1999-110

UTILISATION DE MESOCOSMES COMME OUTILS D'AIDE A L'EVALUATION DES RISQUES ECOTOXICOLOGIQUES

INERIS : E. THYBAUD - V. PETIT-POULSEN
INRA : G. MONOD - L. LAGADIC
CNRS/Unité de Paris Sud : T. CAQUET

RESUME

La réglementation européenne concernant la mise sur le marché et/ou l'utilisation de substances chimiques nécessite la caractérisation de l'écotoxicité et du devenir de ces substances dans l'environnement (Directive 92/32/CEE) afin de réaliser, dans la mesure où la substance est classée dangereuse pour l'environnement, une évaluation des risques pour l'environnement liés à l'utilisation de ces produits (Directive 93/67/CEE). A l'heure actuelle, cette évaluation, tant du comportement que de l'écotoxicité est réalisé à partir des résultats d'essais normalisés de laboratoire (Directive 92/32/CEE). Les mésocosmes, en permettant de coupler les études de comportement et de caractérisation de l'écotoxicité des substances chimiques représentent un niveau d'intégration supérieur à celui des essais de laboratoire et permettent donc une évaluation plus réaliste des risques résultant d'une éventuelle contamination des milieux aquatiques. Ces outils ont d'ailleurs fait l'objet de diverses études, en particulier aux États-Unis, notamment pour évaluer l'impact des pesticides sur les écosystèmes aquatiques (Touart, 1994; Urban 1994). L'objectif des études menées dans le cadre du programme PNETOX est de recueillir les informations nécessaires permettant à terme de réaliser des simplifications des écosystèmes artificiels tant lotiques que lentiques de sorte que la variabilité soit réduite et que des mécanismes essentiels puissent être isolés, sans pour autant invalider les conclusions et les prédictions qui pourraient être tirées.

The European regulation concerning the chemicals put on the market and/or their use needs to caracterise their ecotoxicity and fate in the environment (Directive 92/32/EEC) in order to do, if a substance is classified as dangerous for the environment, an environmental risk assessment in relation with the use of these products (Directive 93/67/EEC). For the moment, this assessment is made from results of standardised laboratory tests (Directive 92/32/EEC). Mesocosms permit to associate studies on the chemicals behaviour and on their ecotoxicity caracterisation. They represent a greater integration level compared to laboratory tests and permit a more realistic risk assessment resulting of a potential aquatic ecosystems contamination. These tools have been the subject of diverse studies, in particular in the USA, especially in order to evaluate the impact of pesticides on aquatic systems (Touart, 1994 ; Urban, 1994).The objective of the studies which are made as part of PNETOX program is to collect necessary informations in order to, at last, simplify lotic and lentic artificial ecosystems, in the way of reducing the variability and to isolate the essential mecanisms, without invalidate the conclusions and predictions which could be made.

1. PRESENTATION GENERALE DES MESOCOSMES AQUATIQUES UTILISES EN ECOTOXICOLOGIE

1.1. Définitions

Les écosystèmes aquatiques artificiels expérimentaux ou mésocosmes, initialement développés pour des études à visées écologiques sont, depuis quelques années, utilisés pour étudier le devenir, le comportement et l'écotoxicité des substances chimiques en milieu aquatique (Dorn *et al*, 1996 ; Gillespie *et al*, 1996 ; Pearson et Crossland, 1996 ; Gillespie *et al*, 1998).

Selon la définition classique de Odum (1984), les mésocosmes sont des dispositifs expérimentaux délimités et partiellement clos, construits en plein air, et qui se situent entre les microcosmes de laboratoire et le milieu naturel ou macrocosme. Depuis cette publication originale, le concept de mésocosme a évolué, en même temps que se multipliait le nombre de systèmes construits de par le monde et les mésocosmes sont désormais le plus souvent assimilés à des systèmes physiquement confinés, constitués de plusieurs niveaux trophiques leur permettant d'être autosuffisants. La durée de leur fonctionnement devrait en théorie être supérieure à la durée de vie des organismes appartenant à l'avant-dernier niveau trophique présent (c'est à dire le niveau situé juste en dessous du niveau trophique le plus élevé). Par ailleurs, leur taille doit être suffisante pour permettre un échantillonnage et des mesures fiables, n'ayant pas d'incidence significative sur la structure et la dynamique du système (Lalli, 1990). Les mésocosmes utilisés en écotoxicologie sont des écosystèmes reconstitués mis en oeuvre pour suivre le devenir et les effets de produits chimiques à différents niveaux d'organisation biologique grâce à la mesure de réponses qualitatives et/ou quantitatives (Crossland & Bennett, 1989 ; Kosinski, 1989 ; Ravera, 1989 ; Guckert, 1993 ; Belanger, 1994 ; Brock & Budde, 1994 ; Graney *et al.*, 1994, 1995; Heimbach, 1994 ; Hill *et al.*, 1994a ; Mitchell, 1994 ; Kennedy *et al.*, 1995 ; Rodgers *et al.*, 1996 ; Belanger, 1997 ; Caquet *et al.*, 1999).

Plus récemment, Graney *et al.* (1995) ont proposé d'utiliser la notion d'*étude de terrain en conditions simulées* pour décrire les études menées dans des dispositifs expérimentaux qui consistent soit en une portion isolée d'un écosystème naturel, soit en un modèle reconstitué d'écosystème lentique ou lotique. Il est fondamental de garder à l'esprit que l'objectif des mésocosmes n'est pas de mimer un écosystème naturel donné. Il s'agit en fait de constituer des systèmes ayant leurs propres caractéristiques dans lesquels vont s'accomplir des processus biologiques naturels et qui vont permettre de mettre en place des scénarios variés de contamination (organismes présents, nature de la contamination, etc.).

1.2. Intérêts des mésocosmes aquatiques en écotoxicologie

Les écosystèmes aquatiques artificiels à vocation expérimentale ont tout d'abord été conçus dans le but de développer et de valider de nouvelles théories sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes (Hall *et al.*, 1970 ; Lawton, 1995). Il est apparu très rapidement que de tels systèmes pouvaient fournir des informations pertinentes pour l'évaluation du devenir et des effets des produits chimiques dans les écosystèmes aquatiques. En particulier, ils offrent l'opportunité d'identifier simultanément les effets directs (aussi appelés « effets primaires ») et indirects (aussi appelés « effets secondaires ») des xénobiotiques.

De ce fait, les études sur mésocosmes procurent l'opportunité d'aller au delà des tests monospécifiques et d'évaluer les effets directs et indirects au niveau des communautés de l'écosystème. En effet, les bioessais réalisés dans les conditions simplifiées du laboratoire ne

permettent que d'évaluer certains effets directs des substances toxiques. De plus, les phénomènes qui réduisent (adsorption sur les matières en suspension ou sur les sédiments par exemple) ou augmentent (bioturbation ou bioaccumulation par exemple) la biodisponibilité des contaminants, ne peuvent être pris en compte dans le cadre des études réalisées dans de tels dispositifs. Une étude comparative concernant un herbicide (le métamitron) a été réalisée entre des tests monospécifiques sur poissons, algues et daphnies, et un essai de cinq mois sur microcosmes (Heimbach, 1994). Les résultats obtenus sur les poissons et les microinvertébrés sont comparables entre les deux types d'essais. Par contre, une sensibilité plus importante a été observée sur les algues lors des essais de laboratoire par rapport aux microcosmes. Deux explications ont été avancées. La première est qu'il a été constaté une disparition de la molécule dans les microcosmes au cours de l'expérimentation, ce qui n'apparaît pas lors des essais de laboratoire dont la durée est beaucoup plus courte et qui n'incluent pas les différentes dégradations biotiques et abiotiques de la substance. La deuxième est que, dans un milieu plus proche du milieu naturel, les organismes vivants sont moins sensibles que dans les tests de laboratoire car ces derniers sont réalisés dans de l'eau propre, dans des conditions de fort stress pour les organismes.

L'originalité des mésocosmes tient essentiellement au fait qu'ils combinent un certain réalisme écologique, du fait de la présence des principaux éléments constitutifs des écosystèmes naturels, et une facilité d'accès à de nombreux paramètres physico-chimiques, biologiques et toxicologiques qui peuvent, dans une certaine mesure, être contrôlés. En d'autres termes, l'évaluation des propriétés écotoxicologiques des xénobiotiques en mésocosmes est plus réaliste que celle effectuée à l'aide des tests de laboratoire et plus facile à réaliser qu'une évaluation *in situ* (Odum, 1984 ; Cairns, 1988 ; Crossland, 1994 ; La Point, 1994).

L'évaluation du risque des toxiques vis-à-vis de l'environnement aquatique est classiquement basée sur la comparaison entre les concentrations estimées dans les différents compartiments des écosystèmes (PEC : predictible environmental concentrations) et les concentrations estimées comme étant sans effet sur les organismes vivants (PNEC : predicted no effect concentrations), le rapport PEC/PNEC étant le risque (Crossland, 1994 ; Matthiessen, 1994 ; van Leeuwen *et al.*, 1994 ; Suter, 1995). Dans ce contexte, les mésocosmes peuvent être utilisés pour améliorer les estimations des PNEC, grâce à l'exposition simultanée d'espèces appartenant à différents taxons (Crossland *et al.*, 1992 ; Fairchild *et al.*, 1993 ; Taylor *et al.*, 1994) et des PEC, notamment par la validation de modèles de devenir (Crossland *et al.*, 1986 ; Crossland, 1994). En particulier, les mésocosmes peuvent être utilisés pour les produits chimiques introduits en quantités importantes dans l'environnement et/ou pour ceux qui sont déjà identifiés comme potentiellement dangereux (Graney *et al.*, 1995 ; Ward *et al.*, 1995).

Une revue bibliographique a été effectuée par Belanger (1994) sur des études effectuées sur microcosmes et mésocosmes et des tests monospécifiques sur des surfactants. Au total, six études sur microcosmes, cinq études sur mésocosmes, représentant un total de quatorze surfactants testés, ainsi qu'une centaine de tests monospécifiques ont été comparés. Il ressort de cette étude que l'établissement d'une NOEC à partir de tests de degré de représentativité plus élevé que les tests monospécifiques est très difficile. Par contre, les essais sur microcosmes et mésocosmes sont inestimables pour la validation des résultats des tests monospécifiques dont sont issues les NOEC, notamment en contaminant des mésocosmes à des concentrations définies comme NOEC à partir de tests monospécifiques.

Les mésocosmes peuvent aussi représenter l'étape finale dans le processus d'évaluation des risques et être utilisés lorsque l'évaluation des risques, basée sur les essais de laboratoire, indique que l'utilisation du composé chimique peut présenter un risque inacceptable. L'objectif des mésocosmes est alors de confirmer ou d'infirmer la présomption de risque (Graney, 1994).

Il ne faut toutefois pas perdre de vue que la meilleure approche de l'évaluation du risque écotoxicologique est celle qui combine l'emploi de tests de laboratoire et l'utilisation de dispositifs plus complexes tels que les mésocosmes.

2. PRESENTATION DES MESOCOSMES UTILISES DANS LE CADRE DU PROGRAMME PNETOX

2.1. Plate-forme expérimentale de L'INRA (Rennes) : mésocosmes lentiques

Les mésocosmes employés dans cette étude ont été construits sur la plate-forme expérimentale de l'Unité Expérimentale Écologie et Écotoxicologie Aquatiques de l'INRA, sur le site de l'École Nationale Supérieure Agronomique (ENSA) de Rennes (Figure 1). Ils ont été creusés à même le sol, avec des berges qui forment un angle de 50° avec l'horizontale. Leur fond est recouvert d'une géomembrane rigide en polyéthylène haute densité, assurant l'étanchéité, et d'une bâche en polyane, pour éviter la contamination de cette dernière. Le dispositif expérimental se compose de 12 mésocosmes rectangulaires (5 x 6 m ; 1,20 m prof. maximale ; volume utile de l'ordre de 18 m^3), permettant le déroulement du cycle complet, voire même de plusieurs cycles successifs, de l'ensemble des organismes présents (en particulier poissons et macroinvertébrés).



Figure 1 :Vue générale de la plate-forme expérimentale de l'Unité Expérimentale Écologie et Écotoxicologie Aquatiques de l'INRA, sur le site de l'École Nationale Supérieure Agronomique (ENSA) de Rennes. Les mésocosmes utilisés dans le cadre du programme PNETOX sont situés sur la gauche..

Le renouvellement et le niveau de l'eau sont uniquement dépendants du cycle précipitation/évaporation. Toutefois, un système de trop-plein permet d'éviter le débordement des bassins en cas de fortes pluies, et d'assurer un niveau maximal constant, identique entre

tous les mésocosmes. Les mésocosmes sont placés à l'air libre, dans les conditions climatiques (température, éclairement, précipitations) naturelles, de sorte que les variations de ces dernières puissent être prises en compte dans l'interprétation des résultats obtenus lors de la mesure des paramètres physico-chimiques et biologiques.

Les 12 mésocosmes ont été mis en place selon le même protocole. Le fond des systèmes a été recouvert d'une couche de sédiment reconstitué d'environ 10 cm d'épaisseur. Les proportions des constituants « artificiels » et naturels du sédiment ont été choisies sur la base de la norme ISO pour le sol (à savoir 70% de sable, 20% de kaolinite et 10% de tourbe à sphaignes). Pour le sédiment des mésocosmes, la fraction « artificielle », comprenant 70% de sable de Loire et 30% de bentonite, représente entre 70 à 80% de la masse totale du sédiment, les 20-30% restant étant constitués par des sédiments naturels provenant d'un étang forestier de la forêt de Paimpont (35). Ces sédiments ont été introduits dans les systèmes en juin 1998.

Une fois les sédiments disposés dans les bassins, ceux-ci ont été remplis avec de l'eau du réseau de distribution d'eau potable de la ville de Rennes. Dans chaque mésocosme, la hauteur d'eau a été fixée à 90 cm et est maintenue constante. Entre juin 1998, une fois la mise en eau des structures effectuée, et février 1999, différents types d'organismes ont été introduits, notamment des scirpes (*Scirpus lacustris*) et des macroinvertébrés (planorbes, aselles, Annélides Tubificidés, *Lymnaea palustris*). D'autres organismes ont colonisé spontanément les systèmes, en particulier des amphibiens (grenouille, triton), des macroinvertébrés benthiques (*Physa acuta*, Sphaeridés, Chydoridés, Ostracodes, Hétéroptères, Libellulidés, etc). En ce qui concerne le plancton, deux inoculums ont été introduits en juillet et octobre 1998, dans chacun des mésocosmes.

Les paramètres physico-chimiques de l'eau permettant une caractérisation du biotope, tels que la température, le pH ou la concentration en oxygène dissous, sont effectués périodiquement. Les études biocénotiques sont essentiellement menées au niveau des communautés (phytoplancton, zooplancton, macroinvetébrés benthiques).

2.2. Plate-forme expérimentale de l'INERIS : mésocosmes lotiques

Les mésocosmes lotiques, construits sur le site de l'INERIS sont constitués de canaux rectilignes de vingt mètres de long. La largeur des canaux, uniforme sur toute la longueur, est de 1 m. Chaque canal est composé de deux zones de longueurs égales: une zone peu profonde (30 cm) en amont et une zone profonde (70 cm) en aval.

Les canaux, au nombre de douze disposés parallèlement les uns aux autres (Figure 2), sont en polyester armé de fibres de verre. Chaque canal est équipé en amont d'un bac de mélange destiné d'une part à oxygéner l'eau avant son arrivée dans les canaux, d'autre part à obtenir une solution de polluant homogène lors de la contamination. En sortie des canaux l'eau s'écoule par trop plein.

Le débit d'alimentation en eau des mésocosmes est de 1 m^3/h par canal. Le temps de séjour d'une molécule dans les canaux est d'environ 8 heures. La vitesse du courant est de :

- 0,1 cm/s dans la partie amont peu profonde,
- 0,05 cm/s dans la partie aval profonde.

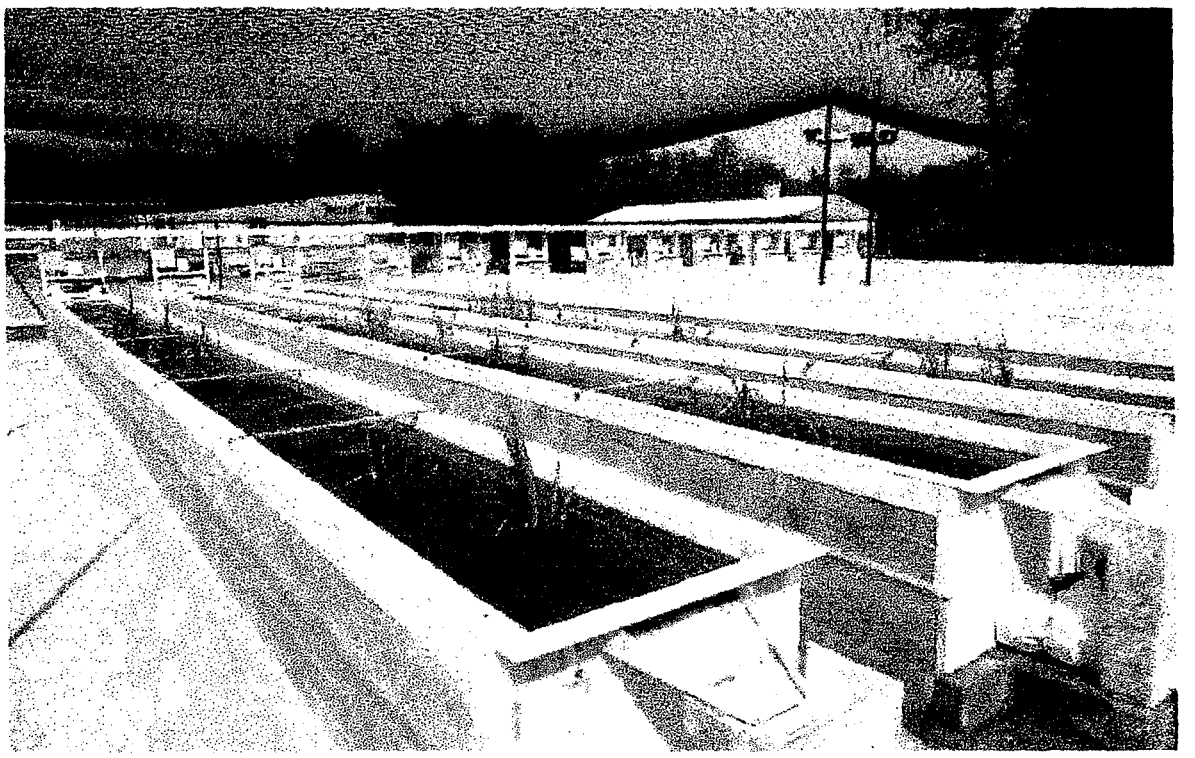


Figure 2 : Vue générale de la plate forme expérimentale de l'INERIS

Deux types de sédiments différents ont été introduits dans les deux zones des canaux. Dans la partie profonde des mésocosmes, du sédiment fin a été introduit. Dans la partie peu profonde, une couche de quelques millimètres d'épaisseur de sédiment naturel a été introduite sur laquelle ont été placés des blocs de grès de 10 à 20 cm de diamètre.

Un suivi des paramètres physico-chimique, température, oxygène et pH, ainsi que de la concentration de la molécule dans l'eau a été effectué.

Les effets de la substance étudiée ont été suivis au niveau individuel ou populationel sur divers maillons de la chaîne trophique. A cette fin, des organismes vivants ont été introduits dans les dispositifs expérimentaux, soit sous forme libre dans le milieu, soit sous forme encagée, suivant le type de paramètre suivi.

Un certain nombre de macroinvertébrés ont fait l'objet d'une introduction volontaire dans les mésocosmes. Il s'agit de gammaridae, d'asellidae, d'éphéméroptères, de diptères (majoritairement des chironomidés), de trichoptères, de coléoptères et de lymnaeidés. Des épinoches (*Gasterosteus aculeatus*) ont été introduites et laissées en liberté dans les canaux, bien que la majorité des expérimentations en mésocosmes dans lesquelles les poissons sont étudiés utilisent des organismes encagés (Kosinski, 1989 ; Belanger, 1997). Cette espèce a été choisie du fait de sa large répartition dans les cours d'eau du nord de la France.

2.3. Substances étudiées

Les trois molécules choisies pour ce programme sont le 4-nonylphénol, le 4-nonylphénol dodécyl-éthoxylé et le pentachlorophénol (PCP). Les mésocosmes lentiques ont été contaminés avec du 4-nonylphénol ou du 4-nonylphénol dodécyl-éthoxylé, les mésocosmes lotiques avec du PCP.

Les alkylphénol polyéthoxylés forment le deuxième groupe de surfactants non ioniques à usage commercial tandis que le pentachlorophénol est un pesticide à large spectre d'action (algicide, fongicide, herbicide, insecticide et molluscicide (WHO, 1987).

2.4. Choix des concentrations de traitement des mésocosmes lentiques

Pour le 4-nonylphénol, la concentration choisie est de 100 µg/L, c'est-à-dire une concentration parmi les plus élevées relevées dans le milieu naturel. A titre de comparaison, la concentration utilisée pour des expérimentations en microcosmes sur la gambusie par l'Équipe d'Écotoxicologie de l'INRA de Rennes est de 50 µg/L ; en enclos littoraux, des effets ont été observés sur des invertébrés pour une concentration d'environ 80 µg/L (Schmude *et al.*, 1999).

Il existe très peu de données sur les concentrations en dérives polyéthoxylés du nonylphénol dans les eaux naturelles. Les quelques études disponibles indiquent des concentrations de l'ordre de 10 µg/L pour les dérivés comportant 1 à 2 groupements éthoxy. Dans ce contexte, nous avons retenu pour le 4-nonylphénol dodécyl-éthoxylé une concentration identique à celle du 4-nonylphénol. A chaque date de traitement, les deux molécules ont été introduites dans les mésocosmes sous la forme de 2 L d'une solution éthanolique (éthanol 99% - eau ultrapure ; 40:60, v/v). Un volume équivalent de solution éthanolique a été introduit parallèlement dans les mésocosmes témoins.

2.5. Choix des concentrations de traitement des mésocosmes lotiques

Les deux concentrations de contamination au PCP ont été choisies en fonction des données de toxicité vis-à-vis des organismes aquatiques recensées dans la littérature, l'objectif étant de tester une concentration pour laquelle les effets sont faibles et une concentration dix fois supérieure. La contamination étant effectuée en continu dans les canaux, des solutions mères de PCP concentrées sont préparées et utilisées pour la contamination des canaux. Les concentrations de ces solutions mères étant respectivement de 2 et 0,2 g/l, soit largement au-dessus de la limite de solubilité du PCP qui est de 14 mg/l à 20 °C (WHO, 1987), l'utilisation d'éthanol comme tiers solvant était indispensable. La proportion d'éthanol dans les canaux est de 0,0025 %. La répartition de la contamination des canaux a été la suivante :

- 2 canaux contaminés au PCP à 10 µg/l,
- 2 canaux contaminés au PCP à 100 µg/l,
- 2 canaux témoins solvant (éthanol à 0,0025 %),
- 6 canaux témoins.

3. DISCUSSION

3.1. Observation indirecte d'effets toxiques

Ainsi que nous l'avons déjà dit, les études en mésocosmes sont complexes et mettent en évidence des effets indirectes des xénobiotiques. Par exemple, le PCP ayant un effet direct de toxicité sur le développement des algues filamenteuses présentes dans les mésocosmes lotiques, un déséquilibre de l'écosystème a pu être observé par des dosages physico-chimiques dans l'eau tels que l'oxygène dissous et le pH. En effet, une augmentation importante de pH a été observée dans les canaux témoins. Celle-ci est liée à la prolifération des algues filamenteuses, des genres Spirogyra et Zygnema, qui se sont développées dans les mésocosmes du fait de la qualité de l'eau, du fort ensoleillement et du faible courant. Dans les autres canaux, le pH est plus stable. Ceci est vraisemblablement dû à la prolifération moins importante, voire nulle dans les canaux contaminés à la plus forte dose, des algues dans les quatre canaux contaminés. Par ailleurs, l'évolution de l'oxygène dissous est hétérogène au sein des canaux. Dans les canaux contaminés à 100 µg/l, une diminution importante de la concentration en oxygène dissous a été observée et peut être mise en relation avec la dégénérescence des macrophytes, notamment des callitriches, et des algues filamenteuses liée à la présence du PCP, ce dernier inhibant l'activité photosynthétique des végétaux (Senger & Rühl, 1980 ; Tissut *et al*, 1987). Dans ces canaux, la production d'oxygène est donc très réduite et la consommation plus importante. Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus lors d'une expérimentation conduite en microcosmes (Schauert *et al*, 1982) où il avait été montré qu'une contamination à 1 mg/l de PCP avait provoqué la disparition du phytoplancton autotrophe, l'augmentation du nombre d'organismes indicateurs de pollution (flagellés et micro-organismes) et la diminution de la concentration en oxygène dissous.

3.2. Des effets indirectes liés à la chaîne trophique

L'intérêt des mésocosmes est également de mettre en évidence des effets indirects des produits chimiques sur les écosystèmes aquatiques par des phénomènes de transfert et de bioaccumulation dans plusieurs niveaux trophiques (Belanger, 1994 ; Graney, 1994). L'intérêt de l'intégration de la chaîne trophique, par rapport aux tests monospécifiques, est illustré par les résultats obtenus sur les populations de gammares (crustacés) et de larves de chironomes (insectes) dans les mésocosmes lotiques contaminés au PCP (cf Figure 3). En effet, nous avons observé une diminution significative du nombre de gammares dans les canaux contaminés (même à l'éthanol uniquement) par rapport aux canaux témoin, bien que cette diminution soit nettement moins importante dans les canaux contaminés à la plus forte dose de PCP. Par ailleurs, une augmentation significative du nombre de larves de chironomes dans les canaux contaminés à la plus forte dose de PCP a été observée. Ces deux résultats sont à rapprocher des résultats obtenus sur le nombre d'épinoches recensées dans les différents canaux : plus d'une centaine d'individus ont été recensés dans les canaux témoins, les témoins solvant et les canaux contaminés au PCP à 10 µg/l ; dans les canaux contaminés au PCP à 100 µg/l, la mortalité de ces poissons était totale dans l'un des canaux, et une douzaine d'individus ont été recensés dans le second. Or, les épinoches se nourrissent principalement de larves de chironomes et de gammares. La diminution du nombre d'épinoches dans les canaux diminue par conséquent la pression exercée par ces prédateurs sur les gammares dont les populations ont ainsi tendance à augmenter tout en étant ralenties par l'effet toxique du PCP. En ce qui concerne les larves de chironomes, l'absence de prédateur a favorisé leur développement qui est alors plus important que dans les autres canaux.

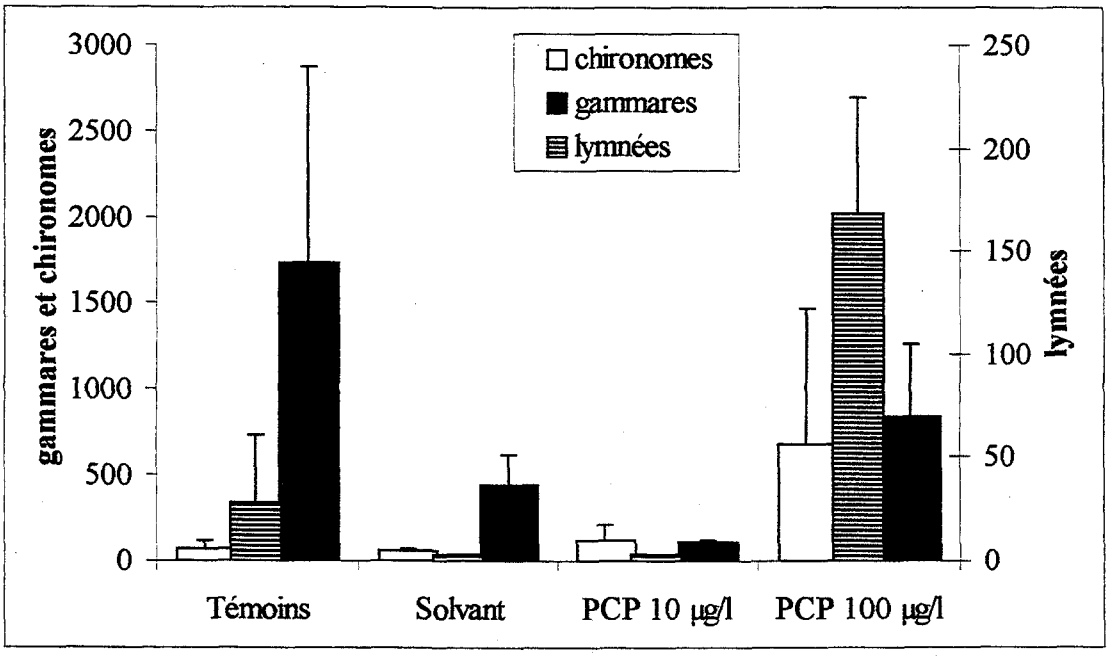


Figure 3: Nombre moyen de gammares, de lymnées et de larves de chironomes prélevés par canal dans les mésocosmes lotiques.

De même, une augmentation du nombre de lymnées (gastéropodes) a été observée dans les canaux contaminés au PCP à 100 µg/l (cf Figure 3). Ces organismes sont omnivores : ils se nourrissent d'algues, de débris de macrophytes, de cadavres d'insectes et de détritus (Mouthon, 1980 ; Mouthon, 1982). Une dégradation des végétaux a été observée dans les canaux contaminés à 100 µg/l. Il est possible que ce milieu ait mieux convenu aux lymnées et qu'elles se soient nourries des débris de végétaux. D'autre part, il a été observé, dans les canaux témoins, les canaux témoins solvant et les canaux contaminés à 10 µg/l de PCP, une forte densité de sangsues. Dans ces canaux, une forte densité d'algues filamenteuses a également été observée. Ces algues présentant un habitat favorable aux sangsues, leur prolifération a donc certainement favorisé le développement de ces animaux (Dussart, 1966 ; Hynes, 1970 ; Illies, 1978). Or, les sangsues sont des prédateurs de gastéropodes, d'arthropodes et d'invertébrés. Il est donc probable que les sangsues aient exercé une prédation sur les lymnées. L'absence d'algues filamenteuses dans les canaux contaminés au PCP à 100 µg/l, et donc de sangsues, peut donc expliquer la présence des lymnées dans ces canaux. Les résultats obtenus ici diffèrent de ceux obtenus lors d'essais en laboratoire. En effet, les CE50 déterminées sur 48 à 96 heures d'exposition sur les genres *Physa* et *Lymnea* se situent entre 160 et 300 µg/l (Crossland & Wolf, 1985 ; WHO, 1987). Après une contamination pendant plusieurs mois à 100 µg/l, une mortalité importante des lymnées était donc attendue.

Ceci montre tout l'intérêt des mésocosmes car ils prennent en compte tous les facteurs environnementaux (relations trophiques, interactions entre les espèces, influence du sédiment, du climat,...) et permettent ainsi de mettre en évidence les effets indirects des produits chimiques testés. Ils sont d'ailleurs de plus en plus utilisés dans ce sens et permettent de comprendre certains effets écotoxicologiques observés en laboratoire, et de confirmer ou d'infirmer les évaluations de risque dérivées des tests de laboratoire monospécifiques (Guckert *et al*, 1993 ; Belanger, 1994 ; La Point & Fairchild, 1994).

3.3. Toxicité liée à l'utilisation d'un solvant

L'expérimentation en mésocosmes lotiques a aussi soulevé les problèmes susceptibles de survenir lors de l'utilisation d'un tiers solvant pour l'étude de la toxicité d'une substance peu soluble. En effet, la contamination des canaux est une contamination en continue dans des systèmes ouverts. Une contamination en dynamique de ce type nous a contraint à utiliser des solutions mères concentrées. En effet les quantités de substance pure que nous aurions dû introduire en continu pour obtenir les concentrations désirées étaient trop faibles pour être directement injectables. Or pour les substances faiblement solubles le seul moyen de préparer une solution concentrée est d'utiliser un solvant. Pour ce faire, une concentration en éthanol de 0,0025% a été utilisée. Celle-ci est nettement inférieur aux doses utilisées lors de tests de laboratoire. Or, à cette concentration, nous avons observé des effets dans les canaux « témoins solvants ». Ceux ci sont difficiles à interpréter d'une part du fait de l'absence de données concernant la toxicité à long terme de l'éthanol et d'autre part du fait des interactions possibles entre celui-ci et les matériaux constitutifs des installations. L'éthanol est connu pour favoriser le développement bactérien (Granmo *et al*, 1989), ce qui aurait pu passer inaperçu sur une durée d'étude faible, mais pose problème pour une durée d'étude plus longue. Par ailleurs, l'éthanol a favorisé l'extraction de certains composés du dispositif expérimental qui peuvent avoir une certaine toxicité vis-à-vis du système aquatique.

Notamment, lors d'un essai de survie réalisé sur des oeufs de truites au stade oeillé, la mortalité observée chez les témoins était significativement inférieure à celle observée dans tous les canaux traités, y compris les canaux témoins solvant (cf. Figure 4). D'autre part, aucune différence n'a été observée entre les canaux contaminés au PCP, quelle que soit la concentration, et les canaux témoins solvant. Dans ces conditions, il est impossible de déterminer si l'effet observé est dû à l'action du PCP, bien que celui-ci soit toxique pour les truites (Adema & Vink, 1981 ; Crossland & Wolf, 1985 ; Smith *et al*, 1987 ; WHO, 1987 ; Shigeoka *et al*, 1988 ; Kaiser & Devillers, 1994), à l'éthanol ou aux produits extraits des matériaux utilisés (PVC et résine/fibre de verre) par l'éthanol. En effet, lors d'une analyse en spectrométrie de masse de l'eau présente dans les mésocosmes, deux molécules ont été identifiées comme étant extraites des matériaux utilisés sur la plate-forme par l'éthanol : le Di Octyl Phtalate et le Di Octyl Sébaçate.

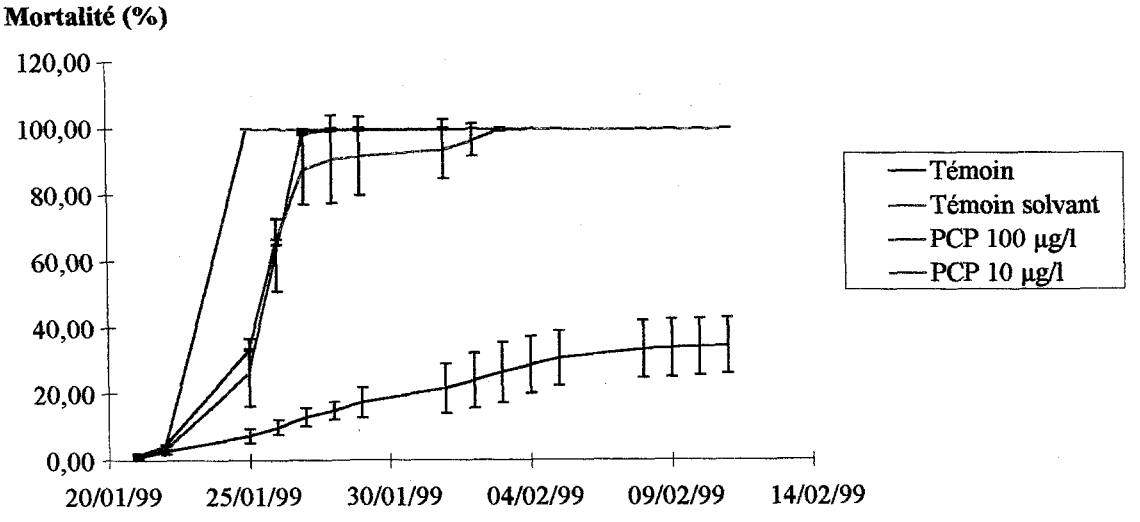


Figure 4 : Mortalité des oeufs de truites lors de l'essai réalisé début 99

Bien qu'étant présentes à l'état de trace, ces deux molécules sont extraites en continu des matériaux et peuvent éventuellement avoir des effets non prévisibles et masquer l'effet du polluant à faible dose. Ceci soulève donc le problème de l'utilisation de solvants lors des expérimentations en mésocosmes, le nombre de matériaux différents utilisés dans ces installations étant important : structure des installations, différents pièges pour l'échantillonnage des organismes, etc.

L'évaluation des effets de substances très peu solubles reste encore délicate. En effet, l'utilisation de solvants, souvent réaliste par rapport à des situations réelles de rejets industriels, peut poser des difficultés lorsque les doses de solvants sont telles que l'on ne peut plus distinguer les effets liés à la substance des effets liés au solvant lui-même. Actuellement les essais de laboratoire sont souvent réalisés à la limite de solubilité, ce qui rend l'évaluation des risques impossible à réaliser lorsque cette limite se trouve proche des concentrations prédites dans l'environnement (PEC).

Les mésocosmes peuvent tout de même servir de moyen d'étude pour l'utilisation de substances peu solubles, d'une part parce qu'il est possible de tester l'effet de très faibles concentrations en effectuant des expériences à long terme, ce qui peut être une solution pour limiter l'apport de solvant, voir de le supprimer, d'autre part les différents compartiments du milieu étudié (sédiments, végétaux) peuvent servir de chemin de contamination autre que le simple compartiment aqueux par des phénomènes d'adsorption par exemple.

4. CONCLUSION

Les études en mésocosmes se situent entre les études de laboratoire, outils permettant, par la simplification du schéma de fonctionnement et la maîtrise des conditions d'essais, la modélisation d'une partie du milieu aquatique (milieu d'essai normalisé, test monospécifique), et les études de terrain, qui permettent d'appréhender la complexité des transferts entre les différents compartiments biotiques et abiotiques, mais dont l'interprétation est parfois difficile en raison du manque de maîtrise des conditions de contamination. L'intérêt des mésocosmes est de pouvoir étudier d'une part le devenir, le comportement et les effets des molécules, d'autre part le fonctionnement des écosystèmes et les perturbations engendrées par le ou les polluants testés. Ils permettent donc une évaluation simultanée de la structure et des fonctionnalités des écosystèmes

Un mésocosme doit être un système relativement simple, dont nous pouvons maîtriser un certain nombre de paramètres d'entrées, qui doit servir à modéliser des fonctionnements complexes. Tous les effets provenant de l'accumulation dans la chaîne trophique, de la compétition entre espèces, des relations proies- prédateurs ne peuvent être appréhendées que dans un système mettant en relation différents maillons composant le milieu « naturel ». La relation que nous avons observé entre l'effet du PCP sur les gammares croisé avec l'effet du PCP sur les épinoches, prédateurs de gammares, en est un exemple.

Mettre en place une expérience en mésocosme, c'est maîtriser cette échelle qui oppose simplicité à complexité, afin d'être le plus représentatif possible des milieux naturels tout en conservant la maîtrise de certains paramètres du système et en restant à l'échelle du manipulable. Il est donc nécessaire d'adapter les outils de suivi de l'état du milieu, qui sont utilisés sur le terrain, aux contraintes du dispositif expérimental. Le choix de la fréquence de prélèvement d'invertébrés benthiques pour le suivi de leur population en est un exemple. En effet il faut tenir compte de l'influence de la pression de prélèvement sur le maintien de la population, tout en ayant un échantillonnage relativement fréquent pour observer des modifications précoces de la structure de la communauté.

Comme le souligne Kosinski (1989), la complexité de ce type d'expérience et la particularité de chaque plate-forme expérimentale rend les études sur mésocosmes particulièrement longues à maîtriser. Cependant ces études sont particulièrement intéressantes pour répondre à certaines questions qui ne sauraient être abordées ni par les tests de laboratoire, du fait de la simplification trop importante des systèmes écologiques et des contraintes expérimentales qui y sont associées, ni par les études sur le terrain dont la mise en oeuvre et l'interprétation sont parfois difficiles en raison de la non maîtrise du mode de contamination. Ce type d'expérimentation aide également à comprendre l'extrapolation qui peut être faite à une situation « de terrain » des résultats acquis lors d'études de laboratoire.

Ces études sont en particulier indispensable pour:

- d'une part évaluer de façon plus précise le rapport entre les effets observés en laboratoire par des tests aigus ou chroniques et les effets en milieu naturel, en particulier pour évaluer la pertinence du facteur reliant les résultats des tests de laboratoire à la concentration prédite sans effets (PNEC) qui sera utilisée dans l'évaluation des risques liés à l'utilisation des substances chimiques sur l'environnement,
- d'autre part répondre à des problèmes spécifiques qui ne peuvent être résolus par des études en laboratoire classique. Ces derniers peuvent être d'ordre divers:
    - l'évaluation des effets de substances peu solubles,
    - l'évaluation d'effets secondaires engendrés par les interactions entre niveaux trophiques et/ou espèces,
    - l'évaluation des effets d'une exposition discontinue au cours du temps,
    - l'évaluation de la récupération d'un milieu après une mesure de réduction des risques par exemple (Shaw et Kennedy, 1996).

Le présent rapport ne présente qu'un exposé préalable des premiers résultats obtenus sur les deux plates-formes expérimentales. Néanmoins, à la lueur de ceux-ci, l'intérêt des mésocosmes pour la caractérisation écotoxicologiques des substances chimiques est confirmée.

A la suite de l'acquisition de l'ensemble des résultats expérimentaux, un traitement synthétique des données pourra être réalisé pour chacune des expérimentations et des recommandations en terme de constitution et de suivi pourront être établies pour la réalisation d'essais en mésocosme lotique et lentique.

5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adema D.M.M. & VINK G.J. 1981 A comparative study of the toxicity of 1,1,2-trichloroethane, dieldrin, pentachlorophenol and 3,4-dichloroaniline for marine and freshwater organisms. *Chemosphere*, **10**, 6, 533-554.

Belanger S.E., 1994, Review of experimental microcosm, mesocosm, and field tests used to evaluate the potential hazard of surfactants to aquatic life and the relation to single species data. *In* Hill I.R., Heimbach F., Leeuwangh P. & Matthiessen P. (eds), *Freshwater Field Tests for Hazard Assessment of Chemicals*. Lewis Publishers, Boca Raton, 287-314.

Belanger S.E., 1997, Literature review and analysis of biological complexity in model stream ecosystems: Influence of size and experimental design. *Ecotox. Environ. Saf.*, **36**, 1-16.

Brock T.C.M. & Budde B.J., 1994, On the choice of structural parameters and endpoints to indicate responses of freshwater ecosystems to pesticide stress. *In* Hill I.R., Heimbach F., Leeuwangh P. & Matthiessen P. (eds), *Freshwater Field Tests for Hazard Assessment of Chemicals*. Lewis Publishers, Boca Raton, 19-56.

Cairns J. Jr., 1988, Putting the eco- in ecotoxicology. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **8**, 226-238.

Caquet Th., Lagadic L. & Sheffield S.R., 1999, Mesocosms in ecotoxicology (1). Outdoor aquatic systems. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* (accepté pour publication).

Commission of the European Communities (1992). Council Directive 92/32/EEC of 30 April 1992, amending for the seventh time Directive 67/548/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances Off. J. Euro. Communities, L154.

Commission of the European Communities (1993). Commission Directive 93/67/EEC of 20 July 1993, laying down the principles for the assessment of risks to man and the environnement of substances notified in accordance with Council Directive 67/548/EEC. Off. J. Euro. Communities, L227.

Crossland N.O. & Bennett D., 1989, Outdoor ponds: their use to evaluate the hazards of organic chemicals in aquatic environments. *In* Boudou A. & Ribeyre F. (eds), *Aquatic Ecotoxicology: Fundamental Concepts and Methodologies, Vol. I.* CRC Press, Boca Raton, 273-296.

Crossland N.O. & WOLF C.J.M., 1985, Fate and biological effects of pentachlorophenol in outdoor ponds. *Environ. Toxicol. Chem*, **4**, 73-86.

Crossland N.O., (1994) Extrapolating from mesocosms to the real world. *Toxicol. Ecotoxicol. News* 1, 15-22.

Crossland N.O., Bennett D., Wolff C.J.M. & Swannell R.P.J., 1986, Evaluation of models to assess the fate of chemicals in aquatic systems. *Pestic. Sci.*, **17**, 297-304.

Crossland N.O., Mitchell G.C. & Dorn P.B., 1992, Use of outdoor artificial streams to determine threshold toxicity concentrations for a petrochemical effluent. *Environ. Toxicol. Chem.*, **11**, 49-59.

Dorn P., Rodgers J.H. Jr., Dubey S.T., Gillespie W.B. Jr., Lizotte R.E. Jr., 1996, An assessment of the ecological effects of $C_{9\text{-}11}$ linear ethoxylate surfactant in stream mesocosm experiments. *Ecotoxicology*, **6**, 275-282.

Dussart B., 1966, Limnologie. L'étude des eaux continentales. *Ed.* Gauthier-Villars, Paris, 677.

Fairchild J.F., Dwyer F.J., La Point T.W., Burch S.A. & Ingersoll C.W., 1993, Evaluation of a laboratory-generated NOEC for linear alkylbenzene sulfonate in outdoor experimental streams. *Environ. Toxicol. Chem.*, **10**, 1763-1776.

Gillespie W.B., Rodgers J.H. & Crossland N.O., 1996, Effects of a nonionic surfactant ($C_{14\text{-}15}$ AE-7) on aquatic invertebrates in outddor stream mesocosms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **15**, 8, p. 1418-1422.

Gillespie W.B., Rodgers J.H. & Dorn P.B., 1998, Responses of aquatic invertebrates to a linear alcohol ethoxylate surfactant in stream mesocosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **41**, p. 215-221.

Granmo, A.E., Magnusson R., Berggren K. M., 1989, Lethal and sublethal toxicity of 4-nonylphenol to the common mussel *Mytilus edulis L. Environmental pollution*, **59**: p. 115-127.

Graney R.L., Giesy J.P. & Clark J.R., 1995, Field studies. *In* Rand G.M. (ed.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, 2nd ed. Taylor and Francis, Washington D.C., 257-305.

Graney R.L., Kennedy J.H. & Rodgers J.H. Jr. (eds), 1994, *Aquatic Mesocosm Studies in Ecological Risk Assessment*. Lewis Publishers, Boca Raton.

Guckert J.B., 1993, Artificial streams in ecotoxicology. *J. N. Am. Benthol. Soc.*, **12**, 350-356.

Guckert J.B., Belanger S.E. & Barnum J.B., 1993, Testing single-species predictions for a cationic surfactant in a stream mesocosm. *The Science of the Total Environment*, Supplement, 1011-1023.

Hall D.J., Cooper W.E. & Werner E.E., 1970, An experimental approach to the production dynamics and structure of freshwater animal communities. *Limnol. Oceanogr.*, **15**, 859-928.

Heimbach F., Berndt J. & Pflueger W., 1994, Fate and biological efects of an herbicide on two artificial pond ecosystems of different size. *In* Graney R.L., Kennedy J.H. & Rodgers J.H. Jr. (eds), *Aquatic Mesocosm Studies in Ecological Risk Assessment.* Lewis Publishers, Boca Raton, 303-320.

Hill I.R., Heimbach F., Leeuwangh P. & Matthiessen P. (eds), 1994a, *Freshwater Field Tests for Hazard Assessment of Chemicals.* Lewis Publishers, Boca Raton.

Hynes H.B.N., 1970, The ecology of running water,. *Ed.*Liverpool University, 555.

Illies J., 1978, Limnofauna Europeae. *Ed.* G. Fisher, Stuttgart, 523.

Kaiser K.L.E. & Devillers J.- Ecotoxicity of chemicals to *Photobacterium phosphoreum.*- Gordon and Breach Science publishers, 1994, 635-639.

Kennedy J.H., Johnson Z.B., Wise P.D. & Johnson P.C., 1995, Model aquatic ecosystems in ecotoxicological research: considerations of design, implementation, and analysis. *In* Hoffman D.J., Rattner B.A., Burton G.A. Jr. & Cairns J. Jr. (eds), *Handbook of Ecotoxicology.* Lewis Publishers, Boca Raton, 117-162.

Kosinski R.J., 1989, Artificial streams in ecotoxicological research. *In* Boudou A. & Ribeyre F. (eds) *Aquatic Ecotoxicology: Fundamental Concepts and Methodologies, Vol. I.* CRC Press, Boca Raton, 297-316.

La Point T.W., 1994, Interpreting the results of agricultural microcosm tests: linking laboratory and experimental field results to predictions of effect in natural ecosystems. *In* Hill I.R., Heimbach F., Leeuwangh P. & Matthiessen P. (eds) *Freshwater Field Tests for Hazard Assessment of Chemicals.* Lewis Publishers, Boca Raton, 83-94.

La Point Th.W. & Fairchild J.F., 1994, Use of mesocosm data to predict effects in aquatic ecosystems : limits to interpretation. *In* "Aquatic mesocosm studies in ecological risk assessment", R.L. Graney, J.H. Kennedy & J.H.Jr. Rodgers (eds), SETAC Publication Series, 241-255.

Lalli C.M., 1990, *Enclosed Experimental Marine Ecosystems : A Review and Recommendations.* Springer Verlag, New York.

Lawton J.H., 1995, Ecological experiments with model systems. *Science*, **269**, 328-331.

Matthiessen P., 1994, Guidelines for pesticide hazard assessment with freshwater fiels tests at the international level. *In* Hill I.R., Heimbach F., Leeuwangh P. & Matthiessen P. (eds), *Freshwater Field Tests for Hazard Assessment of Chemicals.* Lewis Publishers, Boca Raton, 455-473.

Mitchell G.C., 1994, System design for field tests in flowing waters: design and use of outdoor artificial streams in ecotoxicology. *In* Hill I.R., Heimbach F., Leeuwangh P. & Matthiessen P. (eds), *Freshwater Field Tests for Hazard Assessment of Chemicals.* Lewis Publishers, Boca Raton, 127-139.

Mouthon J., 1980, Contribution à l'écologie des mollusques des eaux courantes : esquisses biotypologique et données écologiques. Thèse de Doctorat, Université Paris VI, 150.

Mouthon J., 1982, Les mollusques dulcicoles : données biologiques et écologiques. Clés de détermination des principaux genres de Bivalves et de Gastéropodes de France. *Bulletin Français de Pisciculture*, spécial, 27.

Odum E.P., 1984, The mesocosm,. *Bioscience*, **34**, 558-562.

Pearson N. & Crossland N.O., 1996, Measurement of community photosynthesis and respiration in outdoor artificial streams. *Chemosphere*, **32**, 5, p. 913-919.

Ravera O., 1989, The "enclosure" method: concepts, technology, and some examples of experiments with trace metals. *In* Boudou A. & Ribeyre F. (eds), *Aquatic Ecotoxicology: Fundamental Concepts and Methodologies,*

Vol. I. CRC Press, Boca Raton, 249-272.

Rodgers J.H. Jr., Crossland N.O., Kline E.R., Gillespie W.B., Figueroa R.A. & Dorn P.B., 1996, Design and construction of model stream ecosystems. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **33**, 30-37.

Schauert W., Lay J.P, Klein W. & Korte F..- Influence of 2,4,6-trichlorophenol and pentachlorophenol on the biota of aquatic systems.- Chemosphere, 1982, 11, n°1, 71-79.

Schmude K.L., Liber K., Corry T.D. & Stay F.S., 1999, Effects of 4-nonylphenol on benthic macroinvertebrates and insect emergence in littoral enclosures. *Environ. Toxicol. Chem.*, **18**, 386-393.

Senger H. & Rühl D., 1980, The influence of pentachlorophenol on the biosynthesis of 5-aminolevulinic acid and chlorophyll, *Int. J. Biochem.*, **12**, 1045-1048.

SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry), 1991, Workshop on aquatic microcosms for ecological assessment of pesticides. SETAC Fondation and World Wildlife Fund, 56 p.

SETAC-Europe (Society of Environmental Toxicology and Chemistry), 1991, Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. *In* "Meeting experts on guidelines for static field mesocosm tests", SETAC Publications, 46 p.

Shaw, J.L., Kennedy J.H., 1966, The use of aquatic field mesocosm studies in risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **15**(5): p. 605-607.

Shigeoka T., Sato Y., Takeda Y., Yoshida K. & Yamauchi F., 1988, Acute toxicity of chlorophenols to green algae, *Selenastrum capricornutum* and *Chlorella vulgaris*, and quantitative structure-activity relationships,. *Environ. Toxicol. Chem.*, 7, 847-854.

Smith P.D., Brockway D.L. & Stancil F.E.Jr., 1987, Effects of hardness, alkalinity and pH on the toxicity of pentachlorophenol to *Selenastrum capricornutum*,. *Environ. Toxicol. Chem.*, **6**, 891-900.

Suter G.W. II, 1995, Introduction to ecological risk assessment for aquatic toxic effects. *In:* Rand, G.M. (ed.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, 2nd ed., Washington D.C.: Taylor and Francis, 803-816.

Taylor E.J., Maund S.J., Bennett D. & Pascoe D., 1994, Effects of 3,4-dichloroaniline on the growth of two freshwater macroinvertebrates in a stream mesocosm. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **29**, 80-85.

Tissut M., Taillandier G., Ravanel P. & Benoit-Guyod J.L., 1987, Effects of chlorophenols on isolated class A chloroplasts and thylakoids : a QSAR study,. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **13**, 32-42.

Touart L.W., 1988, Aquatic mesocosm test to support pesticide registrations, *Hazard evaluation division technical guidance document. U.S. E.P.A., Washington, Reptn° US-EPA/540/09-88-035*, 35

Touart L.W., 1994, Regulatory endpoints and the experimental design of aquatic mesocosm tests. *In* "Aquatic mesocosm studies in ecological risk assessment", R.L. Graney, J.H. Kennedy & J.H.Jr. Rodgers (eds), Setac Publication Series, 25-46.

Urban D.J., 1994, Mesocosms in risk assessment,. *In* "Aquatic mesocosm studies in ecological risk assessment", R.L. Graney, J.H. Kennedy & J.H.Jr. Rodgers (eds), Setac Publication Series, 7-16.

van Leeuwen K., Emans H.-J., van de Plassche E. & Canton H., 1994. The role of field tests in hazard assessment of chemicals. *In* Hill I.R., Heimbach F., Leeuwangh P. & Matthiessen P. (eds), *Freshwater Field Tests for Hazard Assessment of Chemicals*. Lewis Publishers, Boca Raton, 425-437.

Ward S., Arthington A.H. & Pusey B.J., 1995, The effects of a chronic application of chlorpyrifos on the macroinvertebrate fauna in an outdoor artificial stream system: species responses. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **30**, 2-23.

WHO (World Health Organization), 1987, Pentachlorophenol, World Health Organization eds, 236.