIBLIOGRAPHIE

Adams, C. et Greeley, M. (2000). Ecotoxicological indicators of water quality : Using multi-response indicators to assess the health of aquatic ecosystems. *Water, Air, and Soil Pollution*, 123 :103 – 115.

Aguirre, W. E. (2009). Microgeographical diversification of threespine stickleback : body shape-habitat correlations in a small, ecologically diverse Alaskan drainage. *Biological Journal of the Linnean Society*, 98(1) :139–151.

Alexander, H. C., Dill, D. C., Smith, L. W., Guiney, P. D., et Dorn, P. (1988). Bisphenol a : Acute aquatic toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 7(1) :19–26.

Allen, J. R. M. et Wootton, R. J. (1982). The Effect of Ration and Temperature on the Growth of the 3-Spined Stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. *Journal of Fish biology*, 20(4) :409–422.

Allen, J. R. M. et Wootton, R. J. (1983). Rate of food consumption in a population of threespine sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus* estimated from the faecal production. *Environmental Biology of Fishes*, 8(2) :157–162.

Andersen, A. K., Schou, J., Sparrevohn, C. R., Nicolajsen, H., et StØTtrup, J. G. (2005). The quality of release habitat for reared juvenile flounder, *Platichthys flesus*, with respect to salinity and depth. *Fisheries Management and Ecology*, 12(3) :211–219.

Andersen, H. R., Halling-Sorensen, B., et Kusk, K. O. (1999). A parameter for detecting estrogenic exposure in the copepod *Acartia tonsa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 44(1) :56–61.

Andersson, C., Lundstedt-Enkel, K., Katsiadaki, I., Holt, W. V., Van Look, K. J. W., et Orberg, J. (2010). A chemometrical approach to study interactions between ethynylestradiol and an AhR-agonist in stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Journal of Chemometrics*, 24(11-12) :768–778.

Baker, J. A. (1994). Life history variation in female threespine stickleback. In Bell, M. A. et Foster, S. A., editors, *The Evolutionary Biology of the Threespine Stickleback*, pages 144–187. Oxford University Press, Oxford.

Bal, G., Rivot, E., Prévost, E., Piou, C., et Baglinière, J. L. (2011). Effect of water temperature and density of juvenile salmonids on growth of young-of-the-year Atlantic salmon *Salmo salar*. *Journal of Fish biology*, 78(4) :1002–1022.

Barber, I., Nairn, D., et Huntingford, F. A. (2001). Nests as ornaments : revealing construction by male sticklebacks. *Behavioral Ecology*, 12(4) :390–396.

Barko, J. W. et Smart, R. M. (1981). Comparative influences of light and temperature on the growth and metabolism of selected submersed freshwater macrophytes. *Ecological Monographs*, 51(2) :219–236.

Barrett, R. D. H., Paccard, A., Healy, T. M., Bergek, S., Schulte, P. M., Schluter, D., et Rogers, S. M. (2011). Rapid evolution of cold tolerance in stickleback. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 278(1703) :233–238.

Bau, F. et Parent, J.-P. (2000). Seasonal variations of thyroid hormone levels in wild fish. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series {III} - Sciences de la Vie*, 323(4) :365 – 372.

Baumgartner, D. et Rothhaupt, K. (2003). Predictive length-dry mass regressions for freshwater invertebrates in pre-alpine lake littoral. *International Review of Hydrobiology*, 88 :453 – 463.

Beaudouin, R. (2007). *Modélisation individu-centrée pour aider à la détection et à l'interprétation des effets des polluants chimiques sur la dynamique de population d'un poisson, la gambusie en écosystème expérimental*. PhD thesis, Université de Rennes 1, Rennes.

Beaudouin, R., Ginot, V., et Monod, G. (2008). Growth characteristics of eastern mosquitofish *Gambusia holbrooki* in a northern habitat (Brittany, France). *Journal of Fish biology*, 73(10) :2468–2484.

Beaudouin, R., Ginot, V., et Monod, G. (2012). Improving mesocosm data analysis through individual-based modelling of control population dynamics : a case study with mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). *Ecotoxicology*, 21(1) :155–164.

Beaudouin, R. et Péry, A. (2011). Analyse des données obtenues lors d'expériences d'écotoxicologie en mésocosmes. Technical report, Ineris / Onema.

Beketov, M. A. et Liess, M. (2008). Variability of pesticide exposure in a stream mesocosm system : Macrophyte-dominated vs. non-vegetated sections. *Environmental Pollution*, 156(3) :1364–1367.

Belanger, S. (1997). Literature review and analysis of biological complexicty in model stream ecosystems : influence of size and experimental design. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 36 :1–16.

Belanger, S., Guckert, J., Bowling, J., Begley, W., Davidson, D., LeBlanc, E., et Lee, D. (2000). Responses of aquatic communities to 25-6 alcohol ethoxylate in model stream ecosystems. *Aquatic Toxicology*, 48(2–3) :135 – 150.

Belanger, S., Meiers, E., et Bausch, R. (1995). Direct and indirect ecotoxicological effects of alkyl sulfate and alkyl ethoxysulfate on macroinvertebrates in stream mesocosms. *Aquatic Toxicology*, 33(1) :65 – 87.

Belfroid, A., van Velzen, M., van der Horst, B., et Vethaak, D. (2002). Occurrence of bisphenol A in surface water and uptake in fish : evaluation of field measurements. *Chemosphere*, 49(1) :97–103.

Bell, A. M. (2001). Effects of an endocrine disrupter on courtship and aggressive behaviour of male three-spined stickleback,*Gasterosteus aculeatus*. *Animal Behaviour*, 62(4) :775–780.

Bell, A. M. (2004). An endocrine disrupter increases growth and risky behavior in threespined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Hormones and Behavior*, 45(2) :108–114.

Bell, A. M., Henderson, L., et Huntingford, F. (2010). Behavioral and respiratory responses to stressors in multiples populations of three-spined stiklebacks that differ in predation pressure. *Journal of Comparative Physiology B*, 180 :211–220.

Bell, M. A. et Foster, S. A. (1994). *The evolutionary biology of the threespine stickleback*. Oxford University Press on Demand.

Benke, A., Huryn, A., Smock, L., et Wallace, J. (1999). Length-mass relationships for freshwater macroinvertebrates in north america with particular reference to the southeastern united states. *Journal of the Noth American Benthology Society*, 18 :308 – 343.

Bergek, S., Ma, Q., Vetemaa, M., FranzÃ©n, F., et Appelberg, M. (2012). From individuals to populations : Impacts of environmental pollution on natural eelpout populations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 79(0) :1 – 12.

Bernhardt, R. R., von Hippel, F. A., et Cresko, W. A. (2006). Perchlorate induces hermaphroditism in threespine sticklebacks. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(8) :2087–2096.

Bisson, P. et Davis, G. (1976). Production of juvenile chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, in a heated model stream. *Fishery Bulletin*, 74 : 4 :763 – 774.

Björkblom, C., Olsson, P. E., Katsiadaki, I., et Wiklund, T. (2007). Estrogen- and androgen-sensitive bioassays based on primary cell and tissue slice cultures from threespined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology*, 146(3) :431–442.

Black, R. et Wootton, R. J. (1970). Dispersion in a natural population of Three-spined Stickleback. *Canadian Journal of Zoology*, 48 :1133–1135.

Bolduc, F. et FitzGerald, G. J. (1989). The role of selected environmental factors and sex ratio upon egg production in three-spine sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*. *Canadian Journal of Zoology*, 67(8) :2013–2020.

Bonhomme, R. (2000). Bases and limits to using degree.day units. *European Journal of Agronomy*, 13(1) :1–10.

Borg, B. (1982). Seasonal effects of photoperiod and temperature on spermatogenesis and male secondary sexual charcters in the Three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. . *Canadian Journal of Zoology*, 60 :3377–3386.

Borg, B. et Van Veen, T. (1982). Seasonal effects of photoperiod and temperature on the ovary of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. *Canadian Journal of Zoology*, 60 :3387 – 3393.

Boulé, V. et Fitzgerald, G. J. (1989). Effects of constant and fluctuating temperatures on egg production in the threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Canadian Journal of Zoology*, 67(6) :1599–1602.

Boutry, E. (1983). Les corégones du léman : Pêches, repeuplement et essais d élevage de juvéniles en cages immergées. Technical report, Institut de Limnologie, Thonon-les-bains.

Bouyer, J. (2000). *Méthodes Statistiques*. De Boeck Secundair.

Bowen, L., Werner, I., et Johnson, M. (2006). Physiological and behavioral effects of zinc and temperature on coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Hydrobiologia*, 559(1) :161–168.

Boyle, T. et Fairchild, J. (1997). The role of mesocosm studies in ecological risk analysis. *Ecological Applications*, 7 :1099 – 1102.

Braun-Blanquet, J. (1921). Prinzipen einer Systematik der Pflanzengesellschaften auf floristischer grundlage. *Gallischen Naturwissenschaftlichen Gesellschaft*, Jahrbuch der Sankt Gallischen Naturwissenschaftlichen Gesellschaft(57) :305–351.

Brazner, J. C. et Kline, E. R. (1990). Effects of chlorpyrifos on the diet arid growth of larval fathead minnows, *Pimephales promelas*, in littoral enclosures. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences*, 47(6) :1157–1165.

Brian, J. V., Augley, J. J., et Braithwaite, V. A. (2006). Endocrine disrupting effects on the nesting behaviour of male three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* L. *Journal of fish biology*, 68(6) :1883–1890.

Brown-Peterson, N. et Heins, D. (2009). Interspawning interval of wild female three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* in Alaska. *Journal of Fish biology*, 74 :2299–2312.

Bursztyka, J. (2008). *Métabolisme du Bisphenol A, de la vinchlozoline et de la génistéine dans les systèmes biologiques utilisés pour étudier les perturbateurs endocriniens, conséquences en terme de toxicité.* PhD thesis, Institut notional polytechnique de Toulouse.

Candolin, U. (2000). Male-male competition ensures honest signaling of male parental ability in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 49(1) :57–61.

Caquet, T., Hanson, M. L., Roucaute, M., Graham, D. W., et Lagadic, L. (2007). Influence of isolation on the recovery of pond mesocosms from the application of an insecticide. ii. benthic macroinvertebrate responses. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(6) :1280–1290.

Caquet, T. et Lagadic, L. (2005). Application des mésocosmes aquatiques à l'ecotoxicologie expérimentale. In *Approche expérimentale des écosytèmes aquatiques*, number 14, pages 255–274.

Caquet, T., Lagadic, L., Jonot, O., Baturo, W., Kilanda, M., Simon, P., LeBras, S., Echaubard, M., et Ramade, F. (1996). Outdoor experimental ponds (mesocosms) designed for long-term ecotoxicological studies in aquatic environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 34(2) :125–133.

Caquet, T., Lagadic, L., Monod, G., Lacaze, J. C., et Couté, A. (2001). Variability of physicochemical and biological parameters between replicated outdoor freshwater lentic mesocosms. *Ecotoxicology*, 10 :51–66.

Caquet, T., Lagadic, L., et Sheffield, S. R. (2000). Mesocosms in ecotoxicology (1) Outdoor aquatic systems. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 165 :1–38.

Carpenter, S. R. et Lodge, D. M. (1986). Effects of submersed macrophytes on ecosystem processes. *Aquatic Botany*, 26(0) :341–370.

Chaloner, D. T., Martin, K. M., Wipfli, M. S., Ostrom, P. H., et Lamberti, G. A. (2002). Marine carbon and nitrogen in southeastern alaska stream food webs : evidence from artificial and natural streams. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 59(8) :1257–1265.

Chauveau, J. (2013). Algorithmes de recherche heuristiques.

Ciric, C. (2012). *Conception et développement d'un nouveau modèle d'écosystème aquatique adapté pour décrire la dynamique des espèces dans des mésocosmes lotiques.* PhD thesis, Université de Lyon.

Clements, S. et Schreck, C. B. (2004). Central administration of corticotropin-releasing hormone alters downstream movement in an artificial stream in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *General and Comparative Endocrinology*, 137(1) :1 – 8.

Conseil Européen (2002). Règlement du conseil numéro 2371 / 2002 relatif à la conservation et à l'exploitation durables des ressources halieutiques dans le cadre de la politique commune de la pêche.

Cousins, I. T., Staples, C. A., Klecka, G. M., et Mackay, D. (2002). A multimedia assessment of the environmental fate of bisphenol A. *Human and Ecological Risk Assessment : An International Journal*, 8(5) :1107–1135.

Craig-Bennett, A. (1931). The reproductive cycle of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, linn. *Philosophical transactions of the Royal London B*, 219 :197 – 284.

Crain, D. A., Eriksen, M., Iguchi, T., Jobling, S., Laufer, H., LeBlanc, G. A., et Guillette Jr, L. J. (2007). An ecological assessment of bisphenol-A : Evidence from comparative biology. *Reproductive Toxicology*, 24(2) :225–239.

Crouse, M. R., Callahan, C. A., Malueg, K. W., et Dominguez, S. E. (1981). Effects of fine sediments on growth of juvenile coho salmon in laboratory streams. *Transactions of the American Fisheries Society*, 110(2) :281–286.

Cummins, K., Petersen, R., Howard, F., Wuycheck, J., et Holt, V. (1973). The utilization of leaf litter by stream detritivores. *Ecology*, 54 :336 – 345.

de Kermoysan, G., Joachim, S., Baudoin, P., Lonjaret, M., Tebby, C., Lesaulnier, F., Lestremau, F., Chatellier, C., Akrour, Z., Pheron, E., Porcher, J.-M., Péry, A. R., et Beaudouin, R. (2013a). Effects of bisphenol a on different trophic levels in a lotic experimental ecosystem. *Aquatic Toxicology*, 144 - 145(0) :186 – 198.

de Kermoysan, G., Péry, A. R., Porcher, J.-M., et Beaudouin, R. (2013b). A non-invasive method based on head morphology to sex mature three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* l.) in rearing conditions. *Mathematical Biosciences*, 244(0) :148 – 153.

de la Republique Française, J. O. (2012). *LOI no 2012-1442 du 24 décembre 2012 visant à la suspension de la fabrication, de l'importation, de l'exportation et de la mise sur le marché de tout conditionnement à vocation alimentaire contenant du bisphénol A (1).*

Delfosse, V., Grimaldi, M., Pons, J., Boulahtouf, A., le Maire, A., Cavailles, V., Labesse, G., Bourguet, W., et Balaguer, P. (2012). Structural and mechanistic insights into bisphenols action provide guidelines for risk assessment and discovery of bisphenol a substitutes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 :14930–14935.

Detenbeck, N. E., Hermanutz, R., Allen, K., et Swift, M. C. (1996). Fate and effects of the herbicide atrazine in flow-through wetland mesocosms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(6) :937–946.

Deutsch, W. G., Webber, E. C., Bayne, D. R., et Reed, C. W. (1992). Effects of largemouth bass stocking rate on fish populations in aquatic mesocosms used for pesticide research. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11(1) :5–10.

Downes, B., Lake, P., et Schreiber, E. (1993). Spatial variation in the distribution of

stream invertebrates : implications of patchiness for models of community organization. *Freshwater Biology*, 30(1) :119–132.

Dueri, S., Dahllöf, I., Marinov, D., et Zaldivar, J. (2009). Modeling the combined effect of nutrients and pyrene on the plankton population : Validation using mesocosm experiment data and scenario analysis. *Ecological Modelling*, 220 :2060 – 2067.

Dufresne, F., FitzGerald, G. J., et Lachance, S. (1990). Age and size-related differences in reproductive success and reproductive costs in threespine sticklebacks (Gasterosteus aculeatus).

Duft, M., Schulte-Oehlmann, U., Weltje, L., Tillmann, M., et Oehlmann, J. (2003). Stimulated embryo production as a parameter of estrogenic exposure via sediments in the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. *Aquatic Toxicology*, 64(4) :437–449.

Duman, F. et Ozturk, F. (2010). Nickel accumulation and its effect on biomass, protein content and antioxidative enzymes in roots and leaves of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.). *Journal of Environmental Sciences*, 22(4) :526–532.

Essington, T. E., Kitchell, J. F., et Walters, C. J. (2001). The von Bertalanffy growth function, bioenergetics, and consumption rates of fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 58 :2129–2138.

European Council (2011). Directive 2011/8/EU of 28 January 2011 amending Directive 2002/72/EC as regards the restriction of use of bisphenol A in plastic infant feeding bottles.

European Union (2008). EU Risk Assessment : Updated Risk Assessment report on bisphenol A.

Européenne, C. (2001). European workshop on endocrine disrupters. Technical report, Direction générale de l'Environnement de la Commission Européenne.

Falcy, M., Jargot, D., La Rocca, B., Miraval, S., Pillière, F., Robert, S., et Simonnard, A. (2013). Fiche toxicologique ft 279 du bisphénol a. Technical report, Institut National de Recherche et de Sécurité.

Farbridge, K. et Leatherland, J. (1992). Plasma growth hormone levels in fed and fasted rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) are decreased following handling stress. *Fish Physiology and Biochemistry*, 10(1) :67–73.

FitzGerald, G. J. et van Havre, N. (1987). The adaptive significance of cannibalism in stickleback (Gasterosteidae : Pisces). *Behav Ecol Sociobiol*, 20.

Flint, S., Markle, T., Thompson, S., et Wallace, E. (2012). Bisphenol A exposure, effects, and policy : A wildlife perspective. *Journal of Environmental Management*, 104(0) :19–34.

Foster, S. A. (1988). Diversionary displays of paternal stickleback. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 22(5) :335–340.

Foster, S. A., Garcia, V. B., et Town, M. Y. (1988). Cannibalism as the cause of an ontogenetic shift in habitat use by fry of the threespine stickleback. *Oecologia*, 74(4) :577–585.

Freon, P. (1978). Relation Tailles-poids, facteur de condition, et indice de maturité sexuelle : rappels bibliographiques, interprétations, remarques et applications. In *La reproduction des espèces exploitées dans le Golfe de Guinée. Rapport du groupe de travail ISRA-ORSTOM (Dakar, 7-12 nov 1977). Doc. Sci.*, volume 67, page 213. Cent. Océanogr. Dakar-Thiaraye.

Froese, R. et Binohlan, C. (2000). Empirical relationships to estimate asymptotic length, length at first maturity and length at maximum yield per recruit in fishes, with a simple method to evaluate length frequency data. *Journal of Fish biology*, 56(4) :758–773.

Fukuhori, N., Kitano, M., et Kimura, H. (2005). Toxic effects of bisphenol A on sexual and asexual reproduction in *Hydra oligactis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48(4) :495–500.

Gamito, S. (1998). Growth models and their use in ecological modelling : an application to a fish population. *Ecological Modelling*, 113 :83–94.

Gaten, E. (1986). Life cycle of *Lymnaea peregra* (Gastropoda : Pulmonata) in the Leicester canal, U.K., with an estimate of annual production. *Hydrobiologia*, 135(1-2) :45–54.

Georges, D. (2010). Caractérisation de la dynamique de population et des traits d'histoire de vie de l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*) en mésocosme en situation témoin. Technical report.

Giesy, J. et Graney, R. (1989). Recent developments in and intercomparisons of acute and chronic bioassays and bioindicators. *Hydrobiologia*, 188-189(1) :21–60.

Gíslason, G. M., Gudmundsson, A., et Einarsson, A. (1998). Population densities of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* l.) in a shallow lake. *Proceedings - International association of theorical and applied Limnology*, 26 :2244–2250.

Glöer, P. (2002). *Die tierwelt deutschlands : Die Süßwassergastropoden Nord- und Mitteleuropas*. ConchBooks, Hackenheim.

Going, B., Simpson, J., et Even, T. (2008). The influence of light on the growth of watercress (*Nasturtium officinale* r. br.). *Hydrobiologia*, 607(1) :75–85.

Gordon, D. A., Toth, G. P., Graham, D. W., Lazorchak, J. M., Reddy, T. V., Knapp, C. W., deNoyelles Jr., F., Campbell, S., et Lattier, D. L. (2006). Effects of eutrophication on vitellogenin gene expression in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to 17 alpha ethynylestradiol in field mesocosms. *Environmental Pollution*, 142(3) :559 – 566.

Grimm, V., Berger, U., DeAngelis, D. L., Polhill, J. G., Giske, J., et Railsback, S. F. (2010). The ODD protocol : A review and first update. *Ecological Modelling*, 221(23) :2760–2768.

Hagen, D. W. et Gilbertson, L. G. (1973). *Selective predation and the intensity of selection acting upon the lateral plates of threespine sticklebacks*. PhD thesis, University of Leicester.

Hahlbeck, E., Griffiths, R., et Bengtsson, B.-E. (2004a). The juvenile three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* l.) as a model organism for endocrine disruption : I. sexual differentiation. *Aquatic Toxicology*, 70(4) :287 – 310.

Hahlbeck, E., Katsiadaki, I., Mayer, I., Adolfsson-Erici, M., James, J., et Bengtsson, B.-E. (2004b). The juvenile three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* l.) as a model organism for endocrine disruption ii—kidney hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction. *Aquatic Toxicology*, 70(4) :311 – 326.

Hayashi, T., Kamo, M., et Tanaka, Y. (2008). Population-level ecological effect assessment : estimating the effect of toxic chemicals on density-dependent populations. *Ecological Research*, 24(5) :945–954.

Heemken, O. P., Reincke, H., Stachel, B., et Theobald, N. (2001). The occurrence of xenoestrogens in the Elbe river and the North Sea. *Chemosphere*, 45(3) :245–259.

Heimbach, F., Berndt, J., et Plflueger, W. (1994). *Freshwater field tests for hazard assessment of chemicals*, chapter Fate and biological effects of Herbicide on two artificial pond ecosystems of different size, pages 303 – 320. Hill, I.R. and Heimbach, F. and Leeuwaugh, P. and Matthissen, P.

Hermanutz, R. O., Allen, K. N., Roush, T. H., et Hedtke, S. F. (1992). Effects of elevated selenium concentrations on bluegills (*lepomis macrochirus*) in outdoor experimental streams. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11(2) :217–224.

Hernandez-Llamas, A. et Ratkowsky, D. A. (2004). Growth of fishes, crustaceans and molluscs : estimation of the von Bertalanffy, Logistic, Gompertz and Richards curves and a new growth model.

Heywood, J. et Edwards, R. (1962). Some aspects of the ecology of *Potamopyrgus jenkinsi* smith. *Journal of Animal Ecology*, 31 :239–250.

Hoshi, Hidenobu, Kamata, Yoichi, Uemura, et Takashi (2003). Effects of 17 beta-estradiol, bisphenol a and tributyltin chloride on germ cells of *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of veterinary medical science/the Japanese Society of Veterinary Science*, 65(8) :881–885.

Hurvich, C. et Tsai, C. (1995). Model selection for extended quasi-likelihood models in small samples. *Biometrics*, 51(3) :1077–1084.

Hyatt, K. D. et Ringler, N. H. (1989). Egg cannibalism and the reproductive strategies of threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus* in cosatal British Coloumbia Canada lake. *Canadian Journal of Zoology*, 67(8).

Inserm (2011). *Reproduction et environnement*. Number XXI. Ministère de la Santé.

Irmak, S., Erbatur, O., et Akgerman, A. (2005). Degradation of 17 beta-estradiol and bisphenol a in aqueous medium by using ozone and ozone/uv techniques. *Journal of Hazardous Materials*, B126 :54–62.

Ishikawa, M. et Mori, S. (2000). Mating success and male courtship behaviors in three populations of the threespine stickleback. *Behaviour*, 137 :1065–1080.

Jamil, T., Opdekamp, W., van Diggelen, R., et ter Braak, C. (2012). Trait-environement relationships and tiered forward model selection in linear mixed models. *International Journal of Ecology*, 2012 :12.

Järvenpää, M. et Lindström, K. (2011). Algal blooms decrease care but increase egg survival in a fish with paternal care. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 65(11) :2023–2028.

Joachim, S., Andres, S., et Thybaud, E. (2010). Les mésocosmes : synhtèse bibliographique sur les installations existantes. Technical report.

Jobling, S. (1981). Temperature tolerance and the final preferendum-rapid methods for the assessment of optimum growth temperatures. *Journal of Fish Biology*, 19 :439 – 455.

Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., Baunbeck, T., Turner, A. P., et Tyler, C. R. (2004). Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquatic Toxicology*, 66(2) :207–222.

Jolly, C., Katsiadaki, I., Morris, S., Le Belle, N., Dufour, S., Mayer, I., Pottinger, T. G., et Scott, A. P. (2009). Detection of the anti-androgenic effect of endocrine disrupting environmental contaminants using in vivo and in vitro assays in the three-spined stickleback. *Aquatic Toxicology*, 92(4) :228–239.

Jones, D. R., Kiceniuk, J. W., et Bamford, O. S. (1974). Evaluation of the swimming performance of several fish species from the mackenzie river. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 31(10) :1641–1647.

Jones, J. I., Young, J. O., Haynes, G. M., Moss, B., Eaton, J. W., et Hardwick, K. J. (1999). Do submerged aquatic plants influence their periphyton to enhance the growth and reproduction of invertebrate mutualists ? *Oecologia*, 120(3) :463–474.

Kang, J.-H., Aasi, D., et Katayama, Y. (2007). Bisphenol A in the Aquatic Environment and Its Endocrine-Disruptive Effects on Aquatic Organisms. *Critical Reviews in Toxicology*, 37(7) :607–625.

Kara, Y. (2005). Bioaccumulation of Cu, Zn and Ni from the wastewater by treated *Nasturtium officinale*. *International journal of Environmental Science and Technology*, 2(1) :63–67.

Karve, A., von Hippel, F., et Bell, M. (2008). Isolation between sympatric anadromous and resident threespine stickleback species in Mud Lake, Alaska. *Environmental Biology of Fishes*, 81(3) :287–296.

Katsanevakis, S. (2006). Modelling fish growth : Model selection, multi-model inference and model selection uncertainty. *Fisheries Research*, 81 :229–235.

Katsiadaki, I., Morris, S., Squires, C., Hurst, M. R., James, J. D., et Scott, A. P. (2006). Use of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) as a sensitive in vivo test for detection of environmental antiandrogens. *Environmental Health Perspectives*, 114 :115–121.

Katsiadaki, I., Scott, A. P., et Mayer, I. (2002). The potential of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a combined biomarker for oestrogens and androgens in European waters. *Marine Environmental Research*, 54(3-5) :725–728.

Katsiadaki, I., Williams, T. D., Ball, J. S., Bean, T. P., Sanders, M. B., Wu, H., Santos, E. M., Brown, M. M., Baker, P., Ortega, F., Falciani, F., Craft, J. A., Tyler, C. R.,

Viant, M. R., et Chipman, J. K. (2010). Hepatic transcriptomic and metabolomic responses in the stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) exposed to ethinyl-estradiol. *Aquatic Toxicology*, 97(3) :174–187.

Katsumata, H., Kawabe, S., Kaneco, S., Suzuki, T., et Ohta, K. (2004). Degradation of bisphenol a in water by the photo-fenton reaction. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry*, 162 :297 – 305.

Kawase, M., Inoue, Y., Araki, T., et Hashimoto, K. (1999). The simulated moving-bed reactor for production of bisphenol a. *Catalysis Today*, 48(1–4) :199 – 209.

Kennedy, J. H., Ammann, L. P., Waller, W. T., Warren, J. E., Hosmer, A. J., Cairns, S. H., Johnson, P. C., et Graney, R. L. (1999). Using statistical power to optimize sensitivity of analysis of variance designs for microcosms and mesocosms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(2) :113–117.

Köhler, H.-R. et Triebskorn, R. (2013). Wildlife ecotoxicology of pesticides : Can we track effects to the population level and beyond ? *Science*, 341 :759–765.

Kislalioglu, M. et Gibson, R. N. (1976). Prey "Handling Time" and its importance in food selection by the 15-spined stickleback, *Spinachia spinachia* (L.). . *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 25 :151–158.

Klecka, G. M., Gonsior, S. J., West, R. J., Goodwin, P. A., et Markham, D. A. (2001). Biodegradation of bisphenol a in aquatic environments : River die-away. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(12) :2725–2735.

Klecka, G. M., Staples, C. A., Clark, K. E., van der Hoeven, N., Thomas, D. E., et Hentges, S. G. (2009). Exposure analysis of bisphenol A in surface water systems in North America and Europe. *Environmental Science & Technology*, 43(16) :6145–6150.

Knuth, M. L. et Heinis, L. J. (1995). Distribution and persistence of diflubenzuron within littoral enclosure mesocosms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(4) :1087–1097.

Kohra, S., Kuwahara, K., Takao, Y., Ishibashi, Y., Lee, H. C., Arizono, K., et Tominaga, N. (2002). Effect of bisphenol A on the feeding behavior of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of health science*, 48(1) :93–95.

Kosinski, R. (1989). Artificial streams in ecotoxicological research. *Aquatic Toxicology*, 1 :297 – 316.

Kraak, S. B. M. et Bakker, T. C. M. (1998). Mutual mate choice in sticklebacks : attractive males choose big females, which lay big eggs. *Animal Behaviour*, 56(4) :859–866.

Kraak, S. B. M., Bakker T.C.M., et Mundwiler, B. (1999a). Correlates of the duration of the egg collecting phase in the three-spined stickleback. *Journal of Fish biology*, 54 :1038–1049.

Kraak, S. B. M., Bakker T.C.M., et Mundwiler, B. (1999b). Sexual selection in sticklebacks in the field : correlates of reproductive, mating, and paternal sucess. *Behavioral Ecology*, 10(6) :696–706.

Kume, M. (2011). Clutch and egg sizes of two migratory forms of the threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus* in Eastern Hokkaido, Japan. *ZOOLOGICAL STUDIES*, 50(3) :309–314.

Kynard, B. E. (1978). Breeding-behavior of a lacustrine population of threespine sticklebacks (*Gasterosteus-Aculeatus* L.). *Behaviour*, 67 :178–207.

Kyriakopoulos, G., Doulia, D., et Anagnostopoulos, E. (2005). Adsorption of pesticides on porous polymeric adsorbents. *Chemical Engineering Science*, 60(4) :1177 – 1186.

Laurent, M. et Lamarque, P. (1975). Utilisation de la méthode des captures successives (de lury) pour l'évaluation des peuplements piscicoles. *Bulletin Francais de Pisciculture*, 259 :66 – 77.

Lee, W.-S., Monaghan, P., et Metcalfe, N. B. (2012). The pattern of early growth trajectories affects adult breeding performance. *Ecology*, 93(4) :902–912.

Lefébure, R., Larsson, S., et Byström, P. (2011). A temperature-dependent growth model for the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Journal of Fish biology*, 79(7) :1815–1827.

Lehtinen, K.-J. (1989). Survival, growth and disease of three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L., brood exposed to bleached kraft mill effluents (BKME) in mesocosms. *Annales Zoologici Fennici*, 26 :133–143.

Leuven, R., Brock, T., et van Druten, H. (1985). Effects of preservation on dry- and ash-free dry weight biomass of some common aquatic macro-invertebrates. *Hydrobiologia*, 127 :151 – 159.

Levy, G., Lutz, I., Krüger, A., et Kloas, W. (2004). Bisphenol A induces feminization in *Xenopus laevis* tadpoles. *Environmental Research*, 94(1) :102–111.

Licht, O., Jungmann, D., Ladewig, V., Ludwixhowski, K.-u., et Nagel, R. (2004). Bisphenol-A in artificial indoor streams : I. fate and effects on aufwuchs. *Ecotoxicology*, 13 :657–666.

Lin, B. L., Tokai, A., et Nakanishi, J. (2005). Approaches for establishing predicted-no-effect concentrations for population-level ecological risk assessment in the context of chemical substances management. *Environmental Science & Technology*, 39(13) :4833–4840.

Lynch, M. P. et Mensinger, A. F. (2011). Seasonal abundance and movement of the invasive round goby (*Neogobius melanostomus*) on rocky substrate in the Duluth - Superior Harbor of Lake Superior. *Ecology of Freshwater Fish*, 21(1) :64–74.

Maccoll, A. D. C. et Chapman, S. M. (2011). A benthic predatory fish does not cause selection on armour traits in three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* (Gasterosteiformes : Gasterosteidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 104(4) :877–885.

Madsen, T. V. et Brix, H. (1997). Growth, photosynthesis and acclimation by two submerged macrophytes in relation to temperature. *Oecologia*, 110(3) :320–327.

Martz, V. (2011). Analyse des similarités entre les descripteurs de populations d'épinoches à trois épines suivies en mésocosmes. Technical report, Paris.

Maunder, R., Matthiessen, P., Sumpter, J., et Pottinger, T. (2007). Impaired reproduction in three-spined sticklebacks exposed to ethinyl estradiol as juveniles. *Biology of Reproduction*, 77 :999–1006.

McKinnon, J. S. et McPhail, J. D. (1996). Male aggression and colour in divergent populations of the threespine stickleback : experiments with animations. *Canadian Journal of Zoology*, 74(9) :1727–1733.

Mehlis, M., Bakker, T. C. M., Engqvist, L., et Frommen, J. G. (2010). To eat or not to eat : egg-based assessment of paternity triggers fine-tuned decisions about filial cannibalism. *Proceedings of the Royal Society B*, 277 :2627–2635.

Metcalfe, C. D., Metcalfe, T. L., Kiparissis, Y., Koenig, B. G., Khan, C., Hughes, R. J., Croley, T. R., March, R. E., et Potter, T. (2001). Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(2) :297–308.

Meyer, E. (1989). The relationship between body length parameters and dry mass in running water invertebrates. *Archiv Fur Hydrobiologie*, 117 :191 – 203.

Miege, C., Peretti, A., Labadie, P., Budzinski, H., Le Bizec, B., Vorkamp, K., Tronczynski, J., Persat, H., Coquery, M., et Babut, M. (2012). Occurrence of priority and emerging organic compounds in fishes from the Rhone River (France). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(9) :2721–2735.

Mihaich, E., Rhodes, J., Wolf, J., van der Hoeven, N., Dietrich, D., Hall, A. T., Caspers, N., Ortego, L., Staples, C., Dimond, S., et Hentges, S. (2012). Adult fathead minnow, *Pimephales promelas*, partial life-cycle reproductive and gonadal histopathology study with bisphenol A. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(11) :2525–2535.

Mills, L. J. et Chichester, C. (2005). Review of evidence : Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations ? *Science of The Total Environment*, 343(1-3) :1–34.

Moodie, G. E. E. (1972). Predation, natural selection and adaptation in an unusual threespine stickleback. *Heredity*, 28(2) :155–167.

Moran, R., Harvey, I., Moss, B., Feuchtmayr, H., Hatton, K., Heyes, T., et Atkinson, D. (2010). Influence of simulated climate change and eutrophication on three-spined stickleback populations : a large scale mesocosm experiment. *Freshwater Biology*, 55(2) :315–325.

Mori, S. (1987a). Divergence in reproductive ecology of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Japanese Journal of Ichthyology*, 34(2) :165–175.

Mori, S. (1987b). Multinesting behavior by the frsh water three spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Journal of Ethology*, 5(2) :199–202.

Mori, S. (1993). The breeding system of the three spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* (Forma-Leiura) with reference to spatial and temporal patterns of nesting activity. *Behaviour*, 126 :97–124.

Mori, S. (1994). Nest site choice by the three spined stickleback, *Gasterosteus-Aculeatus* (Form Leiurus), in Spring-Fed Waters. *Journal of Fish biology*, 45(2) :279–289.

Mori, S. (1995). Factors associated with and fitness effects of nest-raiding in the three-spined stickleback, Gasterosteus aculeatus, in a natural situation. *Behaviour*, 132(13-14) :1011–1023.

Mori, S. et Nagoshi, M. (1987). Growth and maturity size of the three-spined stickleback *Gasterasteus aculeatus* in rearing pool. *Bulletin of the Faculty of Fisheries. Mie University*, 14 :1–10.

Muller-Feuga, A. (1990). *Modélisation de la croissance des poissons en élevage*. Rapport sc edition.

Nahlik, A. M. et Mitsch, W. J. (2006). Tropical treatment wetlands dominated by free-floating macrophytes for water quality improvement in costa rica. *Ecological Engineering*, 28(3) :246 – 257. <ce :title>The Growth of Ecological Engineering : The Fifth AnnualConference of the American Ecological Engineering Society</ce :title>.

Nettleship, S. (2011). *The impacts of river impoundments on the biology of the three-spined stickleback, Gasterosteus aculeatus*. PhD thesis, University of Leicester.

Newman, R. M. (1991). Herbivory and detritivory on freshwater macrophytes by invertebrates : a review. *Journal of the North American Benthological Society*, pages 89–114.

Nilsson, A. (1997). *Aquatic insects of North Europe, A taxonomic Handbook*, volume 2 Odonata - Diptera. Apollo Books.

OCDE (2006). Guidance document on simulated freshwater lentic field tests (outdoor microcosms and mesocosms).

Odum, E. (1984). The mesocosm. *BioScience*, 34-9 :558 – 562.

Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Tillmann, M., et Markert, B. (2000). Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (mollusca : gasteropoda) in laboratory. Part I : Bisphenol A and Octylphenol as xeno-estrogens. *Ecotoxicology*, 9 :383–397.

Ogle, D. (2011). Functions to support simple fisheries stock assessment methods.

Ogle, D. (2013). Fishr vignette - closed mark recapture abundance estimates. Technical report, Northland College. 21 pp.

Ohko, Y., Ando, I., Niwa, C., Tatsuma, T., Yamamura, T., Nakashima, T., Kubota, Y., et Fujishima, A. (2001). Degradation of bisphenol a in water by tio2 photocatalyst. *Environmental Science & Technology*, 35(11) :2365–2368.

Olson, P. et Nickol, B. (1996). Comparison of *Leptorhynchoides thecatus* (acanthocephala) recruitment into green sunfish and largemouth bass populations. *Journal of Parasitology*, 82(5) :702–706.

OMS (2002). Icps global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. Technical report, International Programme on Chemical Safety, WHO/PCS/EDC/02.2, Geneva, Switzerland.

Östlund Nilsson, S., Mayer, I., et Huntingford, F. A. (2007). *Biology of the Three-Spined Stikleback*. CRC Press.

Ozturk, F., Duman, F., Leblebici, Z., et Temizgul, R. (2010). Arsenic accumulation and biological responses of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) exposed to arsenite. *Environmental and Experimental Botany*, 69(2) :167–174.

Pascoe, D., Carroll, K., Karntanut, W., et Watts, M. M. (2002). Toxicity of 17 alpha ethinylestradiol and bisphenol A to the freshwater cnidarian *Hydra vulgaris*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 43(1) :56–63.

Perceval, O., Caquet, T., Lagadic, L., Bassères, A., Azam, D., Lacroix, G., et Poulsen, V. (2009). Les mésocosmes, des outils pour les gestionnaires de la qualité des milieux aquatiques ? In *Séminaire d'Ecotoxicologie*, Le Croisic.

Poepperl, R. (1998). Biomass determination of aquatic invertebrates in the Northern German lowland using the relationship between body length and dry mass. *Faunistisch-Ökologische Mitteilungen*, 7 :379 – 386.

Poizat, G., Rosecchi, E., et Crivelli, A. J. (1999). Empirical evidence of a trade-off between reproductive effort and expectation of future reproduction in female three-spined sticklebacks. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 266(1428) :1543–1548.

Poizat, G., Rosecchi, E., et Crivelli, A. J. (2002). Life-history variation within a three-spined stickleback population in the Camargue. *Journal of Fish biology*, 60(5) :1296–1307.

Poulin, R. et Fitzgerald, G. J. (1989). Early life histories of three sympatric sticklebacks in a salt-marsh. *Journal of Fish biology*, 34(2) :207–221.

Pressley, P. H. (1981). Parental effort and the evolution of nest guarding tactics in the threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus*. . *Evolution*, 35 :282–295.

Price, K. V., Storn, R. M., et Lampinen, J. A. (2006). *Differential Evolution - a practical approach to global optimization*. Natural Computing. Springer-Verlag.

R Development Core Team, R. (2012). R : A language and environment for statistical computing.

Rakowitz, G., Kubečka, J., Fesl, C., et Keckeis, H. (2009). Intercalibration of hydroacoustic and mark-recapture methods for assessing the spawning population size of a threatened fish species. *Journal of Fish Biology*, 75(6) :1356–1370.

Rasband, W. S. (2012). Imagej, u. s. national institutes of health, bethesda, maryland, usa, http ://imagej.nih.gov/ij/, 1997-2012.

Reimchen, T. E. (1980). Spine deficiency and polymorphism in a population of *Gasterosteus aculeatus* : an adaptation to predators ? *Canadian Journal of Zoology*, 58(7) :1232–1244.

Reimchen, T. E. (1983). Structural relationships between spines and lateral plates in threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Evolution*, 37(5) :931–946.

Reimchen, T. E. (1990). Size structured morality in a treespine stickleback (*Gastrosteus aculeatus*) - Cutthroat Trout (*Oncorhynchus clarki*) community.

Reimchen, T. E., Bell, A. M., et Foster, S. A. (1994). Predators and morphological evolution in three spined stickleback. In *The evolutionary biology of the threespine Stickleback*, chapter 9. Oxford Science Publications.

Rice, J. A., Miller, T. J., Rose, K. A., Crowder, L. B., Marschall, E. A., Trebitz, A. S., et DeAngelis, D. L. (1993). Growth rate variation and larval survival : Inferences from an individual-based size-dependent predation model.

Rickwood, C. J., Dubé, M. G., Hewitt, L. M., Kovacs, T. G., Parrott, J. L., et MacLatchy, D. L. (2006). Use of paired fathead minnow (*Pimephales promelas*) reproductive test. part 1 : Assessing biological effects of final bleached kraft pulp mill effluent using a mobile bioassay trailer system. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(7) :1836–1846.

Robson, D. et Regier, H. (1964). Sample size in petersen mark-recapture experiments. *Transactions of the American Fisheries Society*, 73 :215–226.

Roussel, H. (2005). *Les effets du cuivre sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques : une étude en mésocosmes lotiques*. PhD thesis, Université Toulouse III - Paul Sabatier.

Roussel, H., Chauvet, E., et Bonzom, J.-M. (2008). Alteration of leaf decomposition in copper-contaminated freshwater mesocosms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(3) :637–644.

Roussel, H., Joachim, S., Lamothe, S., Palluel, O., Gauthier, L., et Bonzom, J.-M. (2007a). A long-term copper exposure on freshwater ecosystem using lotic mesocosms : Individual and population responses of three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *Aquatic Toxicology*, 82 :272–280.

Roussel, H., Ten-Hage, L., Joachim, S., Le Cohu, R., Gauthier, L., et Bonzom, J.-M. (2007b). A long-term copper exposure on freshwater ecosystem using lotic mesocosms : Primary producer community responses. *Aquatic Toxicology*, 81 :168–182.

Sanderson, H. (2002). Pesticide studies. *Environmental Science and Pollution Research*, 9(6) :429–435.

Santamaría, L. et van Vierssen, W. (1997). Photosynthetic temperature responses of fresh- and brackish-water macrophytes : a review. *Aquatic Botany*, 58(2) :135 – 150.

Santos, R., Palos-Ladeiro, M., Besnard, A., Porcher, J. M., Bony, S., Sanchez, W., et Devaux, A. (2013). Relationship between DNA damage in sperm after ex vivo exposure and abnormal embryo development in the progeny of the three-spined stickleback. *Reproductive Toxicology*, 36 :6–11.

Saraçli, S., Dogan, N., et Dogan, I. (2013). Comparison of hierarchical cluster analysis methods by cophenetic correlation. *Journal of Inequalities and Applications*, 2013 :203.

Sargent, R. C., Crowley, P. H., Huang, C., Lauer, M., Neergaard, D., et Schmoetzer, L. (1995). A dynamic program for male parental care in fishes : brood cycling and filial cannibalism. *Behaviour*, 132(13-14) :1059–1078.

Searle, C., Xie, G., et Blaustein, A. (2013). Development and infectious disease in hosts with complex life cycles. *PLoS ONE*, 8.

Sebire, M., Allen, Y., Bersuder, P., et Katsiadaki, I. (2008). The model anti-androgen flutamide suppresses the expression of typical male stickleback reproductive behaviour. *Aquatic Toxicology*, 90 :37–47.

Segner, H., Caroll, K., Fenske, M., Janssen, C. R., Maack, G., Pascoe, D., Schäfers, C., Vandenbergh, G. F., Watts, M., et Wenzel, A. (2003). Identification of endocrine-

disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates. Report from the European IDEA project. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54 :302–314.

Seim, W., Lichatowich, J., Ellis, R., et Davis, G. (1977). Effects of kraft mill effluents on juvenile salmon production in laboratory streams. *Water Research*, 11(2) :189 – 196.

Semler, D. E. (1971). Some aspects of adaptation in a polymorphism for breeding colours in the Threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*)). *Journal of Zoology*, 165(3) :291–302.

Shaw, E. A. et Richardson, J. S. (2001). Direct and indirect effects of sediment pulse duration on stream invertebrate assemblages and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth and survival. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 58(11) :2213–2221.

Shaw, J. L. et Kennedy, J. H. (1996). The use of aquatic field mesocosm studies in risk assessment. *Environmental Toxicology and chemistry*, 15 :605 – 607.

Shaw, J. L., Moore, M., Kennedy, J. H., et Hill, I. R. (1994). Design and statistical analysis of field aquatic mesocosm studies. In Granney Kennedy, J.H., Rodgers, J.H. Jr (eds), R. L., editor, *Aquatic mesocosm studies in ecology risk assessment*, chapter 9, pages 85–103. Lewis Boca Raton.

Shimodaira, H. (2004). Approximately unbiased tests of regions using multistep-multiscale bootstrap resampling. *Annals of Statistics*, 32(6) :2616 – 2641.

Shioda, T. et Wakabayashi, M. (2000). Effect of certain chemicals on the reproduction of medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*, 40(3) :239–243.

Smith, C. et Reay, P. (1991). Cannibalism in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1(1) :41–64.

Sohoni, P., Tyler, C. R., Hurd, K., Caunter, J., Hetheridge, M., Williams, T., Woods, C., Evans, M., Toy, R., Gargas, M., et Sumpter, J. P. (2001). Reproductive effects of long-term exposure to bisphenol A in the Fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Science & Technology*, 35(14) :2917–2925.

Sokolowska, E. et Kulczykowska, E. (2006). Annual reproductive cycle in two free living populations of three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) : patterns of ovarian and testicular development. *Oceanologia*, 48(1) :103–124.

Sokolowska, E. et Kulczykowska, E. (2009). Environmental influence on maturation and dominance relationships in the three-spined stikleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) : temperature competes with photoperiod for primacy. *International Journal of Oceanography and Hydrobiology*, 38(4) :31–48.

Sooknah, R. D. et Wilkie, A. C. (2004). Nutrient removal by floating aquatic macrophytes cultured in anaerobically digested flushed dairy manure wastewater. *Ecological Engineering*, 22(1) :27 – 42.

Staples, C. A., Dome, P. B., Klecka, G. M., Oblock, S. T., et Harris, L. R. (1998). A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*, 36(10) :2149–2173.

Staples, C. A., Tilghman Hall, A., Friederich, U., Caspers, N., et Klecka, G. M. (2011). Early life-stage and multigeneration toxicity study with bisphenol A and fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(6) :1548–1557.

Suzuki, R. et Shimodaira, H. (2004). An application of multiscale bootstrap resampling to hierarchical clustering of microarray data : How accurate are these clusters. In *The Fifteenth International Conference on Genome Informatics*, volume 34.

Swarup, H. (1958). Stages in the development of the stickleback *Gasterosteus aculeatus* (L.). *Journal of embryology and experimental morphology*, 6(3) :373–383.

Tachet, H., Richoux, P., Bournaud, M., et Usseglio-Polatera, P. (2000). *Invertébrés d'eau douce : systématique, biologie, écologie*. CNRS Editions, Paris.

Timm, T. (1999). *Eesti rongusside (Annelida) määraja, a guide to the estonan Annelida*. Tartu - Tallinn.

Towers, D., Henderson, I., et Veltman, C. (1994). Predicting dry weight of new zeland aquatic macroinvertebrates from linear dimensions. *New Zeland Journal of marine and freswater Research*, 28 :159 – 166.

Unser, C., Bruland, G., Hood, A., et Duin, K. (2010). A mesocosm study using four native hawaiian plants to assess nitrogen accumulation under varying surface water nitrogen concentrations. *Water Science and Technology*, 62 :2389 – 2397.

van den Assem, J. (1967). Territory in the three-spined stickleback, gasterosteus aculeatus l. an experimental study in intra-specific competition. *Behaviour supplement*.

van den Brink, P. J. et Ter Braak, C. J. F. (1999). Principal Response Curves : Analysis of time-dependent multivariate responses of a biological community to stress. . *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18 :138–148.

van der Oost, R., Beyer, J., et Vermeulen, N. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment : a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13 :57 – 149.

van Iersel, J. J. A. (1953). An analysis of the paternal behaviour of the male three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Behaviour*, 3.

Vickery, W. L., Whoriskey, F. G., et FitzGerald, G. J. (1988). On the evolution of nest raiding and male defensive behaviour in sticklebacks (Pisces : Gasterosteidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 22(3) :185–193.

Volatier, L. (2004). *Réponses d'une communauté péryphytique à un effluent complexe : études en bio-essais et en canaux artificiels*. PhD thesis, Ecole doctorale de Chimie de Lyon, Lyon.

von Bertalanffy, L. (1938). A quantitative theory of organic growth. *Human Biology*, 10(2) :181–213.

Walker, P. D., Wijnhoven, S., et van der Velde, G. (2013). Macrophyte presence and growth form influence macroinvertebrate community structure. *Aquatic Botany*, 104(0) :80–87.

Walton, W., Wirth, M., et Workman, P. (2007). Environmental factors influencing survival of threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) in a multipurpose constructed treatment wetland in southern california. *Journal of Vector Ecology*, 32(1) :90–105.

Ward, G. et FitzGerald, G. J. (1988). Effects of sex ratio on male behaviour and reproductive success in a field population of threespine sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) (pisces : Gasterosteidae). *Journal of Zoology*, 215(4) :597–610.

Warren, C. E., Wales, J., Davis, E., et Doudoroff, P. (1964). Trout production in an experimental stream enriched with sucrose. *The Journal of Wildlife Management*, 28 :617 – 660.

Weihs, C. et Szepannek, G. (2009). Distances in classification. In Perner, P., editor, *Advances in Data Mining. Applications and Theoretical Aspects*, volume 5633 of *Lecture Notes in Computer Science*, pages 1–12. Springer Berlin Heidelberg.

West, R. J., Goodwin, P. A., et Klecka, G. M. (2001). Assessment of the ready biodegradability of bisphenol A. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 67(1) :106–112.

Wetherill, Y., Akingbemi, B., Kannod, J., McLachlan, J., Nadal, A., Sonnenschein, C., Watson, C., Zoeller, R., et Belcher, S. (2007). In vitro molecular mechanisms of bisphenol a action. *Reproductive toxicology*, 24 :178 – 198.

Wetzel, M., Leuchs, H., et Koop, J. (2005). Preservation effects on wet weight, dry weight, and ash-free dry weight biomass estimates of four common estuarine macroinvertebrates : no difference between ethanol and formalin. *Helgoland Marine Research*, 59(3) :206–213.

Whoriskey, F. G. et FitzGerald, G. J. (1985). Sex, cannibalism and sticklebacks. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 18(1) :15–18.

Wilcock, R., Champion, P., Nagels, J., et Croker, G. (1999). The influence of aquatic macrophytes on the hydraulic and physico-chemical properties of a new zealand lowland stream. *Hydrobiologia*, 416(0) :203–214.

Willson, J. D., Hopkins, W. A., Bergeron, C. M., et Todd, B. D. (2012). Making leaps in amphibian ecotoxicology : translating individual-level effects of contaminants to population viability. *Ecological Applications*, 22 :1791 – 1802.

Wirtz, K. et Sommer, U. (2013). Mechanistic origins of variability in phytoplankton dynamics. part ii : analysis of mesocosm blooms under climate change scenarios. *Marine Biology*, 160 :2503 – 2516.

Wootton, R. (1972). The behaviour of the male three-spined stickleback in a natural situation : a quantitative descritption. *Behaviour*, 41 :232–241.

Wootton, R. (1973a). Fecundity of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* (l.). *Journal of Fish biology*, 5(6) :683–688.

Wootton, R. (1973b). The effect of size of food ration on egg production in the female three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. *Journal of Fish biology*, 5(1) :89–96.

Wootton, R. (1976). *The Biology of the sticklebacks*, volume 1. Academic Press (London and New York), London.

Wootton, R. (1984). *Functional biology of sticklebacks*. Department of Zoology, university of Sheffield, London.

Wootton, R. (1985). Effects of food and density on the reproductive biology of the three-spined stickleback with a hypothesis on population limitation in sticklebacks. *Behaviour*, 93 :101–111.

Wootton, R. (2010). Dynamics of extinction of a small population of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) caused by habitat modification. *Aquatic conservation : marine and freshwater ecosystems*, 20 :365–370.

Wootton, R. et Fletcher, D. A. (2009). Effect of spawning number and ration on reproductive performance of the batch-spawning three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Journal of Fish biology*, 75(3) :618–629.

Wrenn, W. et Granneman, K. (1980). Effects of temperature on bluegill, *Lepomis macrochirus*, reproduction and the young-of-the-year standing stock in experimental ecosystems. *Microcosms in Ecol Res*, 52 :703–714.

Yeates-Burghart, Q. S., O'Brien, C., Cresko, W. A., Holzapfel, C. M., et Bradshaw, W. E. (2009). Latitudinal variation in photoperiodic response of the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* in western north america. *Journal of Fish biology*, 75 :2075–2081.

Yeom, D. et Adams, S. (2007). Assessing effects of stress across levels of biological organization using an aquatic ecosystem health index. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67 :286 – 95.

Ylikarjula, J., Heino, M., et Dieckmann, U. (1999). Ecology and adaptation of stunted growth in fish. *Evolutionary Ecology*, 13(5) :433–453.

Zischke, J. A., Arthur, J. W., Nordlie, K. J., Hermanutz, R. O., Standen, D. A., et Henry, T. P. (1983). Acidification effects on macroinvertebrates and fathead minnows (*Pimephales promelas*) in outdoor experimental channels. *Water Research*, 17(1) :47 – 63.

ANNEXES

Sommaire

A Expériences préalables 284

A.1 Quantité de nourriture 284

A.2 Conservation dans le formol 285

B Évolution des plantations des végétaux dans les mésocosmes 287

C Mesure de la taille standard *via* Image J 290

D Coefficient allométriques des populations témoins 291

E Article 1 293

F Quantité d'éthanol injecté dans les canaux 300

G Article 2 301

H Valorisation scientifique pendant la thèse 315

H.1 Publications 315

H.2 Communications orales 315

H.3 Communications affichées 316

A Expériences préalables

A.1 Quantité de nourriture

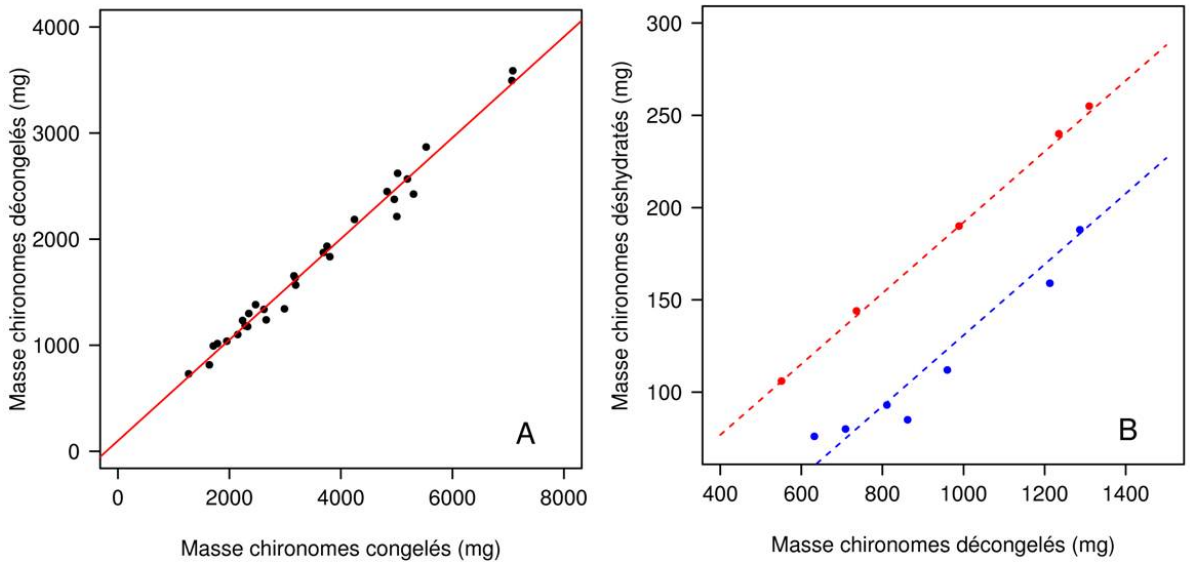

FIGURE A - 1 – Relation à partir de chironomes décongelés

A : Relation entre la masse des chironomes congelés et la masse des chironomes décongelés (équation Eq. 2 - 2, $r^2 = 0{,}9834$).

B : Relation entre la masse des chironomes décongelés et la masse des chironomes après déshydratation (équation Eq. 2 - 3) selon qu'ils soient restés 24 heures (- - :, $r^2 = 0{,}9976$) dans l'eau ou non (- - :, $r^2 = 0{,}9999$).

Par conséquent, la méthode de filtration avec des filtres en nitrocellulose de 45 μm de diamètre semble applicable pour obtenir une masse connue chironomes décongelés à partir des chironomes congelés.

A.2 Conservation dans le formol

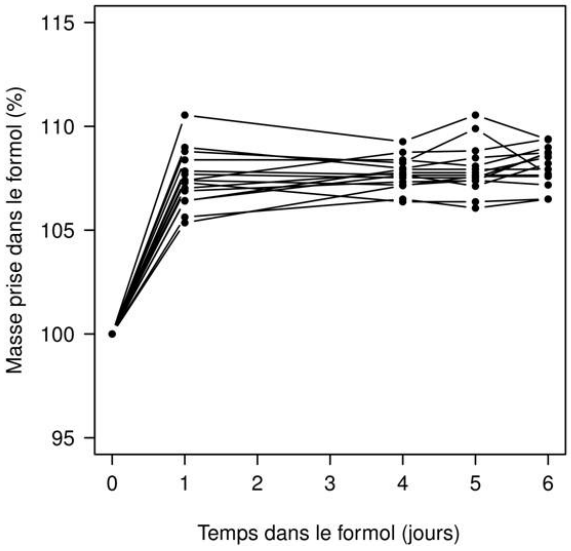

FIGURE A - 2 – Prise de masse des poissons dans le formol jusqu'à stabilisation de la masse.

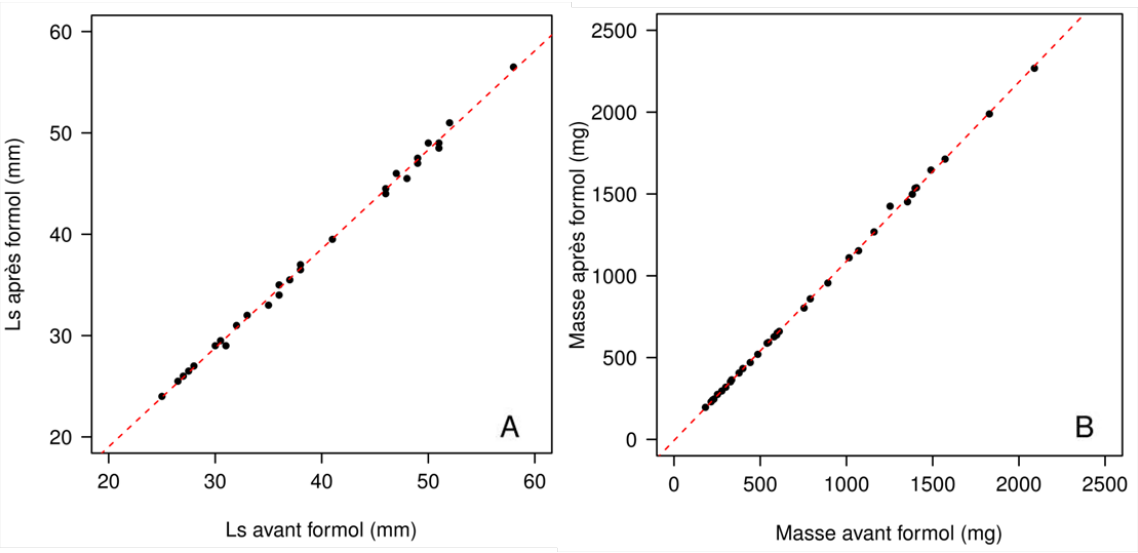

FIGURE A - 3 – A : Relation entre la taille standard fraiche (avant la conservation dans le formol) et la taille standard du poisson dans le formol ($R^2 = 0{,}9976$, équation Eq. 2 - 1, page 42).

B : Relation entre la masse fraiche et la masse du poisson dans le formol ($R^2 = 0{,}9995$, équation Eq. 2 - 1, page 42).

- - - : Régression linéaire

B Évolution des plantations des végétaux dans les mésocosmes

Certains plans se développaient mieux que d'autres. Pour illustrer ce propos, considérons les 35 g de masse humide de callitriche plantés juste devant les jardinières de la partie aval (Fig. B - 4). Dans certains canaux, la callitriche se développait de façon hétérogène car lors de la plantation, du terreau placé autour de chaque pied pouvait se répandre dans l'eau (pas assez compact). Cette diminution du volume de terreau autour des racines affectait alors le développement des végétaux. Un autre point peu réplicable concernait les masses des plans de cresson qui étaient approximatives (58 plans qui devaient être homogènes).

C'est pourquoi, dans un souci d'homogénéisation de l'aménagement des mésocosmes, l'implantation des végétaux a été redéfinie (Fig. B - 4) à partir de 2011.

Dans un souci de simplification de l'introduction des macrophytes, l'organisation du cresson en amont a été revue (Fig. B - 4). Le patron de base a été simplifié et le nombre de plans a été réduit (de 58 à 39). Il y en a 39 qui pèsent 80 g chacun (en moyenne). Il suffit alors de peser 400 g de cresson et de le répartir en 5 brins équivalents. Cette opération est renouvelée 8 fois (un brin est retiré la dernière fois). Ainsi, la méthode de pesée est simple et la répartition le long de la partie amont du canal également garantissant une meilleure reproductibilité.

En aval, la décision a été prise de planter 4 plans de macrophytes autour de chaque jardinière. Augmenter le nombre de plans permet une meilleure colonisation des végétaux car la probabilité que les 4 ne se développent pas diminue. Enfin, la dernière jardinière (à 16.5 m avant 2010) a été déplacée à 18 m a partir de 2010 (Fig. B - 4) afin d'optimiser l'espace. En outre, un tel positionnement aura pour effet de modifier l'hydrologie juste avant la sortie des canaux et donc de stabiliser le sédiment. Le fait d'ajouter des plans dans les canaux augmente le temps d'aménagement. Ce point peut être un inconvénient car en aval, 21 plans ($\times$ 12 canaux) sont ajoutés par rapport à 2010, Cet inconvénient est cependant limité en raison de la diminution du nombre de plans en amont (19 ôtés entre 2010 et après). De plus, les masses de chaque espèce sont conservées.

Enfin, depuis 2011, les jardinières sont enfoncées dans le sédiment alors que les années

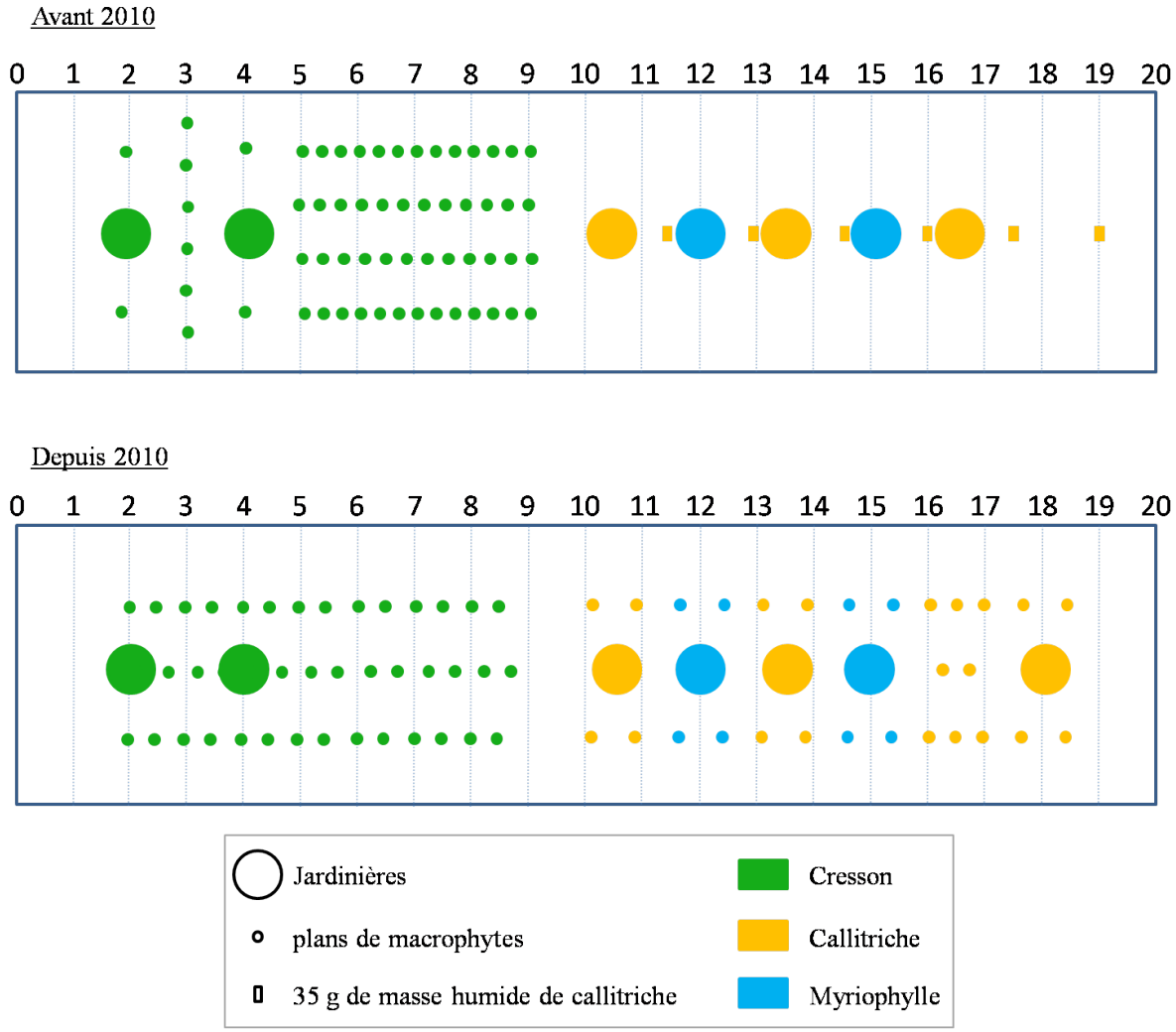

FIGURE B - 4 – Plan d'introduction des végétaux dans un canal, avant 2010 (schéma du haut) et après 2010 (schéma du bas). La masse de végétaux introduit est constante entre les deux années.

précédentes, elles étaient posées sur le sédiment. Ce changement permet une meilleur colonisation du sédiment par les macrophytes et les jardinières perturbent moins le courant d'eau. Ceci à pour conséquences de diminuer les zones sans courant derrière les jardinières (dans le sens amont - aval) qui constituaient des micro-biotopes.

Une autre différence entre les années concerne la date d'introduction des macrophytes. Elle varie entre la semaine 43 et la semaine 46. Trois semaines de décalage sont importantes pour le développement des végétaux, car la température et la lumière ont un effet significatif sur la croissance des macrophytes immergés (Barko et Smart, 1981; Going *et al.*, 2008; Madsen et Brix, 1997; Santamaría et van Vierssen, 1997). L'origine des espèces est la même pour toutes les expériences permettant une stabilité inter-annuelle de l'environnement recréé.

C Mesure de la taille standard *via* Image J

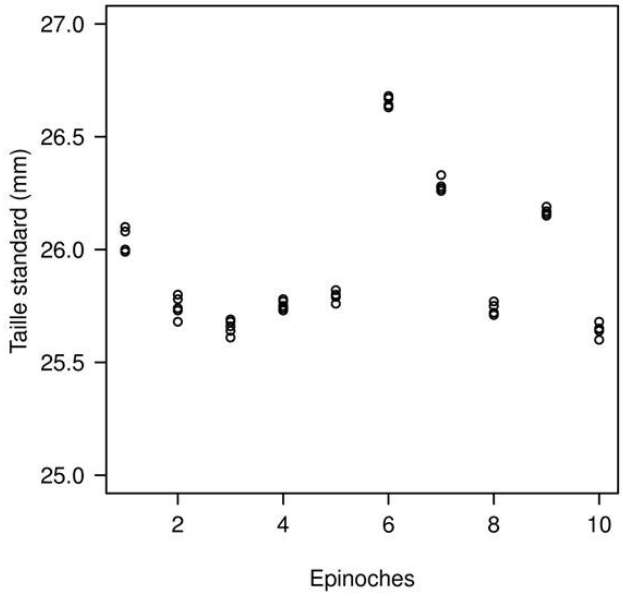

FIGURE C - 5 – Mesure de la taille standard des épinoches prises en photos *via* Image J.

D Coefficient allométriques des populations témoins

Le tableau ci-après recense les valeurs des coefficients allométriques dans les populations témoins (eq. Eq. 2 - 10, page 90, chap. 2).

	Canal	n	R^2	α			β		
				Médiane	**IC min**	**IC max**	**Médiane**	**IC min**	**IC max**
2010	1	673	97,3%	0,014370	0,009459	0,02184	2,901	2,772	3,017
	2	907	98,5%	0,008057	0,006209	0,01012	3,063	3,001	3,137
	3	814	98,0%	0,013650	0,009157	0,01989	2,921	2,803	3,029
	4	627	97,3%	0,010360	0,006968	0,01536	2,993	2,852	3,104
	5	1073	98,0%	0,010400	0,007030	0,01592	3,011	2,894	3,127
	6	1286	97,3%	0,017990	0,010870	0,02545	2,859	2,759	2,999
	7	772	99,0%	0,009067	0,007230	0,01096	3,030	2,977	3,094
	8	862	98,0%	0,010240	0,007567	0,01497	2,998	2,889	3,083
	9	883	98,3%	0,007975	0,004679	0,01114	3,063	2,969	3,189
	10	788	98,9%	0,008334	0,006939	0,00978	3,059	3,013	3,100
	11	909	98,7%	0,008430	0,006424	0,01165	3,058	2,953	3,134
2011	1	983	96,5%	0,010120	0,005679	0,014490	3,070	2,959	3,186
	2	830	98,2%	0,008192	0,005748	0,011830	3,098	2,959	3,200
	3	742	98,4%	0,009612	0,006309	0,012720	3,074	2,992	3,165
	4	707	98,8%	0,005217	0,003223	0,007223	3,241	3,137	3,349
	5	975	98,7%	0,006421	0,004443	0,008211	3,184	3,076	3,290
	6	944	98,6%	0,008039	0,005729	0,010900	3,130	3,037	3,226
	7	997	98,2%	0,007358	0,004130	0,011490	3,137	3,003	3,299
	8	1040	99,1%	0,008908	0,007225	0,010540	3,105	3,059	3,159
	9	1190	98,6%	0,009404	0,006724	0,012330	3,094	3,018	3,188
	10	972	98,7%	0,010490	0,008495	0,013210	3,060	2,994	3,123
	11	899	98,7%	0,010050	0,006859	0,015160	3,057	2,936	3,164

E Article 1

L'article présenté ci-après présente une méthode de discrimination des mâles et des femelles selon la morphologie de la tête. Le papier est publié dans le journal *Mathematical Bioscience*.

Auteurs :

G. de Kermoysan, A. R.R. Péry, J-M. Porcher et R. Beaudouin.

Résumé :

Il est nécessaire de connaitre le nombre précis de mâles et de femelles introduits dans les mésocosmes au début du suivi (mars). Or, il n'existe pas de méthode fiable, réplicable et non-invasive pour un sexage précis des poissons hors de la période de reproduction. Par conséquent, un procédé y répondant a été mis au point. Elle repose sur l'étude de la morphologie céphalique. Un modèle mathématique a été construit, calibré et validé pour déterminer le sexe selon 5 ratios de longueur définis. En fonction d'un risque accepté α, un pourcentage donné de poisson est "sexable" avec un taux d'erreur admis défini. Cette méthode est applicable, quelque soit la saison, pour les poissons issus de l'élevage de l'Ineris. Elle n'est pas applicable dans d'autres conditions.

Les réponses formulées aux auteurs sont rapportées dans le manuscrit.
*La méthode a également été présentée par des communications affichées en congrès national (*Sefa *2011) et en congrès international (*Setac *2012) ainsi que lors de diverses journées des doctorants.*

Mathematical Biosciences xxx (2013) xxx–xxx

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Mathematical Biosciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mbs

A non-invasive method based on head morphology to sex mature three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) in rearing conditions

Goulwen de Kermoysan [a], Alexandre R.R. Péry [a], Jean-Marc Porcher [b], Rémy Beaudouin [a,*]

[a] Unité Modèles pour l'Ecotoxicologie et la Toxicologie (METO), Ineris Parc Technologique Alata, BP2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France
[b] Unité Ecotoxicologie (ECOT), Ineris Parc Technologique Alata, BP2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 9 August 2012
Received in revised form 7 December 2012
Accepted 7 May 2013
Available online xxxx

Keywords:
Fish
Gasterosteus aculeatus
Sexual dimorphism
Head morphology
Linear discriminant analysis

ABSTRACT

A mathematical model to distinguish mature female and male three-spined sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* L. 1758 is proposed. This method is based on sexual dimorphism in the head morphology. The discrimination was established on five distances of interest on the head, adjusted by the standard length of fish. The parameters were estimated based on a training set composed of 102 fish with an equilibrium sex ratio and validated on a test set composed of 69 fish. The model estimates the relationship between the percentage of fish that can be sexed with our model and the percentage of fish correctly sexed. For instance, to reach 1% of error in the sex determination, only 53% of the fish should be considered, whereas to reach 5% of error, 90% of the fish can be used. Compared to other available methods to sex *G. aculeatus*, the model is non invasive, not expensive, rapid, replicable, and can be calibrated outside of the breeding period.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* L. is a small-bodied teleost fish [1–4]. This species constitutes a major component of shallow water food webs in the northern hemisphere [5]. *G. aculeatus* is a reference species for experimental studies on aquatic vertebrates' evolutionary biology, ecology and behavior [1–4].

There have been numerous field and laboratory studies on the feeding and reproductive behavior of *G. aculeatus* [1]. Studies on the consequences of global warming for aquatic ecosystems have also used it as a model species [5]. *G. aculeatus* can be used to assess stress responses in the aquatic environment and in particular to develop general biomarkers [6,7] or biomarkers of endocrine disruption [8]. The kidney of the male *G. aculeatus* produces a unique protein (spiggin) which is used as glue in nest building and which constitutes a good marker of androgenic or anti-androgenic activities. Other endocrine disrupters studies on the same species showed effects on gonadal morphology [9] and cases of feminization of male have been reported [10,11].

Sex ratio can have a considerable influence on the outcomes of an experimental study, especially if this study focuses on reproduction or behavior. Moreover, sex ratio, by itself, can be a relevant endpoint in experimental tests [12]. Consequently, a clear non-invasive methodology is required to distinguish between mature males and females in tests. This is particularly difficult to achieve for species that lack significant visual differences (like size, color or shape), or for which males and females, like *G. aculeatus*, can be visually distinguished only during the breeding season.

Existing methods for sexing *G. aculeatus* that do not require dissection are few. A rough method is related to the observation of secondary sexual characters. When photoperiod is not limiting, mature males develop their nuptial coloration [4]: their eyes become blue, their throat becomes dull red and their body becomes medium grey [4]. During the same time, the females' bellies swell as a clutch of eggs develops. Using these traits to sex *G. aculeatus* can only be performed during the breeding season [13] or in artificial laboratory conditions of photoperiod and temperature [14]. The latter protocol can generate stress for fish and bias the outcome of the subsequent experimental tests in different conditions of photoperiod and temperature. In addition, not all males develop a nuptial colorations (dominant males); the selection of males is therefore biased [15]. Another method is identification through genetic techniques. Sexual phenotype is associated with the gene coding for the enzyme Isocitrate dehydrogenase [16,17]. However, this technique is costly, requires specific materials, does not provide immediate results and is invasive for fish because a piece of spike is usually cut out [18].

Sexual size and morphological dimorphism is common in animals and results from differences in the cumulative effects of natural and sexual selection acting on male and female body [19,20].

* Corresponding author. Tel.: +33 3 44 55 82 38; fax: +33 3 44 55 68 00.
E-mail addresses: Goulwen.DE-KERMOYSAN@ineris.fr (G. de Kermoysan), Alexandre.PERY@ineris.fr (A.R.R. Péry), Jean-Marc.PORCHER@ineris.fr (J.-M. Porcher), Remy.BEAUDOUIN@ineris.fr (R. Beaudouin).

0025-5564/$ - see front matter © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.mbs.2013.05.001

Please cite this article in press as: G. de Kermoysan et al., A non-invasive method based on head morphology to sex mature three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) in rearing conditions, Math. Biosci. (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.mbs.2013.05.001

In human, for instance, sexual dimorphism could be assessed through the analysis of fingertip features [21] or face detection [22]. In fish, for instance in poeciliids family (about 200 species), males have the anal fin modified into an intromittent organ and are smaller than females [23]. In gasterosteidae family, (*G. aculeatus*), several morphological structures are different for male and female: body sizes [2], pelvic girdles [24], pectoral fin size [25] and position [24]. However, head sexual dimorphism is the most clear and robust [13,24]. In *G. aculeatus*, Kitano et al. [24] found that females have a significantly larger standard length than males in 80% of the populations studied. More interestingly, they showed that males had larger heads, when normalized to body size, than females. A further step was taken by Aguirre and Akinpelu [13], who examined the head morphology of *G. aculeatus* and concluded that head shape differed significantly between females and males. They showed that the anterior region of the head was more expanded in males relative to females, while, in females, the dorsal region of the head posterior to the eye was relatively larger.

The aim of this paper is to define a mathematic method to differentiate male and female *G. aculeatus* based on the difference in head morphology described by Aguirre and Akinpelu [13] and Kitano et al. [24]. This method is non-invasive, simple, replicable, and can be used all year round. The head morphology can be determined by measuring distances between predefined landmarks with picture analysis. Linear discriminant analysis was used to predict the sex of the fish according to these distances in two steps, calibration and validation of the model. Both steps require exact knowledge of the sex of the fish.

2. Materials and methods

2.1. Fish

Fish used came from population located at Verneuil-en-Halatte (France, 49.3°N–2.52°E). In October 2010, three months before the beginning of this study, they were caught from artificial outdoor river (mesocosm) and were reared in opaque plastic tanks. Water was renewed (1 L/h) and food (frozen *Chironomidae*) was supplied ad libitum every day (a visual check was made that some of the previous food remained when feeding). The water temperature was 15 ± 1 °C and the photoperiod was a light/dark cycle of 9/15 h.

Fish were selected for measurements according to their length. To describe the length of fish, standard length (L_S) was measured from the anterior tip of the upper lip to the posterior end of the vertebral column. Fish with L_S greater than 34 mm were selected in this study because 100% of the fish were mature at this length (unpublished data). Fish length ranged from 34 to 51 mm (mean ± standard deviation, S.D.: 41.51 ± 3.41 mm) at the beginning of experiments.

2.2. Head morphology measurement

Each fish was caught from the opaque plastic tank with dip net and placed on millimeter paper on its side and photographed with a tripod-mounted camera (5 million pixels, autofocus) at 20 cm from the target in macro-mode and without flashlight.

The sexing method is based on distances measured between landmarks on the head, defining head morphology. Easy-to-determine landmarks were selected, in accordance with Aguirre and Akinpelu [13]. They were defined as follows (Fig. 1(a)): (1) posterior edge of supraoccipital; (2) anterior tip of the snout; (3) posterioventral edge of the angular; (4) posterioventral edge of the third suborbital; and (5) the posterior edge of the operculum. Ten distances were defined (Fig. 1(b)).

The digital picture was then used to measure the ten distances and L_S of the fish to the nearest 0.1 mm using Image J software (Rasband W., 2010, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA).

2.3. Training and validation groups

Fish were separated into two subsets: a training set used for model calibration and a test set for model validation. The dataset was composed of 171 fish, of which 94 were females and 77 were males. After fish were photographed, they were killed with an overdose of MS222 (3-aminobenzoic acid ethyl ester) then sex was determined through examination of the gonads, by dissection of fish. In mature *G. aculeatus*, testes are small, opaque, black and club-shaped. Ovaries are bigger than testes. They are opaque, pale and the oocytes are visible. This method is robust to separate between males and females, with no expected error.

Study complied with protocols approved by the appropriate institutional animal care committee and adhered to the legal requirements of France.

The training set was constructed with a balanced sex ratio (50–50) by randomly selecting 51 males and 51 females among the 77 males and the 94 females in the whole dataset. This decision was taken to be sure that the determination of coefficients was not biased in favor of females or males. The remaining 26 males and 43 females formed the test set, because balanced sex-ratio was not required for validation. Prior to analysis, the distances of interest were scaled by the standard length (L_S) of the fish to remove the confounding influence of size on head morphological variables (lower case letters represent the distances scaled by the standard length, and upper case letters represent raw distances).

2.4. Linear model

The difference between males and females was modeled with linear discriminant analysis, which has two main goals: discrimination and classification. (i) Discrimination consists of using the information in a training set of labeled observations to construct a classifier that will separate the predefined classes as much as possible. (ii) Classification uses the score to predict the class of that observation on a given a set of measurements on a new unlabelled observation [26]. A score is a linear combination of the input variables called the linear discriminant function. This function is defined by:

$$W_x = \sum_{i=1}^{n} \gamma_i \times L_{x,i} \quad (1)$$

where W_x is the score of the subject x, the $L_{x,i}$'s are the values of the discriminant variables for subject x and the γ_i's are fitted coefficients (discriminant weights) relative to our environmental conditions [27]. Note that in other conditions than those of the present study, the values of the coefficients should be recalculated to use our method. The score used to predict the sex of the fish ($W_{c,x}$) is centered on zero by subtracting the mean of the score of all subjects composing the training set ($\overline{W}$):

$$W_{c,x} = W_x - \overline{W} \quad (2)$$

To rank the weight of the ten distances in discriminant analysis, they were standardized (mean = 0; variance = 1). As the standardized variables have the same range of variation, the absolute value of the fitted coefficients (discriminant weights) could be compared and ranked.

The coefficients are estimated with the training set to define a linear discriminant function such that the means of the groups are as large as possible, while the variance around these means

Please cite this article in press as: G. de Kermoysan et al., A non-invasive method based on head morphology to sex mature three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) in rearing conditions, Math. Biosci. (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.mbs.2013.05.001

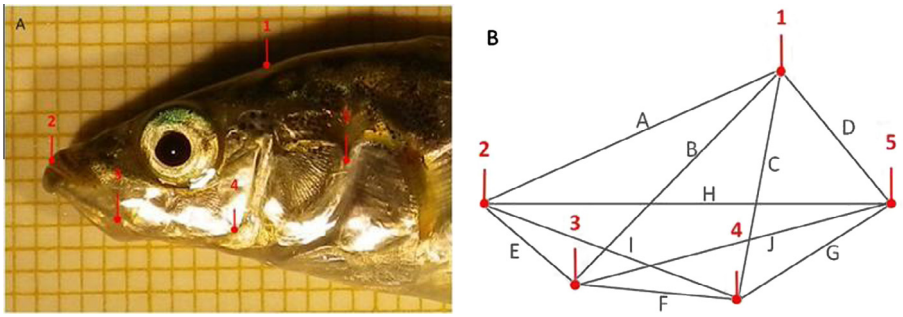

Fig. 1. Landmarks (A) and variables (B) used to describe the head morphology of three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. Numbers denote the landmarks and upper case letters denote the raw variables.

within the groups is as small as possible. Linear discriminant analysis was performed using R software [28] with the function "lda" in package "MASS" [29].

Instead of using a nominal value to discriminate between males (positive values) and females (negative values), an interval of uncertain sexing from $UF_{\max}$ to $UF_{\min}$ (UF for undetermined fish) was defined. This interval represents the overlap in score distribution of the two groups (e.g. female and male) which exists because perfect discrimination between the two groups cannot be attained with linear discriminant analysis. Hence, the interval is defined as:

$$UF_{\max} = \mu_{W_{c,F}} + U_{(1-\alpha/2)} \times \sigma^2_{W_{c,F}} \quad (3)$$

$$UF_{\min} = \mu_{W_{c,M}} + U_{(1-\alpha/2} \times \sigma^2_{W_{c,M}} \quad (4)$$

$\mu_{W_{c,F}}$ is the mean of the centered scores of females, $\mu_{W_{c,M}}$ is the mean of centered scores of males, U is $1-\alpha/2$ percentile of the normal standard distribution, and σ^2 is the variance of the scores and α is the confidence level. In this analysis, priority was given to classifying fish as undetermined rather than as false positive or false negative.

The centered score of each individual was then compared to $UF_{\max}$ and $UF_{\min}$ to assign the sex of fish from the linear discriminant function [27].

Based on the fitted coefficients, backward selection of the variables to be included in the model was used to determine the best ratio between the number of distances taken into account in the model and the number of errors performed to a given α-value. Variables were removed stepwise from the model: starting from the model with ten variables, the variable with the lowest weight was removed from the model and the number of incorrect predictions was compared with and without this variable. If the model performance was not degraded (i.e. performances were the same), the next variable with the lowest weight was removed from the model, until the performance of the model was degraded.

To validate the model, predictions were compared to the observed sex determined by gonad examination to form two groups of predictions: the correctly-classified and the wrongly-classified among the fish that were sexed (i.e. fish with a score outside the UF interval).

2.5. Robustness of the model

To evaluate the impact of the training set selection and to estimate the percentage of fish that can be sexed and the percentage of fish correctly sexed among the fish that potentially could be sexed by the model, training and test sets were resampled 10,000 times. Random sampling with replacement was used and the two sets (training set and test set) were assembled in agreement with the characteristics defined in section Training and validation groups.

At the end of calibration and validation, a final model was built on the whole dataset (training + test set; $n = 154$ fish) maintaining an equal sex ratio (i.e. random exclusion of 17 females). This final training set was resampled 10,000 times.

3. Results

Table 1 shows the weight of each standardized distance obtained by discriminant analysis. The model was built with the five best predictors of the sex of *G. aculeatus* i.e. the distances with the highest weight in absolute value on the linear discriminant index. These were distances *a, b, e, i* and *j* (Table 1).

The standardized score for the individual x ($W_{c,x}$) was thus calculated as follows:

$$W_{c,x} = \gamma_a \times a_x + \gamma_b \times b_x + \gamma_e \times e_x + \gamma_i \times i_x + \gamma_j \times j_x + \overline{W} \quad (5)$$

$\overline{W}$ is the mean score of all subjects composing the training set, a_x, b_x, e_x, i_x and j_x are the distance for the individual x and γ_a, γ_b, γ_e, γ_i and γ_{jo} are the coefficients of each distance. Their values are given in Table 2.

The 10,000 resamples of training and test sets showed that the choice of the α-value is a balance between percentage of fish that can be sexed and percentage of fish correctly sexed. When α-value increased, the model sexed more fish but made more incorrect predictions (Fig. 2): the number of incorrect predictions increased with the number of predictions. For example, for an α-value of 1% ($UF_{\min} = -1.586$; $UF_{\max} = 1.826$), the sex of 53.1 ± 4.9% of fish (mean ± s.d.) was defined and 98.6 ± 1.8% (mean ± s.d.) of the predictions were correct (Fig. 2). In contrast, for an α-value of 10% ($UF_{\min} = -0.198$; $UF_{\max} = 0.326$), fish were sexed by the method represented 89.6 ± 3.0% (mean ± s.d.) of the validation set, but only 94.5 ± 2.8% (mean ± s.d.) of predictions were correct. In this study, the best compromise was considered to be an α-value of 4%

Table 1
Expression of the weights of the 10 distances (*a–j*) in the model (Eq. (2)). Weights are the coefficients relative to each distance in the linear discriminant function on standardized data. Each distance had been ranked according to the absolute value of the weight.

Distances	Weight	Rank
a	−325	4
b	481	2
c	−190	9
d	51	10
e	−280	5
f	−265	6
g	211	7
h	204	8
i	693	1
j	−430	3

Please cite this article in press as: G. de Kermoysan et al., A non-invasive method based on head morphology to sex mature three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) in rearing conditions, Math. Biosci. (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.mbs.2013.05.001

Table 2
Coefficients (γ_a–γ_j) of the linear discriminant function with the five main parameters. Mean and confidence interval (lower and upper bound) at 95% determined after 10,000 resamples.

Parameters	Mean [confidence interval 95%]
γ_a	19.34 [−12.43; 51.11]
γ_b	2.00 [−36.61; 40.62]
γ_e	71.56 [47.19; 95.93]
γ_i	37.08 [15.97; 58.18]
γ_j	43.06 [21.44; 64.69]
$\overline{W}$	28.01 [24.75; 31.27]

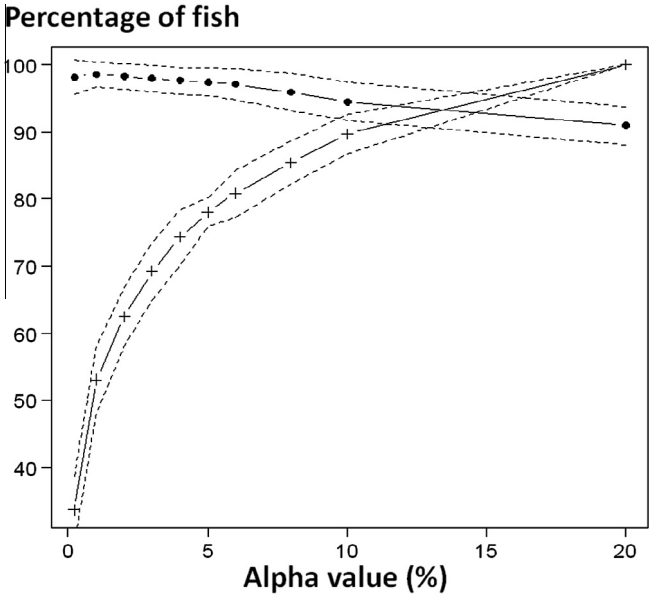

Fig. 2. Model performance expressed as the percentage of fish that can be sexed (cross) and fish correctly sexed (point) according to the α-value. Lines represent the mean percentage of the 10,000 resamples of the training and test sets. Dotted lines represent the mean ± standard deviation.

($UF_{min} = -0.591$; $UF_{max} = 0.751$), because over 70% of fish can be sexed, with under 3% of errors on average.

Once the model was validated, the training and the test sets were pooled to build a final model. The final score used to predict sex was calculated as follows:

$$W_{c,x} = 18.39 \times a_x + 3.22 \times b_x + 70.73 \times e_x + 37.31 \times i_x + 42.48 \times j_x - 28.16 \quad (6)$$

a, b, e, i, and *j* are the distances measured on individual *x*. Coefficients are averages on 10,000 runs. Scores of the UF_{max} and UF_{min} are presented in Table 3. ($\alpha = 4\%$; Fish can be sexed = 68.9%; $n = 154$ fish).

Table 3
Scores of bounds *UF* (UF_{min} and UF_{max}) among the α-value, estimate by the discriminant function for the final model (Eq. (6)). ($\mu_{W_{c,M}} = -\mu_{W_{c,F}} = 1.31$; $\sigma^2_{W_{c,F}} = 1.04$; $\sigma^2_{W_{c,M}} = 0.962$).

α-value	Score of UF_{min}	Score of UF_{max}
0.2	−1.654	1.894
1	−1.160	1.360
2	−0.920	1.101
3	−0.770	0.939
4	−0.658	0.818
5	−0.568	0.721
6	−0.492	0.639
8	−0.367	0.504
10	−0.266	0.394
20	0.017	0.083

4. Discussion

A model was developed and validated to discriminate between mature females and males based on the sexual dimorphism in head morphology of *G. aculeatus,* previously described by Kitano et al. [24] and by Aguirre and Akinpelu [13]. The model is appropriated for sticklebacks reared in plastic opaque tanks out of breeding seasons.

Based on head morphology, a discriminant linear analysis was used to calibrate and to validate a model for sexing *G. aculeatus.* The approach provides the potential to balance between the proportion of incorrect predictions and the proportion of undetermined fish. There is always a percentage of fish whose sex remains undetermined using the method. The undetermined fish are not different for the others regarding either sex or standard length. Other phenotypically-based methods also exclude some fish (i.e. non dominant males are not recognized as males in methods based on secondary sexual characters).

The most reliable methods are genetic. The method based on morphology, it is less reliable, in particular, for immature fish which can be sexed by genetic method [30]. But the model based on head morphology presents others advantages compared to genetic method. Among these advantages, the rapidity of the method is important. By the genetic method, the sex of the individual is given the next day [30], compared with the few minutes for model based on head morphology. Another advantage of the method based on head morphology is that it is inexpensive and doesn't need lot of equipment (only camera), compared with the genetic method. Genetic method, more expensive, requires primers, bands, chemicals, machine and all the equipment and solutions of genetic laboratory. The method based on head morphology is easy to reproduce. The most important step is the position of the points on the picture and this step is repeatable. Repeatability was estimated by calculating the coefficients of variation (CV) relative to the ten distances defined on six different pictures, for the same fish. The protocol was performed on two fish. The mean of the *CV*s was less than 5% for all ten distances for each fish.

The method based on head morphology has other advantages. This method is not invasive and the fish are only stressed by the few seconds out of water when they are photographed. All fish used in this study were photographed and after 15 days, no deaths had been recorded. However, attention should be given to limit the time the fish spend out of water. Contrary to other studies (e.g. [24,25,31]), fish sexing was not done before the breeding period. The method thus makes it possible to sex *G. aculeatus* before the reproduction period. The fish that have been sexed and have a size over 34 mm will be mature during the next breeding period. The method has been tested during the breeding period and is concordant with sex determined based on the secondary sexual characters (data not shown).

The method was developed to be simpler and faster than those currently available, and in the same time, with a good representation of the head morphology. Hence, to reduce the time necessary to sex a fish, the number of distances measured on the photography should be minimized. As an alternative method of adjusting for body size, an allometric relationship was tested by using a log–log relationship between the head length and standard length and using the regression residuals. With α-value of 4%, results were worst. Only 57.7% of fish could be sexed (against 67.3% with LDA; same sample; $n = 52$ fish).

Backward selection of the variable was used to determine the best ratio between the number of distances measured and the

Please cite this article in press as: G. de Kermoysan et al., A non-invasive method based on head morphology to sex mature three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) in rearing conditions, Math. Biosci. (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.mbs.2013.05.001

number of errors performed to a given α-value (equal to 4% here). The association of photographic analysis as a tool with linear discriminant analysis as statistical method allows a good accuracy of sex prediction for a model based on the five main variables (mean number of errors equal to 2.0% in the training set on 10,000 samples). A model based on four variables, which had the highest weight led to a higher number of errors (mean number of errors equal to 4.6% in the training set on 10,000 samples). All models based on more than five variables decrease slightly either the number of errors or the number of non-sexed fish (*UF* interval).

Model calibration was performed on a training set of 102 fish with a balanced sex ratio. To limit the statistical weight of abnormal fish in the model during the parameter estimation and according to Babyak [32] a minimum of seven fish for each model parameter should be integrated in the model. Moreover, robust parameter estimation in the linear discriminant analysis requires equal proportions of the two groups discriminated [33]. These two criteria were fulfilled by the training set as ten distances were measured on each of the 102 fish and the sex ratio was balanced.

Size and shape are two components of form or morphology [34]. In *G. aculeatus*, head morphology can be influenced by environment, such as diet [35] or habitat type [24,31,34,36]. In other species, variation in body size and shape is also known to be influenced by sex [37–39] and environment [40,41]. The conditions of rearing were standard for *G. aculeatus*: plastic opaque tank, fish fed ad libitum [6,9,24,25] with frozen *Chironomidae* [6,9,24,25,39] and renewed water [6,9,24,25]. These conditions allow the use of this model with the parameter estimates defined in Eq. (6) and the score of the bounds in Table 3. In other conditions, (e.g. fish in natural population) as the magnitude of the sexual dimorphism differs among populations, the parameter estimation in the model should be redone. However, the model could be re-adjusted quickly. The R code of the estimation procedure can be asked to the corresponding author.

In the future, the focus will be directed at immature fish, which were not used in the method presented because gonads are not always observable. To conclude, this study confirms observations made by other authors that show a sexual dimorphism in head morphology for sexes for *G. aculeatus*. On the basis of a description of head morphology, a model was developed to discriminate between mature males and females. The balance between proportion of incorrect predictions and the proportion of fish not defined by the method can be selected according to the needs of users.

Acknowledgments

The author acknowledges the support of the French Ministry in charge of Ecology and Sustainable Development for this study, within the framework of Programme 190. We thank M. Palos-Ladeiro, R. Santos and C. Turies for their excellent technical assistance. The authors wish to thank C. Brochot, E. Mombelli and C. Tebby, so as two anonymous reviewers for their valuable comments on the manuscript.

References

[1] R.J. Wootton, The Biology of the Sticklebacks, Academic Press, London and New York, 1976. 387p. ISBN 0127636501.
[2] R.J. Wootton, Functional biology of Sticklebacks, London, Springer, US, 1984. ISBN: 978-1-4615-8515-2.
[3] A.M. Bell, S.A. Foster, The Evolutionary Biology of the Threespine Stickleback, Oxford University Press on Demand, 1994. 584p.
[4] S. Östlund-Nilsson, I. Mayer, F.A. Huntingford, Biology of the Three-Spined Stikleback, CRC Press, 2007.
[5] K. Hopkins, B. Moss, A. Gill, Increased ambient temperature alters the parental care behaviour and reproductive success of the three-spined stickleback (Gasterosteus aculeatus), Environmental Biology of Fishes 90 (2011) 121.
[6] T.G. Pottinger, T.R. Carrick, W.E. Yeomans, The three-spined stickleback as an environmental sentinel: effects of stressors on whole-body physiological indices, Journal of Fish Biology 61 (2002) 207.
[7] W. Sanchez, S. Aït-Aïssa, O. Palluel, J.-M. Ditche, J.-M. Porcher, Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (Gasterosteus aculeatus L.) sampled in contaminated streams, Ecotoxicology 16 (2007) 279.
[8] I. Katsiadaki, A.P. Scott, I. Mayer, The potential of the three-spined stickleback (Gasterosteus aculeatus L.) as a combined biomarker for oestrogens and androgens in European waters, Marine Environmental Research 54 (2002) 725.
[9] A.M. Bell, An endocrine disrupter increases growth and risky behavior in threespined stickleback (Gasterosteus aculeatus), Hormones and Behavior 45 (2004) 108.
[10] K.A. Kidd, P.J. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchark, R.W. Flick, Collapse of fish population after exposure to a synthetic estrogen, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 104 (2007) 8897.
[11] D. Caldwell, F. Mastrocco, T. Hutchinson, R. Länge, D. Heijerick, C. Janssen, P. Anderson, J. Sumpter, Derivation of an aquatic predicted no-effect concentration for the synthetic hormone, 17α-ethinyl estradiol, Environmental Science and Technology 42 (2008) 7046.
[12] K.E. Arnold, A. Adam, K.J. Orr, R. Griffiths, I. Barber, Sex-specific survival and parasitism in three-spined sticklebacks: seasonal patterns revealed by molecular analysis, Journal of Fish Biology 63 (2003) 1046.
[13] W.E. Aguirre, O. Akinpelu, Sexual dimorphism of head morphology in three-spined stickleback Gasterosteus aculeatus, Journal of Fish biology 77 (2010) 802.
[14] M. Sebire, Y. Allen, P. Bersuder, I. Katsiadaki, The model anti-androgen flutamide suppresses the expression of typical male stickleback reproductive behaviour, Aquatic Toxicology 90 (2008) 37.
[15] W.J. Rowland, The effects of body size, aggression and nuptial coloration on competition for territories in male threespine sticklebacks, Gasterosteus aculeatus, Animal Behaviour 37 (1989) 282.
[16] B. Charlesworth, Sex determination: primitive Y chromosomes in fish, Current Biology 14 (2004) R745.
[17] C.L. Peichel, J.A. Ross, C.K. Matson, M. Dickson, J. Grimwood, J. Schmutz, R.M. Myers, S. Mori, D. Schluter, D.M. Kingsley, The master sex-determination locus in threespine sticklebacks is on a nascent Y chromosome, Current Biology 14 (2004) 1416.
[18] J.A. Ross, J.R. Urton, J. Boland, M.D. Shapiro, C.L. Peichel, Turnover of sex chromosomes in the stickleback fishes (Gasterosteidae), PLoS Genetics 5 (2009).
[19] M. Slatkin, Ecological causes of sexual size dimorphism, Evolution 38 (1984) 622.
[20] M. Pyron, Sexual size dimorphism and phylogeny in North American minnows, Biological Journal of the Linnean Society 57 (1996) 327.
[21] J. Wang, C. Lin, Y. Chang, M. Nagurka, C. Yen, C. Yeh, Gender determination using fingertip features, Internet Journal of Medical Update 3 (2) (2008) 22–28.
[22] G. Shakhnarovich, P.A. Viola, B. Moghaddam, A Unified Learning Framework for Real Time Face Detection and Classification, in: Proceedings of the International Conference on Automatic Face and Gesture Recognition, 2002.
[23] A. Bisazza, N. Novarini, A. Pilastro, Male body size and male–male competition: interspecific variation in poeciliid fishes, Italian Journal of Zoology 63 (1996) 365.
[24] J. Kitano, S. Mori, C.L. Peichel, Sexual dimorphism in the external morphology of the threespine stickleback (Gasterosteus aculeatus), Copeia 2007 (2007) 336.
[25] T.C.M. Bakker, B. Mundwiler, Pectoral fin size in a fish species with paternal care: a condition-dependent sexual trait revealing infection status, Freshwater Biology 41 (1999) 543.
[26] A.J. Izenman, Modern Multivariate Statistical Techniques: Regression, Classification, and Manifold Learning, Hardcover, New York, 2008.
[27] D. Livingstone, Supervised learning, in: Data Analysis for Chemists, O.S. Publications, Oxford, 1995, p. 239.
[28] R Development Core Team (Ed.), R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2011.
[29] W.N. Venables, B.D. Ripley, Modern Applied Statistics with S, New-York, 2002.
[30] R. Griffiths, K.L. Orr, A. Adam, I. Barber, DNA sex identification in the three-spined stickleback, Journal of Fish Biology 57 (2000) 1331.
[31] T. Leinonen, J.M. Cano, J. Merila, Genetics of body shape and armour variation in threespine sticklebacks, Journal of Evolutionary Biology 24 (2011) 206.
[32] M.A. Babyak, What you see may not be what you get: a brief, nontechnical introduction to overfitting in regression-type models, Psychosomatic Medicine 66 (2004) 411.
[33] P. Sanchez, The unequal group size problem in discriminant analysis, Journal of the Academy of Marketing Science 2 (1974) 629.
[34] J.A. Walker, Ecological morphology of lacustrine threespine stickleback Gasterosteus aculeatus L. (Gasterosteidae) body shape, Biological Journal of the Linnean Society 61 (1997) 3–50.
[35] M.V. Garduño-Paz, S. Coudrec, C.E. Adams, Habitat complexity modulates phenotype expression through developmental plasticity in the threespine stickleback, Biological Journal of the Linnean Society 100 (2010) 407.
[36] W.E. Aguirre, K.E. Ellis, M. Kusenda, M.A. Bell, Phenotypic variation and sexual dimorphism in anadromous threespine stickleback: implications for

postglacial adaptive radiation, Biological Journal of the Linnean Society 95 (2008) 465.
[37] K.A. Young, Life-history variation and allometry for sexual size dimorphism in Pacific salmon and trout, Proceedings of the Royal Society B 272 (2005) 167.
[38] A.P. Hendry, M.L. Kelly, M.T. Kinnison, D.N. Reznick, Parallel evolution of the sexes? Effects of predation and habitat features on the size and shape of wild guppies, Journal of Evolutionary Biology 19 (2006) 741.
[39] R. Beaudouin, V. Ginot, G. Monod, Growth characteristics of eastern mosquitofish Gambusia holbrooki in a northern habitat (Brittany, France), Journal of Fish Biology 73 (2008) 2468.
[40] M.J. West-Eberhard, Phenotypic plasticity and the origins of diversity, Annual Review of Ecology and Systematics 20 (1989) 249.
[41] R.B. Langerhans, C.A. Layman, T.J. DeWitt, Male genital size reflects a tradeoff between attracting mates and avoiding predators in two live-bearing fish species, Proceedings of the National Academy of Sciences 102 (2005) 7618.

Please cite this article in press as: G. de Kermoysan et al., A non-invasive method based on head morphology to sex mature three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) in rearing conditions, Math. Biosci. (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.mbs.2013.05.001

F Quantité d'éthanol injecté dans les canaux

Une solution mère de 40 g/L de BPA a été préparée (solution de BPA à 99%, dans de l'éthanol à 95%) contenant 950 mL/L d'éthanol. Afin de réaliser une solution fille à 5 mg/L de BPA, 10 mL de cette solution mère est introduite dans des cuves de 400 L d'eau. Dans la solution fille, il y a donc 23,75 μL/L d'éthanol (9.5mL / 400L).
Ensuite, les différents canaux reçoivent cette solution dans les bacs d'agitations avec des débits de :

- 0,24 L/h pour les traitements exposés à la concentration de 1 μg/L de BPA
- 1,8 L/h pour les traitements exposés à la concentration de 10 μg/L de BPA
- 15,6 L/h pour les traitements exposés à la concentration de 100 μg/L de BPA

Le volume injecté dans les cuves de mélanges est donc de :

- $23{,}75\times10^{-6} \times 0{,}24 = 5{,}7$ μL/h pour les traitements exposés à la concentration de 1 μg/L de BPA
- $23{,}75\times10^{-6} \times 1{,}8 = 42{,}75$ μL/h pour les traitements exposés à la concentration de 10 μg/L de BPA
- $23{,}75\times10^{-6} \times 15{,}6 = 370{,}5$ μL/h pour les traitements exposés à la concentration de 100 μg/L de BPA

Le débit de chaque canal est de 800 L/h. Le volume d'éthanol dans chaque canal est donc de :

- $\frac{Z}{800-0{,}24} = 7.12 \times10^{-3}$ μL/h pour les traitements exposés à la concentration de 1 μg/L de BPA
- $\frac{Z}{800-1{,}8} = 5{,}36 \times10^{-2}$ μL/h pour les traitements exposés à la concentration de 10 μg/L de BPA
- $\frac{Z}{800-15{,}6} = 0{,}472$ μL/h pour les traitements exposés à la concentration de 100 μg/L de BPA

G Article 2

L'article présenté ci-après présente les effets du bisphénol A sur trois niveaux trophiques (macrophytes, macro-invertébrés et poissons) exposés dans des mésocosmes lotiques. Le papier est publié dans le journal *Aquatic toxicology*.

Auteurs :

G. de Kermoysan, S. Joachim, P. Baudoin, M. Lonjaret, C. Tebby, F. Lesaulnier, F. Lestremeau, C. Chatellier, Z. Akrour, E. Pheron, J-M. Porcher, A. R.R. Péry et R. Beaudouin.

Résumé :

Le bisphénol A est fréquemment utilisé par les industriels et se retrouve dans les écosystèmes aquatiques. Les informations relatives à l'écotoxicité est disponible dans des conditions contrôlées pour les macro-invertébrés et les poissons, mais il y a un manque pour les macrophytes. De plus, les effets du BPA en conditions ecosystémiques (*i.e.* populations étudiées pendant une longue période dans des conditions environnementales), n'ont jamais été testés. Nous avons réalisé une exposition en continue de 166 jours dans des mésocosmes lotiques, dans des canaux de 20 m de long et avec un scénario d'exposition réaliste au niveau environnemental (Concentrations nominales de 1, 10 et 100 μg/L de BPA). Trois niveaux trophiques ont été suivis : les macrophytes, les macro-invertébrés et les poissons. Des effets significatifs ont été observés à 100 μg/L de BPA dans les trois niveaux trophiques. Le BPA a des effets indirects sur la structure de la communauté de macrophytes, des effets directs et indirects sur la structure des population de macro-invertébrés et des poissons. La morphologie des gonades est affectée dès 1 et 10 μg/L de BPA, respectivement pour les femelles et pour les mâles. Enfin, nos résultats suggèrent que les poissons sont de bons intégrateurs de la réponse des autres communautés dans les systèmes de mésocosmes

L'étude a également été présentée aux parlemantaires de L'Office Parlementaire d'Évaluation des Choix Scientifiques et Technologiques (OPECST), par deux communications affichées à la Setac *2013 et une communication orale à la* Sefa *2013.*

Aquatic Toxicology 144–145 (2013) 186–198

Contents lists available at ScienceDirect

Aquatic Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquatox

Effects of bisphenol A on different trophic levels in a lotic experimental ecosystem

Goulwen de Kermoysan[a], Sandrine Joachim[b], Patrick Baudoin[b], Matthieu Lonjaret[a], Cleo Tebby[a], François Lesaulnier[b], François Lestremau[c], Claudine Chatellier[c], Zhira Akrour[a], Edlyn Pheron[a], Jean-Marc Porcher[b], Alexandre R.R. Péry[a], Rémy Beaudouin[a,*]

[a] Unité METO (Modèles pour l'Ecotoxicologie et la Toxicologie), INERIS, Parc Technologique Alata, BP2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France
[b] Unité ECOT (Ecotoxicologie in vitro et in vivo), INERIS, Parc Technologique Alata, BP2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France
[c] Unité NOVA (Innovation pour la mesure), INERIS, Parc Technologique Alata, BP2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 9 April 2013
Received in revised form
19 September 2013
Accepted 30 September 2013

Keywords:
Mesocosm
Macrophyte
Macro-invertebrate
Fish
Gasterosteus aculeatus
Bisphenol A

ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) is commonly used by manufacturers and can be found in many aquatic ecosystems. Data relative to BPA ecotoxicity are only available for studies in laboratory conditions on macro-invertebrates and fish. There is thus a lack of information for other trophic levels such as macrophytes. Moreover, the impacts of BPA within an ecosystem context, *i.e.* with populations from different trophic levels studied at long term in environmental conditions, have never been assessed. We carried out a long-term lotic mesocosm study in 20 m long channels under three exposure concentrations of BPA (nominal concentrations of 0, 1, 10 and 100 μg/L) delivered continuously for 165 days. Three trophic levels were followed: macrophytes, macro-invertebrates (with a focus on *Radix balthica*) and fish (*Gasterosteus aculeatus*). Significant effects were shown at 100 μg/L BPA on the three trophic levels. BPA had a direct impact on macrophyte community structure, direct and indirect impacts on macro-invertebrates and on fish population structure. Gonad morphology of fish was affected at 1 and 10 μg/L of BPA, respectively for female and male sticklebacks. In addition to these ecotoxicity data, our results suggest that fish are good integrators of the responses of other communities (including macro-invertebrates and macrophytes) in mesocosm systems.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Most of the domestically produced bisphenol A (BPA; 4,4′-dihydroxy-2,2-diphénylpropane) is used by manufacturers as an intermediate in the production of polycarbonate and epoxy resins, flame retardants, and other specialty products. Final products include adhesives, protective coatings, powder paints, automotive lenses, protective window glazing, building materials, compact disks, optical lenses, thermal paper, paper coatings, as a developer in dyes, and products designed for encapsulation of electrical and electronic parts (Staples et al., 1998). Due to its endocrine disrupting properties, the use of BPA is now restricted and more particularly banned in baby bottles in the European Union (European Council, 2011). Moreover, in France, in 2013, BPA is planned to be banned in all containers used for children under 3.

In 2006, the global BPA production volume in Western Europe was estimated at 1.150×10^3 tonnes/year (European Union, 2008). In 1993, around 0.017% of the produced BPA was released to air, surface water or wastewater treatment plants. An additional 0.085% was recycled, landfilled or incinerated (Staples et al., 1998). Although BPA degrades rapidly in the environment (aquatic half-lives from 0.5 to 6 days), as demonstrated in both standard biodegradation tests and in environmentally relevant river die-away studies (Klečka et al., 2001; West et al., 2001), exposure to low concentrations of BPA occurs in aquatic systems primarily from discharges into wastewater treatment plants during its manufacturing and use (Cousins et al., 2002; Staples et al., 1998). BPA was found in North American and European freshwaters (Klečka et al., 2009). In the River Elbe in Germany, BPA was measured at 0.105 ± 0.204 μg/L (Heemken et al., 2001). In Dutch surface waters, BPA was measured at levels up to 0.33 μg/L, with one occasional observation of 21 μg/L (Belfroid et al., 2002). This latter value substantially exceeds the predicted environmental concentration of 0.12 μg/L for water as indicated in the EU's risk assessment report for BPA (European Union, 2003). BPA was also detected in animal

* Corresponding author. Present address: INERIS, Parc Technologique Alata, BP2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France. Tel.: +33 344 55 82 38; fax: +33 344 55 67 67.
E-mail address: remy.beaudouin@ineris.fr (R. Beaudouin).

0166-445X/$ – see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.09.034

Table 1
Partial review of BPA effects on fish.

Fish species	LOEC (μg/L)	Duration (d)	Endpoint	References
Dicentrarchus labrax	10	15	VTG induction	Flint et al. (2012)
P. promelas	64	164	VTG induction	Mihaich et al. (2012)
P. promelas	160	71	VTG induction	Sohoni et al. (2001) and Staples et al. (2011)
P. promelas	1	164	The percentage of spermatocytes increased	Flint et al. (2012)
Cyprinus carpio	1	15	Modification of the gonad structure in males and increased oocytes atresia	Flint et al. (2012)
Salmo trutta fario	1.75	100	Reduction of sperm quality; delayed ovulation	Flint et al. (2012)
Orizias latipes	10	–	Ova-testis	Metcalfe et al. (2001)
P. promelas	16	164	Proportion of sex cells types in the testis is altered	Mihaich et al. (2012)
P. promelas	160	164	Frequency of spermatocytes decreased	Mihaich et al. (2012)
Danio Rerio	375	–	Gonad histology is modified	Segner et al. (2003)
P. promelas	640	–	Hatchability reduced	Sohoni et al. (2001) and Staples et al. (2011)
P. promelas	1280	–	Eggs production inhibited	Sohoni et al. (2001) and Staples et al. (2011)
O. latipes	2280	–	Decreases the number of eggs and hatchings	Shioda and Wakabayashi (2000)
C. carpio	1	15	Decreased estrogen and androgen ratios	Flint et al. (2012)
P. promelas	640	–	Effects on survival	Mihaich et al. (2012) and Staples et al. (2011)

tissues, in the Rhone River in France. Miège et al. (2012) quantified BPA in 38% of their 32 fish samples of 4 different species, with mean measured concentrations of BPA of 0.137 ± 0.211 μg of BPA/g of dry weight.

Effects of BPA have been studied in many species at different trophic levels. Flint et al. (2012) propose an extensive review. Just a few papers mentioned macrophytes in their studies (European Union, 2003; Mihaich et al., 2009; Oehlmann et al., 2009; Staples et al., 1998). Effects have been assessed on growth of green algae, *Selenastrum capricornutum* (96 h EC_{50} based on cell volume: 3100 μg/L) and macrophytes *Lemna gibba* (NOEC based on growth: 7800 μg/L) (Alexander et al., 1988 and Putt in Staples et al., 2008).

Molluscs (Duft et al., 2003; Flint et al., 2012; Jobling et al., 2004; Schirling et al., 2006), crustaceans (Andersen et al., 1999; Flint et al., 2012; Watts et al., 2001b), insects (Flint et al., 2012; Hoshi et al., 2003; Kohra et al., 2002), cnidarians (Fukuhori et al., 2005; Pascoe et al., 2002), rotifers (European Union, 2008) and amphibians (Levy et al., 2004) appear to be affected by BPA, with biological effects observed at relevant environmental exposures in the low ng/L to μg/L range (Oehlmann et al., 2009). In a review of Flint et al. (2012), the nematode *Caenorhabditis elegans* appears to be one of the most sensitive invertebrate species as an exposure to 10^{-9} M (0.228 μg/L) of BPA during 6 days resulted in a significant increase of the number of germ cells (Hoshi et al., 2003). A reduction of its feeding behaviour was observed after 24 h of exposure to a concentration of 100 nM (228 μg/L) (Kohra et al., 2002). Another sensitive class is gastropods for which a significant decrease of the length of penis and prostate gland of *Nucella lapillus* and an induction of a complex syndrome of alterations in female *Marisa cornuarietis* have been shown at 1 μg/L by Oehlmann et al. (2000). An increase of the embryo production has also been shown for *Potamopyrgus antipodarum* exposed to 5 μg/L (Jobling et al., 2004). In the EU's risk assessment of BPA (European Union, 2003), they did not consider the data by Oehlmann et al. in the derivation of a PNEC in view of the apparent instability of the substance under the exposure conditions used, and the possible overlap with natural changes. However, due to the concern from the apparent sensitivity of snails to BPA, they propose a factor of 10 to derive a "conservative" PNEC and ask for further studies on snails.

The effects of BPA on fish were also reviewed (Table 1). To sum up this review, BPA has effects on the structure and composition of gonads at 1 μg/L, VTG was induced at 10 μg/L and egg production and hatchability were affected at 640 μg/L.

Considering the available literature data, there appears to be a clear lack of information for some biological compartments of aquatic ecosystems, especially macrophytes. Moreover, the impacts of BPA in an ecosystemic context, *i.e.* with populations from different trophic levels studied at long term in environmental conditions, have never been assessed. Long term studies encompassing a larger portion of the life cycle of the species exposed is expected to provide much more relevant data for ecological risk assessment than laboratory studies (Forbes et al., 2011).

In the work we present here, we studied the long term effects of BPA in aquatic mesocosms. Mesocosms provide the opportunity to simultaneously identify direct and indirect effects of toxicants and to investigate responses at many levels of biological organization in fairly controlled conditions of exposure (Caquet et al., 2000). As ecotoxicological information on the effects of BPA on macrophytes is scarce and considering that submersed macrophytes have major effects on productivity and biogeochemical cycles in freshwaters and as these aquatic plants occupy key interfaces in ecosystems (Carpenter and Lodge, 1986), part of the focus in our study was on this community. We also focused on macro-invertebrates based on their expected sensitivity to BPA, and more particularly on the gastropod *Radix balthica* which is probably the most common freshwater snail in Europe (reviewed by Islam et al., 2001). Finally, we followed the only fish species in our system, *Gasterosteus aculeatus*, as it is the top-species in our mesocosms. The stickleback is a convenient species for mesocosms studies (Roussel et al., 2007a,b). In addition, this fish species offers a potential for the assessment of endocrine disruption (Bernhardt et al., 2006; Björkblom et al., 2007; Brian et al., 2006; Jolly et al., 2009; Katsiadaki et al., 2002) and no study on this species has ever been performed to determine the effects of BPA at the population level.

2. Materials and methods

2.1. Mesocosm experiment

2.1.1. Description of the experimental system

The experiment was performed using 12 lotic mesocosms located in the North of France (INERIS, Verneuil-en-Halatte, France, 49.3° N–2.52° E). A detailed description of the mesocosms is provided in Roussel et al. (2007a,b). Each mesocosm is 20 m in length and 1 m in width and is divided into three sections: the upper section (0–9 m), the slope (9–10 m) and the lower section (11–20 m). Prior to the layout of the sediments, each mesocosm was lined with an inert high density polyethylene film (thickness of 0.2 mm). In order to reduce experimental inter-mesocosm variability, artificial fine grain sediments were then placed in the upper and lower

sections. The sediments were composed of 80% of sand and 20% of clay. The height of the sediment layer was 5 cm and 10 cm for, respectively, the upper and the lower sections. According to Mori (1993, 1994), these sediment characteristics are appropriate to *G. aculeatus*' reproduction. Coarse grain sediments composed of rocks of 10–20 cm in diameter were arranged on the slope. Each mesocosm received denitrified and dechlorinated tap water at a flow rate of 800 L/h. The water depths of the upper and lower sections were, respectively, 0.25 m and 0.7 m. In each mesocosm, mixing tanks were placed in the inlet in order to oxygenate the water and to homogenize the BPA concentration. A 0.25 mm mesh was placed at the outlet of the mesocosms to avoid any drift of macroinvertebrates and fish.

2.1.2. Biological composition of the mesocosms

From October 2011 to March 2012, each mesocosm was set up with macrophytes, zooplankton, benthic and pelagic invertebrates, and the fish species, *G. aculeatus*. The species were selected according to their trophic level, their structural and functional relevance in aquatic ecosystems and their sensitivity to BPA.

Macrophytes and periphyton provide habitat for numerous organisms, contribute to macro- and micronutrient recycling and influence physico-chemical conditions (OECD, 2006). In October 2011, a total of 4.7 kg of watercress *Nasturtium officinale* per mesocosm, separated in 39 equal parts were planted regularly into the sediment. Ten parts were planted into two plant pots which contained organic compost and deposited onto the sediment in the upper section of each mesocosm at 2 and 4 m from the inlet of the water. In November 2011, a total of 2.4 kg per mesocosm of water starwort, *Callitriche platycarpa*, separated in 32 equal parts were distributed in each mesocosm. Three plant pots with organic compost receiving 4 parts were deposited onto the sediment at 11, 14 and 18 m from the inlet of the mesocosm and around each plant pots, four parts were also planted. Eight parts were planted between 16 and 17 m from the inlet of the mesocosm directly into the sediment. In November 2011, Eurasian water-milfoil *Myriophyllum spicatum* was planted in two plant pots which contained organic compost (2.5 kg per mesocosm) and deposited onto the sediment in the lower section of each mesocosm at 12 and 15 m from the inlet of water. In order to remove indigenous fish and fish eggs, all the macrophytes were carefully rinsed before being introduced in the different mesocosms.

Because of their abundance and their position in the aquatic food chain, invertebrates play a critical role in the natural flow of energy and nutrients (Tachet et al., 2000), in particular from plant to fish. As artificial sediments were introduced in each mesocosm and in order to obtain an ecologically functioning aquatic ecosystem, a manual introduction of the following organisms was performed. In November 2011, zooplankton and periphyton were introduced in each mesocosm by sieving with a mesh of 50 μm, 36 L of water collected from an unpolluted artificial pond located next to the mesocosm platform. In addition, herbivous shedder, *Gammarus pulex* was introduced into each mesocosm (80 g, *i.e.* 2500–3000 individuals per mesocosm). In December 2011, the shedders composed of 200 individuals of *Asellus aquaticus* were introduced into each mesocosm. At the same time, the gastropods *P. antipodorum*, *P. planorbis* and *R. balthica* were introduced into each mesocosm. The abundance of these three species per mesocosm was 200, 17 and 50, respectively. Finally, invertebrate predators were released into each mesocosm during the same month. Each mesocosm received 8 Notonecta, 6 *Glossiphonia complanata* and 4 *Erpobdella octoculata*. Other invertebrates, such as larvae of *Chironomidae*, naturally colonized each mesocosm from ponds located next to the mesocosms. The mesocosms were then left to settle until March 2012.

The three-spined stickleback *G. aculeatus* is a small-bodied teleost fish, which constitutes a major component of shallow water food webs in the northern hemisphere (Wootton, 1976). The fish used came from populations located in the vicinity of the mesocosms. Fish under 25 mm long were caught in October 2011 (less than one year old at the beginning of experiment) and reared in the same conditions until the beginning of the experiment: rearing in opaque plastic tanks, water renewed (1 L/h) and food (frozen *Chironomidae*) supplied *ad libitum* every day (a visual check was made to ensure that some food remained before they were fed again).

On March 5th 2012, initial populations, composed of 15 mature females and 10 mature males, were introduced in each mesocosm. Fish were selected to have similar lengths and their sex was determined according to the method developed by de Kermoysan et al. (2013). Male lengths ranged from 39.66 mm to 51.26 mm (moy ± SD, 44.36 ± 2.50 mm, $n = 120$). Female lengths ranged from 40.00 mm to 48.20 mm (moy ± SD, 42.95 ± 1.40 mm, $n = 180$). Length did not differ significantly between treatments (ANOVA, $p > 0.05$). Founder fish were individually marked with 1.2 mm × 2.7 mm alphanumeric tags (VI Alpha Tags, Northwest Marine Technology, Shaw Island, WA, USA, used by: Andersen et al., 2005; Lynch and Mensinger, 2011) which were implanted under their skin one week before their introduction.

2.1.3. Exposure to bisphenol A

Based on literature data (Flint et al., 2012; Licht et al., 2004; Oehlmann et al., 2000; Staples et al., 2011), three concentrations of BPA were selected: 1, 10 and 100 μg/L. The first concentration (1 μg/L) is likely to occur in the environment and is supposed to cause slight effects on the most sensitive species. The highest exposure concentration is supposed to cause severe effects on different species in our mesocosms (see Section 1). Treatment began on the 15th of April 2012 (day 0) and ended on the 28th of September 2012 (day + 165). Here after, time is expressed in day post beginning of the treatment and abbreviated as "dpt".

Two stock solutions composed of a technical grade of BPA (purity 99%, Sigma–Aldrich, France) in ethanol (purity 99%, Prolabo) at a concentration of 40 g/L were placed onto two separate 500 L tanks which were supplied with tap water (Tanks 1 and 2). In order to obtain a nominal concentration of 5 mg/L of BPA in Tank 1, injection of 10 mL of the stock solution was performed. Peristaltic pumps connected to the Tank 1 and the nine contaminated mesocosms then delivered BPA at the appropriate concentrations. The injection of the two stock solutions, the water levels of the two tanks and the peristaltic pumps were controlled by an automatic system. When the water level of the Tank 1 was half empty, the automatic system commanded the injection of BPA in Tank 2. When Tank 1 was empty, the peristaltic pumps were transferred to Tank 2. This operation was repeated every 8 h to ensure a continuous contamination of the mesocosms. The stock solutions of BPA were renewed every 12 days.

2.2. Physico-chemical and biological measurements

2.2.1. BPA concentration

Water concentrations of BPA in each of the 9 mesocosms were regularly monitored (every month) at different locations (0, 5 and 19 m from the inlet of the water) to measure actual exposure concentrations.

To reduce the analytical steps and therefore prevent contamination, analyses were performed using on line solid phase extraction/liquid chromatography (Alliance, Waters) coupled to triple quadrupole mass spectrometer (MS Acquity TQD; Waters). LiChrospher C8 (25 μm, 25 mm × 4 mm) (Merck) was used as solid phase cartridge (SPE). The analytical column was an X-Bridge C18 (2.5 μm, 2.1 mm × 50 mm) (Waters). Injection loop was of 1.5 mL. However, to increase the sensitivity of the method, a double loading was performed onto the SPE cartridge; therefore 3 mL

of samples were injected. Mobile phase A was water with 2 mM ammonium acetate and mobile phase B methanol with 2 mM of ammonium acetate. Column temperature was set at 40 °C. Other chromatographic conditions were as follows: for the first 2 min corresponding to the sample loading onto the SPE cartridge, the mobile phase was constituted of 100% at a flow rate of 2 mL/min. Then, from 2.1 min to 2.6 min, flow rate was at 0.3 mL/min and a 90/10 A/B mobile phase composition. Linear gradient was applied up to 7.6 min and 10/90 A/B hold until 8.0 min.

BPA was measured in MRM mode using a transition for quantification (m/z 227–212, cone energy 24, collision energy 20) and one for confirmation (m/z 227–133, cone energy 29, collision energy 26). Before injection, to account for matrix effect on both extraction and detection, BPA $^{13}C_{12}$ was added at a concentration of 5 μg/L to all calibration solutions and samples. Detection settings for this substance were MRM transition from m/z 239 to 224 with cone energy 24 and collision energy 26.

Limit of quantification for BPA was established at 0.1 μg/L with the linear range up to 100 μg/L ($r^2 = 0.999$). For each analytical sequence, regular controls were run at the limit of quantification and at mid-calibration concentration to ensure that the analytical performances were maintained.

Uncertainty of measurement was calculated using the results obtained from overall 10 samples (2 spiked samples every time over 5 different monitoring periods). It was estimated at 39% at the limit of quantification (0.1 μg/L), at 17% for the 1 μg/L level, at 14% for the 10 μg/L level and at 9% for the 100 μg/L.

2.2.2. Physico-chemical parameters

Temperature was measured every 10 min using water temperature sensors (HOBO0257, Prosensor, Amanvilliers, France). Two sensors were placed randomly in one mesocosm per treatment at the beginning of the experiment. In each mesocosm, the sensors were arranged at (i) 5 m from the inlet of the water in the middle of the mesocosm and (ii) 15 m from the inlet of the water at a water depth of 70 cm (on the bottom of the mesocosm).

Routine water parameters such as pH, conductivity and dissolved oxygen were measured each week at 10 m from the inlet of the water in each mesocosm by using a WTW multiparameter instrument equipped with digital sensors (MultiLine® IDS, Multi3430, WTW, Germany).

2.2.3. Effects of BPA on macrophytes

The volume score of four macrophytes, *i.e.* watercress (*N. officinale*), various-leaved water starwort (*C. platycarpa*), eurasian water-milfoil (*M. spicatum*), and filamentous green algae (*Spyrogyra* sp.) were estimated every two weeks from the beginning of March to the end of September 2012 (−46 to +165 dpt). To estimate the volume score, each mesocosm was divided into twenty equal sections (1 m × 1 m) and macrophyte volume was assessed visually based on the method proposed by Braun-Blanquet (1921). Coverage was determined by using four surface classes (C). The height of the macrophytes in the water column was assessed with three classes (H_1). Finally, the height of the aerial part of the macrophytes (*i.e.* over the water column) was estimated, when relevant, by using four classes (H_2). Subsequently, for a given mesocosm, the volume score of one macrophyte species (m^3) was the sum of the volume score of each section (twenty sections of 1 m): $\sum_{x=1}^{20} (C_x \times H_{x1} + C_x \times H_{x2})$ where x denotes the section between x and $x+1$ m and C_x or H_x are the median value of the different classes.

2.2.4. Effects of BPA on macro-invertebrates

2.2.4.1. Community response. Macro-invertebrates were sampled every 4 weeks (−47 to +158 dpt) using different types of artificial substrates, *i.e.* tubes and tiles (Rosenberg and Resh, 1982). Each tube substrate was composed of seven tubes strapped together (2 cm wide and 20 cm long). Terracotta tiles were 11 cm long, 16 cm wide and 1.5 cm in thickness.

Ten tubes and ten tiles were placed horizontally on the bottom of each mesocosm. In the upper section, the substrates were arranged, one after the other, starting with tubes (tubes 0.5, 2, 4, 6, 8 m from the inlet of the water; tiles 1, 3, 5, 7, 9 m from the inlet of the water). In the lower section, the same pattern was followed (tubes: 10, 12, 14, 16, 18 m from the inlet of the water; tiles: 11, 13, 15, 17, 19 m from the inlet of the water).

On each sampling date, the artificial substrates were retrieved from each mesocosm using a landing net thus preventing any loss of organisms. The upper and lower sections were sampled separately. Each substrate was then washed and scrubbed clean in a container in order to remove the invertebrates trapped inside. The rinsing water was then passed through a sieve with a mesh size of 50 μm and placed in a plastic dish half-filled with water. Identification and enumeration of macro-invertebrates were carried out immediately before replacing them in each mesocosm. Macro-invertebrates were identified to the lowest practical taxonomic level (genus, except *Chironomidae* which were identified to the family level) based on Tachet et al. (2000). The tiles and tubes were then put back in each mesocosm. In addition to the use of artificial substrates, sampling of macro-invertebrates on the walls of each mesocosm was performed using a landing net along each mesocosm at 1, 7, 13 and 19 m from the inlet of the water. Organisms were scraped off the walls and placed in a plastic dish half-filled with water. Enumeration and identification of macro-invertebrates were carried out as described above. All data for each mesocosm was pooled for further analysis.

2.2.4.2. R. balthica. On each macro-invertebrate sampling date and in addition to the determination of total abundance, more detailed variables were followed on the gastropod *R. balthica*. Population length structure was described by determining the abundance of three length classes: [0–5 mm[, [5–10 mm[and ≥10 mm. Moreover, the egg masses were enumerated.

2.2.5. Effects of BPA on G. aculeatus

On the 1st October 2012, *i.e.* about 15 days after the expected end of the period for reproduction, all the individuals of each population were fished. Sticklebacks were killed using a high dose of MS-222, and were then stored in 4% formalin. Thereafter, length and weight of all fish from each population were measured. Fish length was measured from the anterior tip of the upper lip to the posterior end of the vertebral column (*i.e.*, standard length, noted *Ls*). Fish standard length in formalin was divided by 0.96 to obtain the actual standard length (defined as length in the "Results" part of this manuscrit) and fish weight in formalin was divided by 1.09 to obtain the actual weight (coefficients determined on 35 fish in a pre-experiment, data not shown).

Founder fish (*i.e.* fish initially introduced in the mesocosms) and non-founder fish (*i.e.* fish born in the mesocosms) were distinguished by the presence/absence of a tag at the end of experiment. Fish with lengths below 25 mm were all immature (gonad undeveloped, data not shown) and classified as juveniles. Fish sex was determined by visual observation of the gonads, for individual with lengths above 25 mm (adult fish group). Accordingly, 5 groups of fish were identified: juvenile (<25 mm), non-founder fish (≥25 mm without a tag) male or female, founder fish male or female (≥25 mm with a tag). In addition, maturity states of the males were determined by observation under a stereo microscope and three groups were distinguished: immature, pubescent and mature (Craig-Bennett, 1931; Sokolowska and Kulczykowska, 2006).

Gonad development was assessed on samples of founder and non-founder females and males, by measuring their length on a

Table 2
Measured water concentrations (μg/L) of BPA at 0, 5 and 19 m from the inlet of water in each mesocosms (mean ± SD).

Nominal concentration (μg/L)	Mesocosms	0 m	5 m	19 m
0	2	LOQ	LOQ	LOQ
0	3	LOQ	LOQ	LOQ
0	11	LOQ	LOQ	LOQ
1	1	1.33 ± 0.37	0.63 ± 0.31	0.70 ± 0.13
1	5	1.62 ± 0.85	0.81 ± 0.81	0.74 ± 0.50
1	8	1.72 ± 1.17	0.47 ± 0.42	0.57 ± 0.52
10	6	9.16 ± 2.10	2.72 ± 2.03	2.87 ± 2.58
10	9	10.43 ± 1.55	4.27 ± 2.80	3.97 ± 3.00
10	10	9.85 ± 1.91	1.98 ± 2.22	2.31 ± 2.79
100	4	90.85 ± 20.91	57.07 ± 27.39	62.70 ± 24.32
100	7	84.63 ± 22.87	74.07 ± 15.53	77.59 ± 16.86
100	12	93.60 ± 28.21	53.62 ± 34.53	62.65 ± 32.60

LOQ, value below the limit of quantification (LOQ = 0.1 μg/L).

photography taken under a stereo microscope and by using the Image J software (Rasband, 2012).The sampled fish were selected to be regularly distributed between 25 mm (minimal length) and 65 mm (maximal length observed in the populations). The ratio between gonad length and standard length was then assessed.

The populations were compared based on the abundance of the 5 different groups. The length frequency distribution of the fish population was described by the coefficient of variation (CV) and the mean length of the different groups of fish. To estimate the structure of the population, sex-ratio was defined and calculated with the following formula:

$$\text{Sex-ratio} = \frac{\text{Females}}{\text{Females} + \text{Males}} \times 100$$

Condition index was determined to assess the overall health as:

$$\text{IC} = \frac{\text{weight}}{a \times Ls^b}$$

with a and b, respectively equal to 0.013 and 3.027 (Freon, 1978).

2.3. Data analysis

All statistical analysis were performed with the R 2.15.1 software (R Core Team, 2012). The level of significance for all the analysis was 5%. ANOVA was performed to identify significant effects on the measured endpoints and a Dunnett's post hoc test was then used to compare each treatment to the control. The response of the macro-invertebrate community to BPA treatment was analysed using the Principal Response Curve (PRC) method of Van den Brink et al. (2000). Prior to analysis, the abundance data for macro-invertebrates was Ln ($a \times X + 1$) transformed, where X stands for abundance. The value of a was chosen in such a way that when the lowest value of the dataset above 0 was taken for X, $a \times X$ yields 2. This was done to down-weigh high abundance values and to approximate a normal distribution of the data (Van den Brink et al., 2000). To test the significance of the treatment effects on the community, Monte Carlo permutation was performed following the PRC. Monte Carlo permutation was also performed for each individual sampling date, to test for the significance of the treatment effects. To assess which treatment differed from the control for each sampling date, Dunnett's test on PCA co-ordinates was used to determine the No Observed Effect Concentration at the community level ($NOEC_{community}$).

3. Results

3.1. BPA concentration in water

Mean and standard deviation of measured BPA water concentrations recorded in each mesocosm during the experiment are presented in Table 2. Measured concentrations were close to the nominal concentrations just at the inlet of the water in the mesocosms. The concentrations decreased rapidly between 0.5 and 5 m and stayed constant from 5 to 19 m from the inlet of the water in the mesocosms. The standard deviation in Table 2 accounts for the temporal variability of the contamination in each mesocosm.

3.2. Environmental parameters

Daily mean temperature showed no difference between 5 m and 15 m for each treatment (data not shown). Temperature was not affected by the treatments. Environmental parameters (pH, dissolved oxygen and conductivity) were significantly affected by the treatments (Table 3). pH in the 100 μg/L treatment was significantly smaller than the control at +68 dpt and from +109 dpt up to the end of the experiment (significant differences detected on 10 of the 21 dates measured post treatment). Dissolved oxygen in the 100 μg/L treatment was significantly lower than the control between +31 and +68 dpt and between +109 and +138 dpt (significant differences detected on 10 of the 21 dates measured post treatment). Conductivity in the 100 μg/L treatment was significantly higher than the control at +68 and +109 dpt (significant differences detected on 2 of the 21 dates measured post treatment).

3.3. Macrophytes

The volume scores of Eurasian water-milfoil and filamentous green algae were significantly affected by time but not by treatment. The volume score of water starwort and watercress

Table 3
Values of environmental parameters (mean ± SD) in the mesocosms for each condition (ANOVA).

Treatments	Control conditions	1 μg/L	10 μg/L	100 μg/L
Temperature (°C)	15.7 ± 2.7	15.4 ± 3.2	15.3 ± 3.2	15.3 ± 3.2
Oxygen (mg/L)	12.0 ± 1.6	12.3 ± 1.8	12.1 ± 1.6	10.5 ± 2.3
pH	7.84 ± 0.10	7.85 ± 0.12	7.82 ± 0.13	7.74 ± 0.11
Conductivity (μS/cm)	684 ± 32	679 ± 30	682 ± 33	685 ± 29

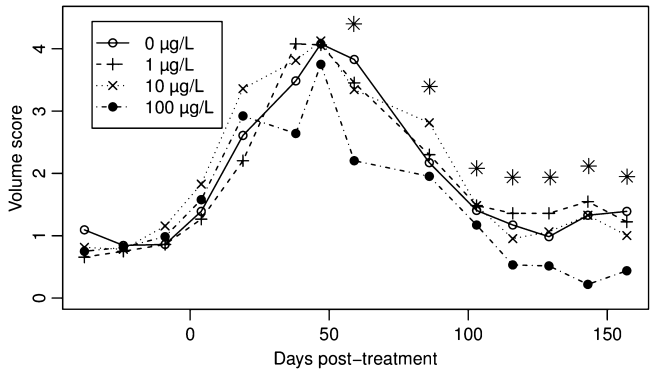

Fig. 1. Volume score of watercress observed in control mesocosms (white points, full line) and in the treated mesocosms (1, 10 and 100 µg/L; dashed line, dotted line, dot-dashed line, respectively). Values represent the mean volume scores per mesocosm for a treatment (m^3). Significant differences between treatments and control are marked by a star.

were significantly affected by treatment, time and the interaction between these two factors.

In the control, the volume scores of water starwort increased slowly throughout the experiment. A significant decrease of the volume score of water starwort in the 100 µg/L treatment compared to the control treatment was observed at +59 dpt (data not shown, significant differences detected on 1 of the 11 dates measured post treatment). For watercress, blossoming occurred from May to July (from +20 to +80 dpt) when peaks values of the volume score were found (Fig. 1). Thereafter, a decrease of the volume score was observed from July to August (from +80 to +100 dpt) before the appearance of the new formed stems in September (135 dpt). Watercress exposed to the 100 µg/L treatment was negatively affected at +59, +73 and at all the dates after +116 dpt (Fig. 1, significant differences detected on 5 of the 11 dates measured post treatment).

3.4. Macro-invertebrates

A total of 19 different taxonomic groups of macro-invertebrates were sampled throughout the study period, including 5 species of gastropods (*R. balthica*, *P. antipodorum*, *Lymnaea stagnalis*, *Anisus vortex*, *P. planorbis*), 2 of crustaceans (*G. pulex*, *A. aquaticus*), 2 taxa of oligochaeta (*Stylaria lacustris*, *Lumbriculus variegatus*), 1 of ephemeropterans (*Cleon dipterum*), 1 taxa of dipterans (*Chironomidae*), 1 of tubellarians (Dugesia), 2 taxa of leeches (*Glossiphonia* and *Erpodellidae*), 1 taxa of heteropterans (Notonecta) and 2 taxa of odonata (Sympetrum, and *Ischnura elegans*).

Community structure was significantly affected by the treatment (Fig. 2). Time (displayed on the horizontal axis) explains 58% of the total variance. Treatment only explains 14% of the total variance. Of this variance, 29% is displayed on the vertical axis. Monte Carlo permutation tests for each sampling date indicated that macro invertebrates' community structure was affected by the treatment. Pairwise comparisons showed significant differences between the control and the 100 µg/L treatment at two sampling dates: 18 and 130 dpt (Fig. 2, significant differences detected on 2 of the 6 dates measured post treatment) and no significant differences between the control and the other treatments. Species with a negative weight such as one tubellarians taxa (*Dugesia*), one crustacean species (*G. pulex*), and one gastropod species (*Planorbis carinatus)* decreased in abundance. Species with a positive weight such as two species of Gastropods (*R. balthica*, *Planorbis carinatus*,), one Crustacean species (*A. aquaticus*), one species of leech (*Glossiphionia complanata*) and Dipterans (Chironomidae) increased in abundance (Fig. 2). Species and/or taxa present in low abundance

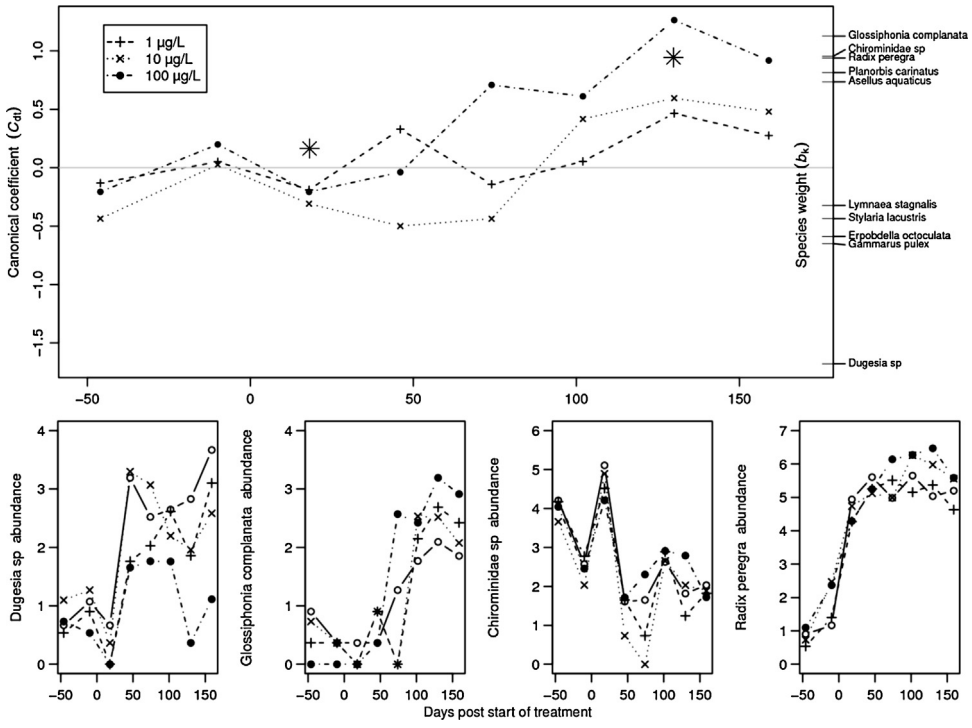

Fig. 2. Principal response curves resulting from the analysis of the macro-invertebrate data set, indicating the effects of the BPA on the community. Of all variance, 58% could be attributed to sampling date, and is displayed on the horizontal axis, 14% could be attributed to treatment. Of the variance explained by treatment, 29% is displayed on the vertical axis. The lines represent the course of the treatment levels over time. The species weight (bk) can be interpreted as the affinity of the taxon with the principal response curves. Taxa with a species weight between 0.25 and −0.25 are not shown. Treatments 1, 10 and 100 µg/L are represented by dashed line, dotted line, dot-dashed line, respectively. Mean abundances by treatment (log transformed) of the four species with the higher species weight are represented. Significant differences between treatments and control are marked by a star.

Table 4
Statistical comparisons of the total abundance of *Radix peregra* and the number of egg masses between treatments.

	Sum of squares	df	Mean square	*F*-Value	*p*-Value
Total abundance of snails					
Treatement	20.8	3	6.92	10.4	1.2×10^{-5} ***
Time	687.8	7	98.26	147.1	2.5×10^{-37} ***
Treatement × time	34.7	21	1.65	2.5	0.0028***
Egg masses abundance					
Treatement	2.3	3	0.76	1.08	0.363
Time	68.9	7	9.84	14.03	6.2×10^{-11} **
Treatement × time	23.1	21	1.1	1.57	0.086**

* Significant difference at $p < .05$.
** Significant difference at $p < .01$.
*** Significant difference at $p < .005$.

have species weights between −0.5 and 0.5 and are weak contributors to the overall community response. The abundances of the four taxa that contribute the most to the observed community response are presented in Fig. 2.

Total abundance of *R. balthica* was significantly affected by the treatment, time and the interaction between the two factors (statistical comparisons are presented in Table 4). On the contrary, the number of egg masses was significantly affected only by time but not by the treatment. Total abundance was significantly increased in the 100 μg/L treatment at 74 and 130 dpt.

Relative frequencies of the different length classes are presented in Fig. 3. The high variability of the frequency of each length class in the populations observed at −46 dpt is due to a very small population size (<2 individuals) per treatment at this time. The abundance of the length class [0–5 mm[was significantly lower compared to the control populations at 46 dpt in the 1 and 100 μg/L treatments and higher at 130 dpt in the 100 μg/L treatment. The abundance of the length class [5–10 mm[was significantly affected at the same dates and at the same treatments but the effects were the opposite (for the two endpoints, significant differences detected on 2 of the 6 dates measured post treatment). No significant effect was observed for the length class ≥10 mm.

3.5. *G. aculeatus*

Statistical comparisons relative to the abundance of the different fish groups between treatments are presented in Table 5. Treatment had no effect on the total abundance of fish at the end of the experiment (Table 5 and Fig. 5 A). The mean total abundance was 978.25 ± 197.44 individuals per population. The number of founder females and males alive at the end of the experiment was not significantly different among conditions (Table 5, data not shown). At the end of the experiment, 9.25 ± 2.49 founder females out of the 15 that had been introduced and 5.17 ± 2.17 founder males out of the 10 that had been introduced were found alive. In contrast, the number of non-founder females and males was significantly higher in the populations exposed to the 100 μg/L treatment compared to the control population (Table 5 and Fig. 5B and C). No difference between treatments was observed relative to the sex-ratio (Table 5). The percentage of immature males among all the males in the population significantly increased with the nominal BPA exposure concentration. In details, significantly more immature males were observed in populations exposed to 100 μg/L compared to control conditions (Table 5 and Fig. 5D). Males exposed to 10 and 100 μg/L of BPA presented significantly smaller gonads than the control males (Fig. 4A). Females exposed to BPA (for the three

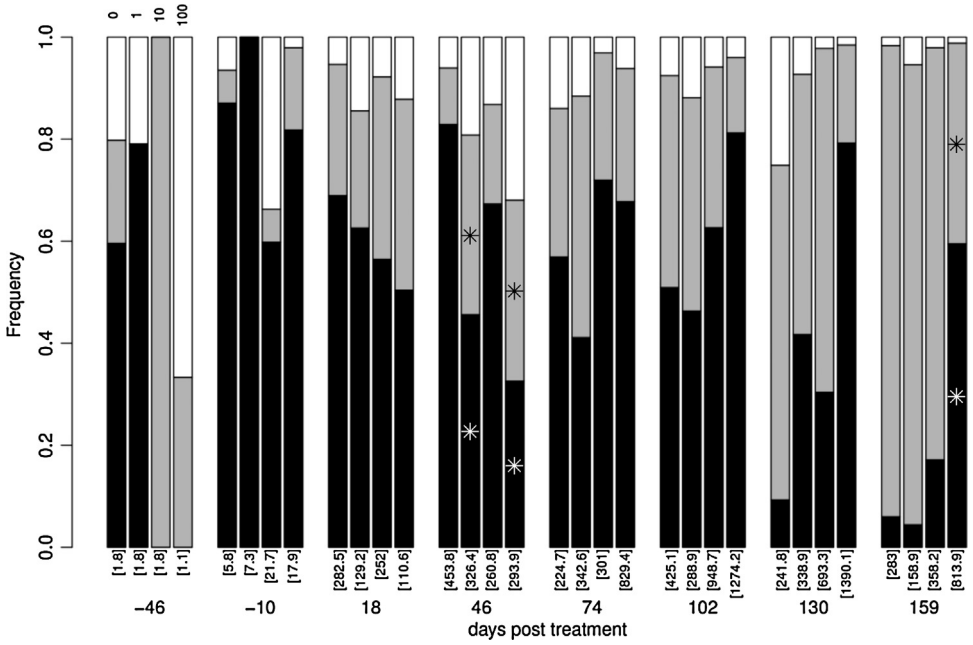

Fig. 3. Mean relative abundance of [0–5 mm[(black), [5–10 mm[(grey) and ≥10 mm (white) *R. balthica* in BPA-treated mesocosms. Numbers inside brackets are the mean total radix abundance per treatment. At each observation time, frequencies observed in 0, 1, 10 and 100 μg/L BPA treated mesocosms are presented from the left to the right. Significant differences between treatments and control are marked by a star represented on the bar in the length class concerned.

Table 5
Statistical comparisons of fish abundance between treatments.

	Sum of squares	df	Mean square	*F*-Value	*p*-Value
Total number of fish	39344.92	3	13114.97	0.27	0.8458
Number of founder females	30.92	3	10.31	2.21	0.1647
Number of founder males	8.33	3	2.78	0.51	0.6847
Number of non founder females	18033.58	3	6011.19	14.98	0.0012**
Number of non founder males	9536.92	3	3178.97	8.50	0.0072**
Number of juveniles	30497.67	3	10165.89	0.20	0.8962
Sex ratio	50.72	3	16.91	1.04	0.4242
Percentage of immature males	7309	3	2436	9.466	0.0052**

* Significant difference at $p < .05$.
** Significant difference at $p < .01$.
*** Significant difference at $p < .005$.

treatments) had significantly smaller gonads than the control females (Fig. 4B). Finally, the abundance of juveniles at the end of experiment was not impacted by the treatment (Table 5, data not shown). At the end of experiment, 713.83 ± 201.20 juveniles per population were counted. Significant differences were detected on 3 of the 8 endpoints describing the abundance of the population.

Mean length frequency distributions observed in control and in exposed conditions are presented in Fig. 6. For all conditions, length distributions presented some similarities. The smallest individuals in the populations presented a standard length around 10 mm. A major part of the population (from 92.5 to 96.6%) had standard lengths between 12 and 35 mm. The proportion of individual per population declined between 25 and 45 mm and above 45 mm, only founder individuals were observed. Nevertheless, the populations were clearly different relative to the length classes with maximal frequencies. The populations in control conditions and the population exposed to 1 and 10 μg/L presented a maximum frequency at 18 mm (8.8% of the individuals of the population). On the contrary, the populations exposed to the 100 μg/L treatment presented a maximum at 22 mm (8.5% of the individuals in the population).

Juveniles had significantly higher lengths in the populations exposed to the 100 μg/L treatment than in the other populations (Table 6 and Fig. 5F).

No difference between control and exposed conditions was observed on the mean adult length at the end of the experiment (Table 6 and Fig. 5 E). Significant difference was detected on 1 of the 5 endpoints describing the length distribution of the population. Moreover, no difference between treatments was observed relative to the condition index (data not shown).

4. Discussion

4.1. Contamination

Our results showed a rapid decrease between 0.5 and 5 m of the BPA concentrations (decrease of 59, 71 and 31% for 1, 10 and 100 μg/L, respectively). Kinetic experiments performed by colleagues in beakers with sediment coming from a control mesocosm suggested that the decrease of the BPA concentration observed in the water column may result from biological degradation (weak photolysis, adsorption on soil and volatilization were observed, (EDF, report H-P77-2011-01974-FR)). However, the water volume in the first 5 m of the mesocosms was renewed in less than 2 h (1.5 m^3 water volume and 800 L/h flow rate) while the average expected biodegradation lag time is 3.4 ± 0.7 days (Klečka et al., 2001; West et al., 2001). Hence, biodegradation of BPA does not seem to explain the rapid decrease of the exposure concentration, especially for the lower concentrations.

We propose another explanation based on substantial accumulation of BPA by watercress located in the first 5 m. This macrophyte is known to bioaccumule metals such as arsenic (Ozturk et al., 2010), nickel (Duman and Ozturk, 2010; Kara, 2005), copper (Kara, 2005; Roussel et al., 2007b) and zinc (Kara, 2005). However, few studies have focused on the bioaccumulation of organic chemicals by macrophytes. Crum and Brock (1994), studied the fate of a pulse exposure of chlorpyrifos in indoor microcosms with and without macrophytes and in experimental ditchs which contained macrophytes. Chlorpyrifos concentrations were monitored in water, macrophytes and sediments. The rate of disappearance of chlorpyrifos was higher in microcosms which contained macrophytes

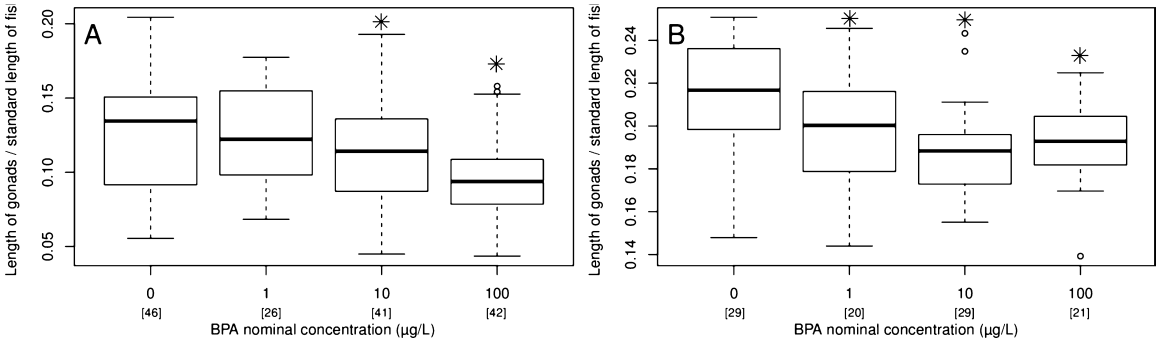

Fig. 4. Expression of the ratio between gonad length and fish standard length for males (A) and females (B) in control, exposed to 1, 10 and 100 μg/L populations. The numbers inside brackets are the numbers of fish analyzed. Differences between numbers are due to the number of founders alive at the end of experiment and the possibility to obtain fish groups for each length class. Significant differences between treatments and control are marked by a star.

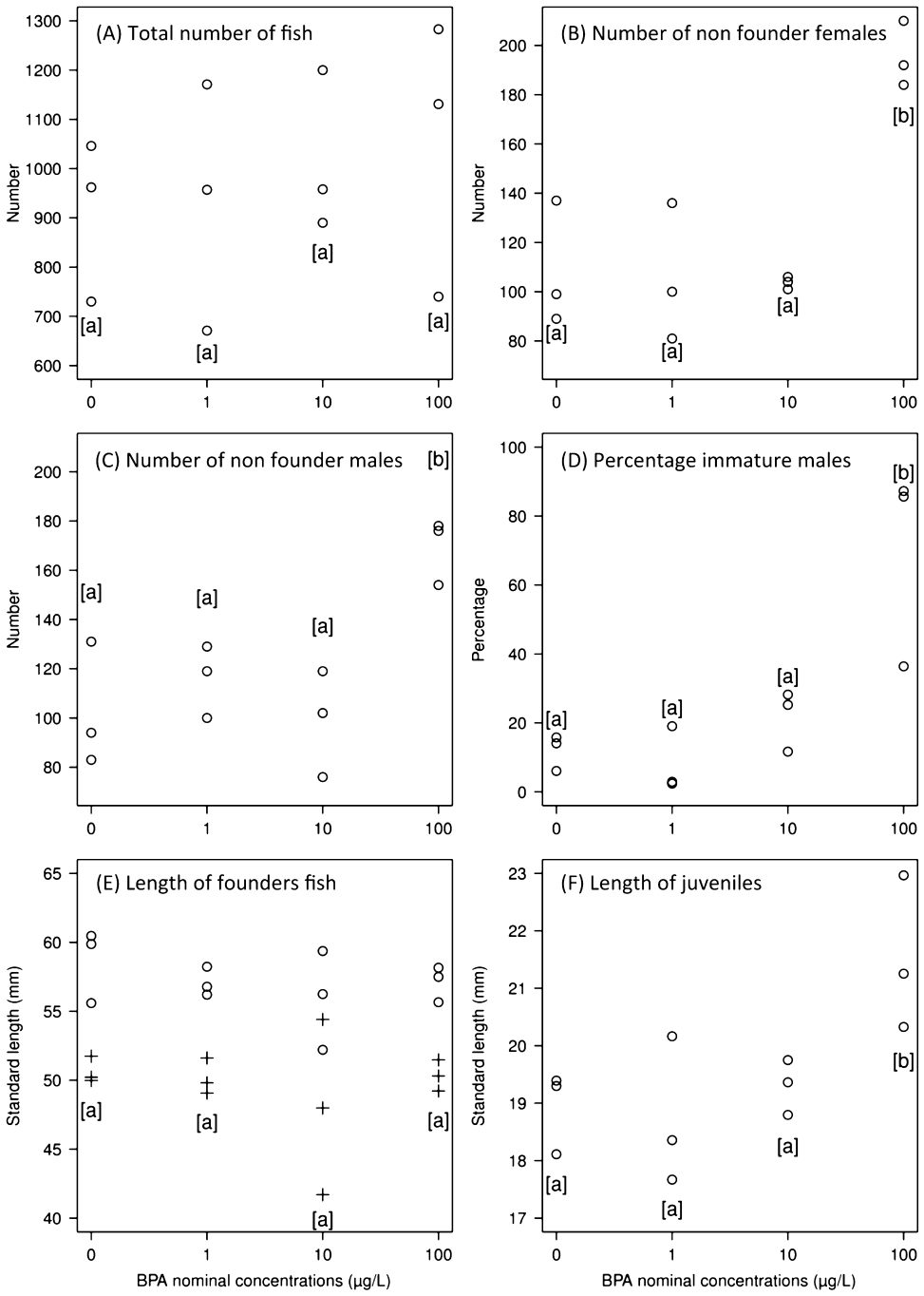

Fig. 5. Total number of fish (A), number of non founder females (B) and males(C), percentage of immature males among all males (D), standard length of founders fish (E; "◯" and "+" represent females and males, respectively) and standard length of juveniles (F). All endpoints refer to population size and structure at the end of the experiment. Two groups of data labeled with different lower case letters have significantly different value (Dunnett test, p-value < 0.05).

Table 6
Statistical comparisons of the fish mean standard length.

Standard length of...	Sum of squares	df	Mean square	F-Value	p-Value
Funder females	11.09	3	3.70	0.65	0.6048
Funder males	12.78	3	4.26	0.39	0.7667
Non funder females	3.12	3	1.04	2.83	0.1065
Non funder males	4.82	3	1.61	1.65	0.2528
Juveniles	14.87	3	4.96	4.73	0.0351*

* Significant difference at $p < .05$.
** Significant difference at $p < .01$.
*** Significant difference at $p < .005$.

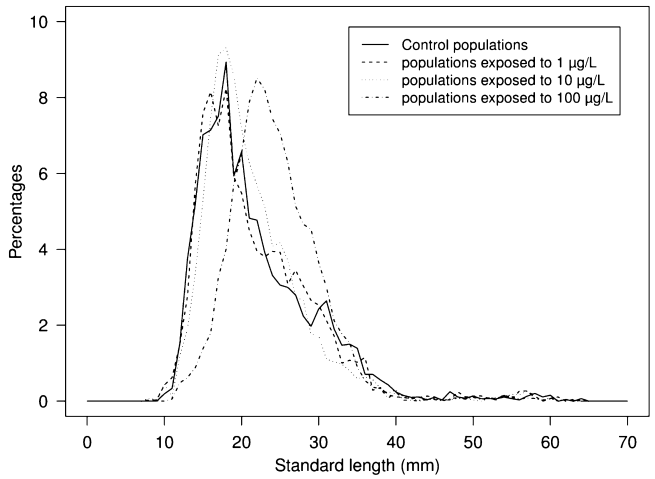

Fig. 6. Standard length frequency distribution in the stickleback populations observed in control conditions (black full line) and in treated conditions to 1, 10 and 100 µg/L, (dashed line, dotted line, dot-dashed line, respectively). Data presented are the percentage of stickleback for each length class (standard length between [x; $x+1$ mm[). Length frequency distributions are the mean of the 3 populations observed in a treatment.

and in the experimental ditchs compared to the microcosms without macrophytes. Macrophytes sorbed a relatively large amount of the applied dose (approximately 40%) in both experimental systems. Past studies have demonstrated that macrophytes have a high capacity to remove or sorb large concentrations of organic compounds such as nutriments (Nahlik and Mitsch, 2006; Sooknah and Wilkie, 2004), pesticides (Crum and Brock, 1994) and more generally to improve water quality by decreasing the concentration of organic compounds. Our hypothesis could be challenged by measurements of BPA in exposed watercress.

4.2. Effects on macrophytes

For the 100 µg/L treatment, mean pH was significantly lower than the control. This lower pH could be explained by the lower volume score of watercress and water starwort. Indeed, macrophytes have an important effect on the physical environment (light extinction, temperature, hydrodynamics and substrate), on biota (epiphytes, grazers, detritivores and fishes) and on the physicochemical environment such as oxygen, inorganic and organic carbon and nutrients (Carpenter and Lodge, 1986). Less macrophytes implies less photosynthesis activity (so less oxygen) and then a lower consumption of carbon dioxide (associated with water-produced carbonic acid) and nutriments. Hence, decline of the macrophyte volume in the 100 µg/L treatment may have induced a decline of pH (*i.e.* lower carbon dioxide consumption), a decline of dissolved oxygen (*i.e.* lower oxygen production) and an increase of conductivity (*i.e.* lower nutriment consumption) (Caquet et al., 2000).

The decrease of the volume of watercress and water starwort in the middle of June in the 100 µg/L treatment could be due to a direct and/or an indirect effect. (i) Few studies have reported effects of BPA on aquatic plants at our tested concentrations. In these studies, BPA inhibits growth of *Skeletonema costatum* at 2.7 mg/L (Alexander et al., 1988), of *L. gibb*a above 20 mg/L (Mihaich et al., 2009) and of a freshwater sponge at 1.6 ppm (1.6 µg/L) (Hill et al., 2002). Hence, watercress should be at least twenty times more sensitive to BPA than other macrophytes to support the hypothesis of a direct effect. (ii) Effect of BPA on macrophytes could result from indirect effects such as an increase in the abundances of grazers. Invertebrates use live macrophytes as food (Brönmark, 1989; Carpenter and Lodge, 1986). Brönmark (1989) and Boycott (1936 in Islam et al., 2001) observed that snails have a great impact on the biomass of epiphytic communities, but these author suggest that direct effects of grazing on living macrophytes are of minor importance. In our study, epiphytic biomass was very low (data not shown) due to the increase in abundance of snails. As the food source was scarce, snails may have shifted their diet from epiphytic communities to macrophytes and detritus (Dillon, 2004; Li et al., 2009; Pieczynska, 2003). A dedicated experiment without grazers to measure direct effects of BPA on watercress may help to assess the relative importance of direct and indirect effects.

4.3. Effects on macro-invertebrates

Macro-invertebrate community structure was impacted by the 100 µg/L treatment. The four most impacted species were *Dugesia* sp., *G. complanata*, *Chironomidae* sp. and *R. balthica*.

The abundance of *Dugesia* sp. was negatively impacted whereas the abundance of *G. complanata* was positively impacted. Several species of triclad (e.g. *Dugesia lugubris*, *Dugesia polychroa*) have been shown to prey extensively on small *R. balthica* (Gaten, 1986; Reynoldson and Pearce, 1979). *R. balthica* is also the most vulnerable lentic species to *G. complanata* predation (Brönmark and Malmqvist, 1986; Gaten, 1986). Hence, we expected an increase of these two populations in response to the increase in abundance of *R. Balthica*, which was not observed. Other studies demonstrated negative interactions between the triclads and glossiphoniid leeches, in particular, an important overlap in the diets of these species (Seaby et al., 1996; Young et al., 1995). *Dugesia* sp. was more abundant than *G. complanata* in the control population and less abundant in the 100 µg/L treatment. Seaby et al. (1996) assumed that increasing the size of the established populations of one group, triclads or leeches, would result in raising the severity of both intra- and interspecific competition for food. Consequently, BPA would promote *G. complanata* in the food competition with *Dugesia* sp.

Higher abundance of *Chironomus riparius* was observed in the 100 µg/L treament. In the laboratory, BPA affected median emergence time of *C. riparius* at concentrations between 78 ng/L and 0.75 mg/L (Watts et al., 2001a). Hence a direct impact of BPA could have lead to a decrease in abundance compared to the control, which is the opposite of our observations. Consequently, indirect effects of BPA should explain the observed response. Impact on macrophytes could have led to more organic matter in decomposition in the 100 µg/L treatment. Similarly, Smock and Stoneburner (1980) observed that the densities of *Chironomidae* increased as the leaves of macrophytes began to decompose and became a suitable food resource.

Total abundance of *R. balthica* was higher in the 100 µg/L treatment. There is no information in literature on the effects of BPA and more generally of endocrine disruptors on *R. balthica*. However, literature data report effects of BPA for species with a close phylogeny (Class: Gastropoda). Oehlmann et al. (2000) studied the effects of BPA on the freshwater snail *M. cornuarietis* and observed a superfeminisation induced on individuals exposed to 1 µg/L. Despite this induced superfeminisation (second vagina with vaginal opening to the mantle cavity and/or an enlargement of the pallial accessory sex glands albumen and capsule gland), BPA increased the spawning mass and egg production. Moreover, authors observed that, after 21 days of exposure to 1 µg/L of BPA, the snail *P. antipodarum* had a large number of new embryos compared to the control (Jobling et al., 2004). All these results are in accordance with ours, in particular with the observed population structure (high frequency of the smallest length class), and suggests that BPA increased the population growth rate of *R. balthica*.

The population structure of *R. balthica* exposed to 1 µg/L of BPA was affected at +46 dpt relative to the number of small and median individuals. However, no clear concentration response was

observed (no effect at 10 μg/L) and it was the only effect at this concentration. Our results can thus not be confidently attributed to treatment effects. Also, as exposure was continuous for the duration of the study, one would expect effects to appear and then either be maintained or increase with time (unless organisms are becoming acclimated to the treatment). Here we see some differences on day 46, no differences on days 74, 102, or 130, and then a difference again (only at 100 μg/L) on day 159.

4.4. Effects on Gasterosteus aculeautus

We showed physiological effects of BPA. Standard length of the gonads were analysed at the end of experiment, and BPA exposed populations had significantly smaller gonads than the control populations, both for males (10 and 100 μg/L) and females (for 1, 10 and 100 μg/L). Our results are in agreement with other studies. For example, gonad structure was changed in males *C. carpio* exposed to 1 μg/L of BPA (Flint et al., 2012).

At the population level, the distribution of standard length frequency presented two patterns. At 100 μg/L, there were more individuals with lengths higher than 25 mm (considered as adults) and the mean standard length of the juveniles increased. Consequently, the length class with maximal abundance in populations exposed to 100 μg/L of BPA shifted to a bigger standard length. Indirect and direct impacts of BPA could explain these results. (i) Abundance of macro-invertebrate populations which are consumed by fish in 100 μg/L treated mesocosms was higher than in the other treatments, resulting in more available food. Thus, during the clear-water phase, density dependence and/or food regulation of the population dynamics was lower than for the other treatments. Sticklebacks are indeed known to consume mainly small individuals of *R. balthica* which were the most abundant length class in the treatment with the highest concentration of BPA (Gaten, 1986). A negative relationship between cannibalism and feeding level is widespread in fish (Smith and Reay, 1991). Hence, in the 100 μg/L treated mesocosms, more juveniles of the first reproduction survived and grew. Therefore, in the other conditions, juveniles were probably either consumed or more likely to die because of food scarcity. (ii) In our study, gonad atrophy may be linked to a changed balance between energetic investment in soma and reproduction, the lower gonadal development being observed together with adult fish. As growth was higher in populations exposed to 100 μg/L of BPA, at the end of the experiment, more males were longer than 25 mm compared to control conditions. Hence the proportion of immature males was more important than in the other conditions (in our study, the smallest mature males measured around 36 mm).

The distribution frequency of standard length showed another difference among concentrations. In all conditions, except for 100 μg/L of BPA, the population was composed of juveniles measuring from 10 and 15 mm. These juveniles were born during the last reproduction event that occurred in the mesocosms. Our first explanation for the observed lack of juveniles at the highest exposure concentration is based on the indirect impact of BPA. At the end of experiment, food was scarce in all treatments, excepted for bigger fish who could feed on *Radix*. Moreover, the populations exposed to 100 μg/L of BPA had larger fish individuals than in the other populations. Consequently, fish of the populations exposed to 100 μg/L of BPA needed more food than the other populations. The preferred source of food at this time was the juveniles (more profitable than *Radix*), in particular the smallest individuals because they were easier to catch (Nettleship, 2011). Another assumption to explain the lack of juveniles would be a direct impact of BPA on reproduction. First-born individuals were not impacted by BPA, because exposure begun when the first juveniles were observed. Moreover, the atrophy of the gonads of males and females could have induced a reduced reproduction rate after a long exposure.

Growth and reproduction laboratory tests on stickleback should permit to support our hypotheses relative direct vs indirect effects of BPA on *G. aculeatus*.

5. Conclusions

We observed effects of BPA on at least three trophic levels in mesocosms, namely macrophytes, macro-invertebrates and fish. The nominal concentration of 100 μg/L induced effects at the population and community levels (abundance and community structure of macro-invertebrates volume of macrophytes and population structure of fish). Moreover, BPA impacted fish gonad morphology at 1 μg/L for females and 10 μg/L for males, with no clear impact on population dynamics. These results are in accordance with previous studies which have demonstrated the endocrine-disrupting potential of the BPA other fish species at these concentrations (Table 1). The mode of action explaining impact on fish gonad should be investigated in further studies.

The stickleback appeared to be a good integrator of the other communities (macro-invertebrates and macrophytes) as fish were probably also indirectly impacted by BPA through trophic chains.

It is important to note that our study is the first and only mesocosm experiment, for assessing the ecological risk of BPA. Natural aquatic ecosystems are both too complex and too diverse to be fully understood based on mesocosms studies. Mesocosms are simplified representations (a model) of these systems. Hence, the choices and hypotheses we made (initial selected species, habitat structure, etc) are also the limits of our experimental ecosystems and leave some uncertainty in the predictions. These uncertainties could only be reduced based on further studies in other experimental ecosystems (e.g. other species and/or other aquatic system).

Acknowledgements

The author acknowledges the support of the French Ministry in charge of Ecology and Sustainable Development for this study, within the framework of Programme 190. The authors wish to thank C. Brochot and two anonymous reviewers for valuable comments.

References

Alexander, H.C., Dill, D.C., Smith, L.W., Guiney, P.D., Dorn, P., 1988. Bisphenol A: acute aquatic toxicity. Environmental Toxicology and Chemistry 7, 19–26.
Andersen, A.K., Schou, J., Sparrevohn, C.R., Nicolajsen, H., StØTtrup, J.G., 2005. The quality of release habitat for reared juvenile flounder, *Platichthys flesus*, with respect to salinity and depth. Fisheries Management and Ecology 12, 211–219.
Andersen, H.R., Halling-Sorensen, B., Kusk, K.O., 1999. A parameter for detecting estrogenic exposure in the copepod *Acartia tonsa*. Ecotoxicology and Environmental Safety 44, 56–61.
Belfroid, A.1., van Velzen, M., van der Horst, B., Vethaak, D., 2002. Occurrence of bisphenol A in surface water and uptake in fish: evaluation of field measurements. Chemosphere 49, 97–103.
Bernhardt, R.R., von Hippel, F.A., Cresko, W.A., 2006. Perchlorate induces hermaphroditism in threespine sticklebacks. Environmental Toxicology and Chemistry 25, 2087–2096.
Björkblom, C., Olsson, P.E., Katsiadaki, I., Wiklund, T., 2007. Estrogen- and androgen-sensitive bioassays based on primary cell and tissue slice cultures from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 146, 431–442.
Braun-Blanquet, J., 1921. Prinzipen einer Systematik der Pflanzengesellschaften auf floristischer grundlage. Jahrbuch der Sankt Gallischen Naturwissenschaftlichen Gesellschaft, 305–351.
Brian, J.V., Augley, J.J., Braithwaite, V.A., 2006. Endocrine disrupting effects on the nesting behaviour of male three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* L. Journal of Fish Biology 68, 1883–1890.
Brönmark, C., 1989. Interactions between epiphytes, macrophytes and freshwater snails: a review. Journal of Molluscan Studies 55, 299–311.
Brönmark, C., Malmqvist, B., 1986. Interactions between the leech *Glossiphonia complanata* and its gastropod prey. Oecologia 69, 268–276.

Caquet, T., Lagadic, L., Sheffield, S.R., 2000. Mesocosms in ecotoxicology (1) outdoor aquatic systems. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 165, 1–38.
Carpenter, S.R., Lodge, D.M., 1986. Effects of submersed macrophytes on ecosystem processes. Aquatic Botany 26, 341–370.
Cousins, I.T., Staples, C.A., Klečka, G.M., Mackay, D., 2002. A multimedia assessment of the environmental fate of bisphenol A. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal 8, 1107–1135.
Craig-Bennett, A., 1931. The reproductive cycle of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, Linn. Philosophical Transactions of the Royal Society of London: Series B, Containing Papers of a Biological Character 219, 197–279.
Crum, S.J.H., Brock, T.C.M., 1994. Fate of chlorpyrifos in indoor microcosms and outdoor experimental ditches. In: Hill, I.R., Heimbach, F., Leeuwangh, P., Matthiessen, P. (Eds.), Freshwater Field Tests for Hazard Assessment of Chemicals. Lewis Publishers, Michigan, USA, pp. 315–332.
de Kermoysan, G., Péry, A.R.R., Porcher, J.-M., Beaudouin, R., 2013. A non invasive method based on head morphology to sex mature three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.), in rearing conditions. Mathematical Biosciences 244, 148–153.
Dillon, R.T., 2004. The Autoecology of Gastropods, The Ecology of Freshwater Molluscs. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 57–114.
Duft, M., Schulte-Oehlmann, U., Weltje, L., Tillmann, M., Oehlmann, J., 2003. Stimulated embryo production as a parameter of estrogenic exposure via sediments in the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. Aquatic Toxicology 64, 437–449.
Duman, F., Ozturk, F., 2010. Nickel accumulation and its effect on biomass, protein content and antioxidative enzymes in roots and leaves of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.). Journal of Environmental Sciences 22, 526–532.
European Council, 2011. Directive 2011/8/EU of 28 January 2011 amending Directive 2002/72/EC as regards the restriction of use of bisphenol A in plastic infant feeding bottles, p. 4.
European Union, 2003. European Union Risk Assessment Report for 4,4′-Isopropylidenediphenol (Bisphenol-A). Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, pp. 302.
European Union, 2008. EU Risk Assessment: Updated Risk Assessment Report on Bisphenol A. Publications Office of the European Union, Luxembourg, pp. 221.
Flint, S., Markle, T., Thompson, S., Wallace, E., 2012. Bisphenol A exposure, effects, and policy: a wildlife perspective. Journal of Environmental Management 104, 19–34.
Forbes, V.E., Calow, P., Grimm, V., Hayashi, T.I., Jager, T., Katholm, A., Palmqvist, A., Pastorok, R., Salvito, D., Sibly, R., Spromberg, J., Stark, J., Stillman, R.A., 2011. Adding value to ecological risk assessment with population modeling. Human and Ecological Risk Assesment: An International Journal 17, 287–299.
Freon, P., 1978. Relation Tailles-poids, facteur de condition, et indice de maturité sexuelle: rappels bibliographiques, interprétations, remarques et applications, La reproduction des espèces exploitées dans le Golfe de Guinée. Rapport du groupe de travail ISRA-ORSTOM (Dakar, 7–12 nov 1977). Centre Océanographique Dakar-Thiaraye, pp. 213.
Fukuhori, N., Kitano, M., Kimura, H., 2005. Toxic effects of bisphenol A on sexual and asexual reproduction in *Hydra oligactis*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 48, 495–500.
Gaten, E., 1986. Life cycle of *Lymnaea peregra* (Gastropoda: Pulmonata) in the Leicester canal, U.K., with an estimate of annual production. Hydrobiologia 135, 45–54.
Heemken, O.P., Reincke, H., Stachel, B., Theobald, N., 2001. The occurrence of xenoestrogens in the Elbe river and the North Sea. Chemosphere 45, 245–259.
Hill, M., Stabile, C., Steffen, L.K., Hill, A., 2002. Toxic effects of endocrine disrupters on freshwater sponges: common developmental abnormalities. Environmental Pollution 117, 295–300.
Hoshi, H., Kamata, Y., Uemura, T., 2003. Effects of 17β-Estradiol, Bisphenol a and Tributyltin Chloride on Germ Cells of *Caenorhabditis elegans*, vol. 65. Japanese Society of Veterinary Science, Tokyo, Japan, pp. 881–885.
Islam, M.N., Port, G.R., McLachlan, A.J., 2001. The biology of lymnaea peregra (Muller) (Gastropoda: Pulmonata: Basommatophora) with special reference to the effects of herbicides on its reproduction. Journal of Biological Sciences 1, 532–540.
Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., Baunbeck, T., Turner, A.P., Tyler, C.R., 2004. Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. Aquatic Toxicology 66, 207–222.
Jolly, C.c., Katsiadaki, I., Morris, S., Le Belle, N., Dufour, S., Mayer, I., Pottinger, T.G., Scott, A.P., 2009. Detection of the anti-androgenic effect of endocrine disrupting environmental contaminants using in vivo and in vitro assays in the three-spined stickleback. Aquatic Toxicology 92, 228–239.
Kara, Y., 2005. Bioaccumulation of Cu, Zn and Ni from the wastewater by treated *Nasturtium officinale*. International Journal of Environmental Science and Technology 2, 63–67.
Katsiadaki, I., Scott, A.P., Mayer, I., 2002. The potential of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a combined biomarker for oestrogens and androgens in European waters. Marine Environmental Research 54, 725–728.
Klečka, G.M., Gonsior, S.J., West, R.J., Goodwin, P.A., Markham, D.A., 2001. Biodegradation of bisphenol a in aquatic environments: river die-away. Environmental Toxicology and Chemistry 20, 2725–2735.
Klečka, G.M., Staples, C.A., Clark, K.E., van der Hoeven, N., Thomas, D.E., Hentges, S.G., 2009. Exposure analysis of bisphenol a in surface water systems in North America and Europe. Environmental Science & Technology 43, 6145–6150.
Kohra, S., Kuwahara, K., Takao, Y., Ishibashi, Y., Lee, H.C., Arizono, K., Tominaga, N., 2002. Effect of bisphenol A on the feeding behavior of *Caenorhabditis elegans*. Journal of Health Science 48, 93–95.
Levy, G., Lutz, I., Krüger, A., Kloas, W., 2004. Bisphenol A induces feminization in *Xenopus laevis* tadpoles. Environmental Research 94, 102–111.
Li, K.-Y., Liu, Z.-W., Hu, Y.-H., Yang, H.-W., 2009. Snail herbivory on submerged macrophytes and nutrient release: implications for macrophyte management. Ecological Engineering 35, 1664–1667.
Licht, O., Jungmann, D., Ladewig, V., Ludwixhowski, K.-U., Nagel, R., 2004. Bisphenol-A in artificial indoor streams: I. Fate and effects on aufwuchs. Ecotoxicology 13, 657–666.
Lynch, M.P., Mensinger, A.F., 2011. Seasonal abundance and movement of the invasive round goby (Neogobius melanostomus) on rocky substrate in the Duluth–Superior Harbor of Lake Superior. Ecology of Freshwater Fish 21, 64–74.
Metcalfe, C.D., Metcalfe, T.L., Kiparissis, Y., Koenig, B.G., Khan, C., Hughes, R.J., Croley, T.R., March, R.E., Potter, T., 2001. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 20, 297–308.
Mihaich, E., Rhodes, J., Wolf, J., van der Hoeven, N., Dietrich, D., Hall, A.T., Caspers, N., Ortego, L., Staples, C., Dimond, S., Hentges, S., 2012. Adult fathead minnow, *Pimephales promelas*, partial life-cycle reproductive and gonadal histopathology study with bisphenol A. Environmental Toxicology and Chemistry 31, 2525–2535.
Miège, C., Peretti, A., Labadie, P., Budzinski, H., Le Bizec, B., Vorkamp, K., Tronczyński, J., Persat, H., Coquery, M., Babut, M., 2012. Occurrence of priority and emerging organic compounds in fishes from the Rhone River (France). Analytical and Bioanalytical Chemistry 404, 2721–2735.
Mihaich, E.M., Friederich, U., Caspers, N., Hall, A.T., Klečka, G.M., Dimond, S.S., Staples, C.A., Ortego, L.S., Hentges, S.G., 2009. Acute and chronic toxicity testing of bisphenol A with aquatic invertebrates and plants. Ecotoxicology and Environmental Safety 72, 1392–1399.
Mori, S., 1993. The breeding system of the 3-spined stickleback, gasterosteus-aculeatus (Forma-Leiura) with reference to spatial and temporal patterns of nesting activity. Behaviour 126, 97–124.
Mori, S., 1994. Nest-site choice by the 3-spined stickleback, Gasterosteus-Aculeatus (Form Leiurus), in spring-fed waters. Journal of Fish Biology 45, 279–289.
Nahlik, A.M., Mitsch, W.J., 2006. Tropical treatment wetlands dominated by free-floating macrophytes for water quality improvement in Costa Rica. Ecological Engineering 28, 246–257.
Nettleship, S., 2011. The Impacts of River Impoundments on the Biology of the Three-Spined Stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. Department of Biology, University of Leicester.
OECD, 2006. Guidance Document on Simulated Freshwater Lentic Field Tests (outdoor microcosms and mesocosms). OECD Environment Health and Safety Publications, p. 38.
Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsch, O., Lutz, I., Kusk, K.O., Wollenberger, L., Santos, E.M., Paull, G.C., Van Look, K.J.W., Tyler, C.R., 2009. A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 364, 2047–2062.
Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Tillmann, M., Markert, B., 2000. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (mollusca: gasteropoda) in laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogens. Ecotoxicology 9, 383–397.
Ozturk, F., Duman, F., Leblebici, Z., Temizgul, R., 2010. Arsenic accumulation and biological responses of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) exposed to arsenite. Environmental and Experimental Botany 69, 167–174.
Pascoe, D., Carroll, K., Karntanut, W., Watts, M.M., 2002. Toxicity of 17 α ethinylestradiol and Bisphenol A to the freshwater cnidarian *Hydra vulgaris*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 43, 56–63.
Pieczynska, E., 2003. Effect of damage by the snail *Lymnaea* (*Lymnaea*) *stagnalis* (L.) on the growth of *Elodea canadensis* Michx. Aquatic Botany 75, 137–145.
R Core Team, D., 2012. R: A Language and Environment for Statistical Computing. foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
Rasband, W.S., 2012. ImageJ. U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA http://imagej.nih.gov/ij/, 1997–2012.
Reynoldson, T.B., Pearce, B., 1979. Predation on snails by three species of triclad and its bearing on the distribution of Planaria torva in Britain. Journal of Zoology 189, 459–484.
Rosenberg, D.M., Resh, V.H., 1982. The use of artificial substrates in the study of freshwater benthic macroinvertebrates. In: Cairns, J.J. (Ed.), Artificial Substrates. Ann Arbor Science, Ann Arbor, Michigan, pp. 175–235.
Roussel, H., Joachim, S., Lamothe, S., Palluel, O., Gauthier, L., Bonzom, J.-M., 2007a. A long-term copper exposure on freshwater ecosystem using lotic mesocosms: individual and population responses of three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). Aquatic Toxicology 82, 272–280.
Roussel, H., Ten-Hage, L., Joachim, S., Le Cohu, R., Gauthier, L., Bonzom, J.-M., 2007b. A long-term copper exposure on freshwater ecosystem using lotic mesocosms: Primary producer community responses. Aquatic Toxicology 81, 168–182.
Schirling, M., Bohlen, A., Triebskorn, R., Köhler, H.R., 2006. An invertebrate embryo test with the apple snail *Marisa cornuarietis* to assess effects of potential developmental and endocrine disruptors. Chemosphere 64, 1730–1738.
Seaby, R.M.H., Martin, A.J., Young, J.O., 1996. Food partitioning by lake-dwelling triclads and glossiphoniid leeches: field and laboratory experiments. Oecologia 106, 544–550.
Segner, H., Caroll, K., Fenske, M., Janssen, C.R., Maack, G., Pascoe, D., Schäfers, C., Vandenbergh, G.F., Watts, M., Wenzel, A., 2003. Identification of

endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates. Report from the European IDEA project. Ecotoxicology and Environmental Safety 54, 302–314.
Shioda, T., Wakabayashi, M., 2000. Effect of certain chemicals on the reproduction of medaka (*Oryzias latipes*). Chemosphere 40, 239–243.
Smith, C., Reay, P., 1991. Cannibalism in teleost fish. Reviews in Fish Biology and Fisheries 1, 41–64.
Smock, L.A., Stoneburner, D.L., 1980. The response of macroinvertebrates to aquatic macrophyte decomposition. Oikos 35, 397–403.
Sohoni, P., Tyler, C.R., Hurd, K., Caunter, J., Hetheridge, M., Williams, T., Woods, C., Evans, M., Toy, R., Gargas, M., Sumpter, J.P., 2001. Reproductive effects of longterm exposure to bisphenol A in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Environmental Science and Technology 35, 2917–2925.
Sokolowska, E., Kulczykowska, E., 2006. Annual reproductive cycle in two free living populations of three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.): patterns of ovarian and testicular development. Oceanologia 48, 124–130.
Sooknah, R.D., Wilkie, A.C., 2004. Nutrient removal by floating aquatic macrophytes cultured in anaerobically digested flushed dairy manure wastewater. Ecological Engineering 22, 27–42.
Staples, C.A., Dome, P.B., Klečka, G.M., Oblock, S.T., Harris, L.R., 1998. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. Chemosphere 36, 2149–2173.
Staples, C.A., Tilghman Hall, A., Friederich, U., Caspers, N., Klečka, G.M., 2011. Early life-stage and multigeneration toxicity study with bisphenol A and fathead minnows (*Pimephales promelas*). Ecotoxicology and Environmental Safety 74, 1548–1557.
Staples, C.A., Woodburn, K.B., Klečka, G.M., Mihaich, E.M., Hall, A.T., Ortego, L., Caspers, N., Hentges, S.G., 2008. Comparison of four species sensitivity distribution methods to calculate predicted no effect concentrations for bisphenol A. Human and Ecological Risk Assesment: An International Journal 14, 455–478.
Tachet, H., Richoux, P., Bournaud, M., Usseglio-Polatera, P., 2000. Invertébrés d'eau douce: systématique, biologie, écologie. CNRS Editions, Paris.
Van den Brink, P.J., Hattink, J., Bransen, F., Van Donk, E., Brock, T.C.M., 2000. Impact of the fungicide carbendazim in freshwater microcosms. II. Zooplankton, primary producers and final conclusions. Aquatic Toxicology 48, 251–264.
Watts, M.M., Pascoe, D., Carroll, K., 2001a. Chronic exposure to 17α-ethinylestradiol and bisphenol A – effects on development and reproduction in the freshwater invertebrate *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae). Aquatic Toxicology 55, 113–124.
Watts, M.M., Pascoe, D., Carroll, K., 2001b. Survival and precopulatory behaviour of *Gammarus pulex* (L.) exposed to two xenoestrogens. Water Research 35, 2347–2352.
West, R.J., Goodwin, P.A., Klečka, G.M., 2001. Assessment of the ready biodegradability of bisphenol A. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 67, 106–112.
Wootton, R.J., 1976. The Biology of the Sticklebacks. Academic Press, London, New York.
Young, J.O., Seaby, R.M.H., Martin, A.J., 1995. Contrasting mortality in young freshwater leeches and triclads. Oecologia 101, 317–323.

H Valorisation scientifique pendant la thèse

H.1 Publications

G. de Kermoysan, A.R.R. Péry, J.M. Porcher & R. Beaudouin (2013).
A non-invasive method based on head morphology to sex mature three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) in rearing conditions.
Mathematical Bioscience. 244(2) :148 - 153.

G. de Kermoysan, S. Joachim, P. Baudoin, M. Lonjaret, C. Tebby, F. Lesaulnier, F. Lestremeau, C. Chatellier, Z. Akrour, E. Pheron, J.M. Porcher, A.R.R. Péry, R. Beaudouin.
Effects of bisphenol A on different trophic levels exposed in lotic experimental ecosystem.
Aquatic toxicology. 144 – 145, 186 – 198.

H.2 Communications orales

G. de Kermoysan, M. Lonjaret, E. Pheron, Z. Akrour, F. Lestremeau, C. Chatellier, S. Joachim, A.R.R. Péry, J.M. Porcher, R. Beaudouin (2013).
Effet du bisphénol A dans des conditions écologiques réalistes sur une population d'épinoche à trois épines.
Sefa 2013, 3 - 4 juillet 2013, Thionville, France.

G. de Kermoysan, R. Beaudouin, J.M. Porcher, A.R.R. Péry, (2011).
Effets des polluants sur la dynamique de population de l'épinoche à trois épines, en mésocosmes : Analyse des données à l'aide d'un modèle individu-centré.
Sefa 2011, 22 juin 2011, Paris, France.

H.3 Communications affichées

G. de Kermoysan, Z. Akrour, M. Lonjaret, F. Lestremeau, C. Chatellier, S. Joachim, A.R.R. Péry, J.M. Porcher, R. Beaudouin (2013).
Realistic assessment of the effects of bisphenol A on a fish population in ecosystemic conditions.
SETAC Europe 23rd Annual Meeting, May 12-16, 2013. Glasgow, Scotland.

S. Joachim, R. Beaudouin, D. Heintz, F. Lesaulnier, P. Baudoin, **G. de Kermoysan**, A.R.R. Péry, J.M. Porcher (2013).
Effects of a long term exposure of bisphenol-A on macrophyte and invertebrate populations and communities in lotic mesocosms.
SETAC Europe 23rd Annual Meeting, May 12-16, 2013. Glasgow, Scotland.

G. de Kermoysan, A.R.R. Péry, S. Joachim, E. Thybaud, J.M. Porcher & R. Beaudouin (2013).
Effets du bisphénol A sur un écosystème aquatique expérimental.
Devant l'Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques, 16 janvier 2013, Ineris, France.

G. de Kermoysan, R. Beaudouin, J.M. Porcher & A.R.R. Péry (2012).
Construction d'un modèle individu-centré de la dynamique de population d'épinoche à trois épinces, *Gasterosteus aculeatus*, en mésocosmes.
SEFA 2012, 2–3 juillet 2012, Lyon, France.

G. de Kermoysan, A.R.R. Péry, J.M. Porcher & R. Beaudouin (2012).
A non-invasive method based on head morphology to sex mature three-spined Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) in rearing conditions.
The 6th SETAC World Congress / SETAC Europe 22nd Annual Meeting, May 20-24, 2012. Berlin, Germany.

G. de Kermoysan, A.R.R. Péry, S. Joachim, V. Martz, P. Miguet, J.M. Porcher

& R. Beaudouin (2012).

Variability in the outcome of outdoor mesocosms with three-spined Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) populations in control conditions : data from 20 replicates in two annual experiments.

The 6th SETAC World Congress / SETAC Europe 22nd Annual Meeting, May 20-24, 2012. Berlin, Germany.

Résumé

Les tests écotoxicologiques en conditions écosystémiques, tels que ceux que l'on peut réaliser en mésocosmes, présentent une plus grande pertinence écologique que les tests normalisés en laboratoire. Ils permettent d'intégrer les interactions complexes entre les espèces, entre le biotope et la biocénose. Cependant, en contrepartie de leur complexité, ces systèmes présentent une variabilité importante qu'il s'agit de réduire, par une standardisation expérimentale poussée, ou d'identifier les facteurs explicatifs pour mieux mettre en lumière des différences entre traitements. Dans le cadre de cette thèse, nous avons en outre fait le choix d'une espèce sur laquelle focaliser nos efforts, le poisson, ici l'épinoche à trois épines, *Gasterosteus aculeatus*, en le considérant comme un bon indicateur de l'état de santé du mésocosme. Il nous est apparu plus judicieux, dans le cadre des études en mésocosmes, de se concentrer sur une espèce intégratrice en parallèle d'une analyse globale d'abondance des espèces.

L'objectif de cette thèse était donc de mieux comprendre la dynamique de populations de l'épinoche à trois épines dans les mésocosmes de l'Ineris afin d'améliorer les protocoles utilisés et l'analyse des données obtenues lors des études écotoxicologiques. Pour y parvenir, des expériences ont été réalisées afin de caractériser les processus et les traits d'histoire de vie de l'espèce dans notre site d'étude ; un protocole a été proposé pour effectuer des expériences en mésocosmes ciblées sur l'étude de la dynamique des poissons ; deux années d'expérience ont permis d'acquérir des données en conditions témoins et de mieux saisir les facteurs confondants ; nous avons mis en application nos connaissances en évaluant les effets du bisphénol A (BPA) sur la dynamique de population de poissons exposés à 0, 1, 10 et 100 μg/L de BPA. Nous avons ainsi pu décrire et expliquer la dynamique de la population de l'épinoche dans les mésocosmes par quatre phases distinctes : une augmentation massive des effectifs en raison de la reproduction des fondateurs ; une diminution importante des effectifs en raison d'une saturation des capacités du système ; une faible reprise ; une nouvelle chute à la fin de la période de reproduction. S'agissant du BPA, des effets significatifs ont été mis en évidence sur les individus (atrophie des gonades), mais également à l'échelle de la population (structure de la population).

Abstract

Ecotoxicity tests in ecosystemic conditions, such as those that can be performed in mesocosms, provide a substantial ecological relevance. They permit to integrate complex inter-species interactions, interactions between the organisms and the environmental conditions, and permit to assess perturbations with a systemic view. However, in return, these systems present a high variability that should be reduced, through experimental standardization or by identifying explicative factors, to better assess the difference between the outputs of the different treatments. In this thesis, we also focused on one species, of fish, the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*), considering that it is good indicator of the health status of the experimental ecosystem. We suggest that is more appropriate to focus on an integrative species in parallel to a global analysis in the context of mesocosms studies.

The goal of this thesis was thus to better understand sticklebacks population dynamics in INERIS mesocosms to improve the experimental protocols and the data analysis in ecotoxicity studies. To achieve this goal, studies were performed to characterize life cycle traits and processes of the species ; an experimental protocol was proposed to perform mesocosms studies with a focus on fish population dynamics; the data from two years of mesocosms studies in control conditions permitted to better understand the confounding factors ; we applied the methodolgoy to assess the effects of bisphenol A (BPA) on fish population dynamics with expsoure concentrations 0, 1, 10 and 100 μg/L BPA.

We could describe and explain stickleback population dynamics divided by four periods: first a massive abundance increase due to the first reproduction of the founders in the mesocosms; second an important decrease due to the saturation of the system ; third a short increase ; finaly a new drop due to the end of reproduction. For BPA, effects were observed both at individual and at population levels.